

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Papel del receptor de hidrocarburos aromáticos en el
envejecimiento cerebral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Isabel Bravo-Ferrer Álvarez-Sala

DIRECTORES

María Ángeles Moro Sánchez

Ignacio Lizasoain Hernández

María Isabel Cuartero Desviat

Madrid, 2019

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología y Toxicología



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

PAPEL DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS EN EL
ENVEJECIMIENTO CEREBRAL

Tesis Doctoral de:

Isabel Bravo-Ferrer Álvarez-Sala

Directores de Tesis:

María Ángeles Moro Sánchez

Ignacio Lizasoain Hernández

María Isabel Cuartero Desviat

Madrid, 2018

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología y Toxicología



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**PAPEL DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS EN
EL ENVEJECIMIENTO CEREBRAL**

Isabel Bravo-Ferrer Álvarez-Sala

Tesis Doctoral

Madrid, 2018

Índice

<i>Abreviaturas</i> -----	4
<i>I-Resumen</i> -----	8
<i>II- Summary</i> -----	12
1.1. Concepto de envejecimiento-----	18
1.2. Datos poblacionales-----	19
1.3. Características generales del envejecimiento cerebral fisiológico-----	20
1.3.1. Cambios funcionales en el envejecimiento cerebral: declive cognitivo y motor-----	21
1.3.2. Cambios estructurales en el cerebro envejecido-----	22
1.3.3. Cambios a nivel celular-----	23
1.4. Características moleculares del envejecimiento.-----	26
1.4.1. Inflammaging-----	29
1.5. Envejecimiento fisiológico vs patológico: Enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento-----	33
1.5.1. Envejecimiento patológico: enfermedad de Alzheimer-----	34
1.6. Factores que pueden aceleran el envejecimiento y/o aumentar la predisposición a sufrir un envejecimiento patológico-----	39
1.6.1. Factores intrínsecos: modelos animales de envejecimiento prematuro-----	39
1.6.2. Factores exógenos-----	40
1.7. El Receptor de Hidrocarburos Aromáticos: perspectiva histórica-----	43
1.8. AhR: un factor de transcripción bHLH/PAS-----	45
1.9. Variantes polimórficas de AhR-----	46
1.10. Señalización por AhR-----	47
1.10.1. Vía clásica de señalización: AhR como factor de transcripción-----	47
1.10.2. Vía alternativa de señalización: AhR como E3 ubiquitina ligasa-----	48
1.10.3. Regulación de la señalización por AhR-----	50
1.10.4. Interacción con otras rutas de señalización-----	51
1.11. Ligandos que activan AhR-----	52
1.11.1. Xenobióticos-----	52

1.11.2. Ligandos naturales	56
1.12. Funciones fisiológicas de AhR	59
1.12.1. Expresión constitutiva de AhR	59
1.12.2. Alteraciones fenotípicas en animales nulos para AhR	60
1.12.3. Papel de AhR en el desarrollo	60
1.12.4. Papel de AhR en el adulto	62
1.12.5. Papel de AhR en el envejecimiento	63
1.12.6. Papel de AhR en el envejecimiento cerebral	64
2. Hipótesis y objetivos	66
2.1. Hipótesis	68
2.2. Objetivos	68
2.2.1. Regulación de AhR por la edad	68
2.2.2. Papel de AhR en el envejecimiento fisiológico	68
2.2.3. Papel de AhR en un modelo patológico de envejecimiento: enfermedad de Alzheimer	69
3. Materiales y Métodos	70
3.1. Materiales	72
3.2. Métodos	72
3.2.1. Normativa y animales de experimentación	72
3.2.2. Tratamientos de los animales	73
3.2.3. Test comportamentales	74
3.2.4. Procesamiento de muestras	79
3.2.5. Técnicas experimentales	81
3.2.6. Análisis de imágenes y cuantificación densitométrica	88
3.2.7. Imágenes de resonancia magnética	89
3.2.8. Obtención de muestras de plasma de humano	91
3.2.9. Análisis estadístico	91
3. Resultados	94
4.1. Regulación de AhR por la edad	96
4.1.1. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR en cerebro	96
4.1.2. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR a nivel periférico	104
4.2. Papel de AhR en el envejecimiento fisiológico	111

ÍNDICE

4.2.1. Perfil temporal de indicadores generales de envejecimiento en ratones AhR ^{+/+} y AhR ^{-/-} -----	111
4.2.2. Perfil temporal de indicadores específicos de envejecimiento cerebral en ratones AhR ^{+/+} y AhR ^{-/-} -----	114
2.2.3. Perfil temporal del fenómeno de <i>inflammaging</i> en ratones AhR ^{+/+} y AhR ^{-/-} -----	122
4.2.4. Efecto de la activación crónica de AhR en el envejecimiento-----	129
4.3. Papel de AhR en un modelo patológico de envejecimiento: enfermedad de Alzheimer-----	131
4.3.1. Efecto de la activación crónica de AhR en el desarrollo de déficits cognitivos en ratones APP ^{NL-F} -----	131
4.3.2. Efecto de la activación crónica de AhR en el desarrollo de placas amiloides en ratones APP ^{NL-F} -----	136
5. Discusión-----	138
5.1. Regulación de AhR por la edad-----	140
5.1.1. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR en cerebro-----	140
5.1.2. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR a nivel periférico-----	145
5.1.3. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR: perspectivas futuras----	149
5.2. Papel de AhR en el envejecimiento fisiológico-----	150
5.2.1. Efecto de la delección génica de AhR en la aparición de rasgos generales asociados al envejecimiento-----	150
5.2.2. Efecto de la delección génica de AhR en la aparición de rasgos asociados al envejecimiento cerebral-----	152
5.2.3. Papel de AhR en los déficits neurológicos asociados a la edad-----	153
5.2.4. Papel de AhR en el <i>inflammaging</i> -----	156
5.2.5. Efecto de la activación crónica de AhR en el envejecimiento-----	160
5.2.6. Papel de AhR en el envejecimiento fisiológico: perspectivas futuras-----	160
5.3. Efecto de la activación crónica de AhR en el desarrollo de placas amiloides y déficits cognitivos en ratones APP ^{NL-F} -----	161
6. Conclusiones-----	164
7. Bibliografía-----	168

Abreviaturas

ACh Acetilcolina

ACN Acetonitrilo

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNc Ácido desoxirribonucleico complementario

AhRR Represor del receptor de hidrocarburos de arilo

AMD Degeneración macular asociada a la edad

APOE Apolipoproteína E

APP Proteína precursora amiloide

ARN Ácido ribonucleico

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

ARNT Translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo

ATP Adenosina trifosfato

B(a)P Benzo[a]pireno

BDNF Factor neurotrófico derivado de cerebro

BHE Barrera hematoencefálica

bHLH Dominio hélice bucle hélice

CBA *Cytometric bead assay*

CRP Proteína C reactiva

Ct Ciclo umbral

DC Dieta control

DMSO Dimetil sulfóxido

DRX Dieta rica en xenobióticos

DTI Imágenes de tensor de difusión

EA Enfermedad de Alzheimer

EAE Encefalitis autoimmune experimental

ABREVIATURAS

- FA** Fracción de anisotropía
- FICZ** 6-Formilindol (3,2-b) carbazol
- GFAP** Proteína glial fibrilar ácida
- HAH** Hidrocarburos aromáticos halogenados
- IBA1** Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1
- IFN- γ** Interferón gamma
- IGF 1** Factor de crecimiento insulínico tipo I
- IL-10** Interleucina 10
- IL-17a** Interleucina 17a
- IL-2** Interleucina 2
- IL-4** Interleucina 4
- IL-6** Interleucina 6
- INE** Instituto nacional de estadística
- IRM** Imágenes de resonancia magnética
- KYNA** Ácido quinurénico
- L-kyn** L-kinurenina
- LPS** Lipopolisacárido
- LTP** Potenciación a largo plazo
- MHCII** Complejo mayor de histocompatibilidad II
- NDMA** N-Metil-D-Aspartato
- NeuN** Núcleo neuronal
- NFkB** Factor nuclear kappa B
- OMS** Organización mundial de la salud
- PAH** Hidrocarburos aromáticos policíclicos
- PAS** Per/ARNT/Sim
- PCB** Policlorobifenilos
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

ABREVIATURAS

RPE Epitelio pigmentario de la retina

RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SNC Sistema nervioso central

TCDD Tetraclorodibenzo-p-dioxina

TDI Ingesta tolerable diaria

TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa

Trp Triptófano

TWI Ingesta tolerable semanal

XRE Elementos de respuesta a xenobióticos

I-Resumen

El envejecimiento es el proceso biológico que se da en la etapa final de la vida de un organismo, caracterizado por una pérdida de la integridad fisiológica que conduce a un declive funcional, (López-Otín et al. 2013). Aunque los cambios moleculares y celulares que acompañan al envejecimiento afectan en mayor o menor medida a todos los órganos, existen estructuras especialmente vulnerables. Este es el caso del SNC que presenta cambios tanto anatómicos como celulares que finalmente conllevan a un deterioro cognitivo y/o motor. Como consecuencia del incremento en la esperanza de vida en las últimas décadas, se impone la necesidad de hallar estrategias que permitan retrasar el declive fisiológico asociado al envejecimiento, así como de reducir el desarrollo de patologías asociadas a la edad.

En este sentido, los principales esfuerzos se centran en profundizar en procesos intrínsecos, a nivel celular y molecular que se encuentran alterados a lo largo del envejecimiento. Uno de estos procesos, es el denominado "*Inflamaging*" (Salminen et al. 2012) un estado pro-inflamatorio de bajo grado que se caracteriza por un aumento de los niveles de los mediadores inflamatorios y que en último término, puede tener consecuencias deletéreas. El *inflammaging* es un proceso generalizado y que, por lo tanto, afecta a todo el organismo, incluido el SNC. Se ha demostrado que esta inflamación se asocia al envejecimiento cognitivo y a una mayor propensión a padecer enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Maragakis and Rothstein 2006).

Sin embargo, los factores extrínsecos al propio organismo también juegan un papel fundamental en como envejecemos. En los últimos años ha surgido un enorme interés en determinar si la exposición a la contaminación ambiental puede hacernos más vulnerables a padecer EA, así como otras enfermedades neurodegenerativas y, actualmente, un creciente número de observaciones parecen indicar que la exposición a contaminantes ambientales o xenobióticos puede actuar también a nivel del SNC, acelerando el envejecimiento cognitivo e incluso aumentando el riesgo de padecer Alzheimer (Underwood 2017).

RESUMEN

Un candidato interesante capaz de responder a cambios tanto intrínsecos como ambientales y que por tanto podría desempeñar funciones a lo largo del envejecimiento, es el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR), también conocido como receptor de xenobióticos. AhR es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la familia de proteínas altamente conservadas bHLH (dominio hélice-bucle-hélice) /PAS(Per-ARNT-Sim). Una de las principales funciones de AhR es el metabolismo de xenobióticos, pero, además, este receptor presenta un importante papel a nivel fisiológico, y destacablemente, AhR participa en el control de procesos inflamatorios (Singh et al.2013).

Con estos antecedentes, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, nos propusimos la siguiente hipótesis: “El receptor de hidrocarburos aromáticos participa en el envejecimiento fisiológico por su papel en el control de la inflamación, así como por su papel detoxificador tanto a nivel sistémico como a nivel del sistema nervioso central. Los cambios en su señalización durante dicho proceso pueden acelerar la aparición de rasgos asociados al envejecimiento fisiológico y/o provocar su conversión patológica” .

Para el desarrollo de dicha hipótesis hemos utilizado ratones C57/BL6 de fenotipo salvaje, así como ratones transgénicos AhR^{-/-} y APP^{NL-F}. Los niveles de expresión de AhR, así como de otros mediadores de su ruta de señalización se determinaron mediante RT-PCR o *western-blot*, y para la determinación de los niveles de ligando de AhR se utilizó un ensayo luciferasa. El análisis de los niveles de citoquinas se realizó a través de la técnica de *cytometric bead array*. Por último, la caracterización fenotípica de los animales se realizó mediante tests de comportamiento, neuroimagen mediante resonancia magnética e inmunofluorescencia en cortes de cerebro.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que la edad afecta a la expresión y función de AhR, así como a los niveles de otros mediadores implicados en su ruta de señalización, tanto a nivel cerebral como periférico.

A nivel cerebral hemos demostrado que la expresión del receptor, localizado principalmente en neuronas, disminuye con la edad tanto en corteza como en

hipocampo. Sin embargo, su función transcripcional no parece estar afectada por este descenso. De hecho, a nivel basal, hemos observado un incremento de uno de los principales genes diana de AhR, Cyp1B1.

Dado el importante papel de AhR en el metabolismo de xenobióticos, decidimos evaluar posibles cambios en la expresión y función del receptor a nivel hepático. Nuestros resultados indican que los niveles de AhR, así como su función transcripcional, aumentan a lo largo de la edad en este órgano. Además, de nuevo, encontramos un incremento de los niveles constitutivos hepáticos de Cyp1B1 en los animales envejecidos.

AhR es un factor de transcripción activado por ligando y, por lo tanto, una razón para el incremento observado en los niveles de Cyp1B1 tanto en cerebro como en hígado podría ser un aumento en los niveles de ligandos agonistas. Por esta razón, decidimos evaluar los posibles cambios asociados a la edad de los mismos a nivel sistémico. En efecto, la actividad agonista de AhR del plasma de ratones envejecidos fue mayor que en los ratones jóvenes.

Además, en la presente Tesis Doctoral también hemos demostrado que la delección génica de AhR promueve la aparición temprana de características fenotípicas asociadas al envejecimiento cerebral, como una disminución en el volumen cortical, una pérdida de la integridad de la sustancia blanca o déficits motores y cognitivos. Asimismo, los ratones AhR^{-/-} presentan una aceleración del fenómeno de *inflammaging* y un aumento de la reactividad astrogial en el envejecimiento.

Por último, quisimos determinar el posible papel de AhR en un envejecimiento patológico, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer. Para ello, utilizamos ratones APP^{NL-F}, a los que se les ha insertado el gen humano para APP con dos mutaciones: la sueca "NF" y la ibérica "L". Los resultados presentados en esta Tesis doctoral ponen de manifiesto, por primera vez, que la administración de una dieta rica en xenobióticos con actividad agonista AhR acelera el desarrollo de placas amiloides, posiblemente por activación crónica de este receptor. Además, los

RESUMEN

ratones alimentados con dicha dieta presentan una alteración en la memoria de trabajo que no aparece en sus controles.

El conjunto de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral indica que AhR, así como otros mediadores en su ruta de señalización, sufren cambios a lo largo de la edad. Además, nuestros datos sugieren que la regulación del receptor es esencial en el envejecimiento fisiológico y que los cambios en dicha regulación pueden contribuir y/o acelerar la aparición de rasgos patológicos.

II- Summary

Aging is the biological process that occurs in the final stage of the life of an organism, characterized by a loss of physiological integrity that leads to a functional decline (López-Otín et al. 2013). Although the age-associated molecular and cellular changes affect every organ to a greater or lesser extent, there are especially vulnerable structures. This is the case of the CNS, that presents both anatomical and cellular changes that eventually lead to a cognitive and/or motor impairment. As a result of life expectancy in recent decades, there is a need to find strategies that allow delaying the physiological decline associated with aging, as well as reducing the development of pathologies associated with age.

In this sense, the main efforts focus on look into intrinsic processes at the cellular and molecular level that are altered throughout aging. One of these processes is the so-called "inflammaging" (Salminen et al. 2012), a chronic low-grade inflammatory state characterized by an increase in the cytokines levels, which may ultimately have deleterious consequences. The "inflammaging" is a generalized process and, therefore, affects the whole organism, including the CNS. It has been shown that this inflammation is associated with cognitive aging and a higher susceptibility to neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) (Maragakis and Rothstein 2006).

However, factors extrinsic to the organism itself also play a fundamental role in how we age. In recent years, there has been a huge interest in determining whether exposure to environmental pollution can make us more vulnerable to AD, as well as to other neurodegenerative diseases. Currently, an increasing number of observations seem to indicate that exposure to environmental contaminants or xenobiotics can also act at the CNS level, accelerating cognitive aging and even increasing the risk of suffering from Alzheimer's disease (Underwood 2017).

An interesting candidate capable of responding to both intrinsic and environmental changes and that could therefore perform functions throughout aging, is the Aromatic Hydrocarbon Receptor (AhR), also known as xenobiotic receptor. AhR is a ligand-activated transcription factor that belongs to the family of

SUMMARY

highly conserved proteins bHLH (helix-loop-helix domain) / PAS (Per-tRNA-Sim). One of the main functions of AhR is the metabolism of xenobiotics but, in addition, this receptor plays an important role at the physiological level and, notably, AhR participates in the control of inflammatory processes. (Singh et al. 2013).

With this background, for the development of this Doctoral Thesis, we proposed the following hypothesis: "The aromatic hydrocarbon receptor participates in physiological aging due to its role in the control of inflammation, as well as to its role as a detoxifier, both systemically and at the CNS level. Changes in its signalling during this process could accelerate the appearance of age-associated features and/or cause their pathological conversion".

For testing this hypothesis, we used wild-type C57/BL6 mice, as well as transgenic AhR^{-/-} and APP^{NL-F} mice. The expression levels of AhR, as well as of other mediators of its signalling pathway were determined by RT-PCR or western-blot; for the determination of AhR ligand levels, a luciferase assay was used. The analysis of cytokine levels was carried out using the cytometric bead array technique. Finally, the phenotypic characterization of the animals was carried out through behavioural tests, neuroimaging using MRI and immunofluorescence in brain slices.

The results obtained in this Doctoral Thesis show that age affects the expression and function of AhR, as well as the levels of other mediators involved in its signalling pathway, both at the CNS and the periphery.

At the brain level we have shown that the expression of the receptor, located mainly in neurons, decreases with age in both cortex and hippocampus. However, its transcriptional function does not seem to be affected by this decrease. In fact, at baseline, we have observed an increase in one of the main target genes of AhR, Cyp1B1.

Given the important role of AhR in the metabolism of xenobiotics, we decided to evaluate possible changes in the expression and function of the receptor in the liver. Our results indicate that AhR levels, as well as its transcriptional function, increase throughout the age in this organ. In addition, again, we found an increase in the hepatic constitutive levels of Cyp1B1 in aged animals.

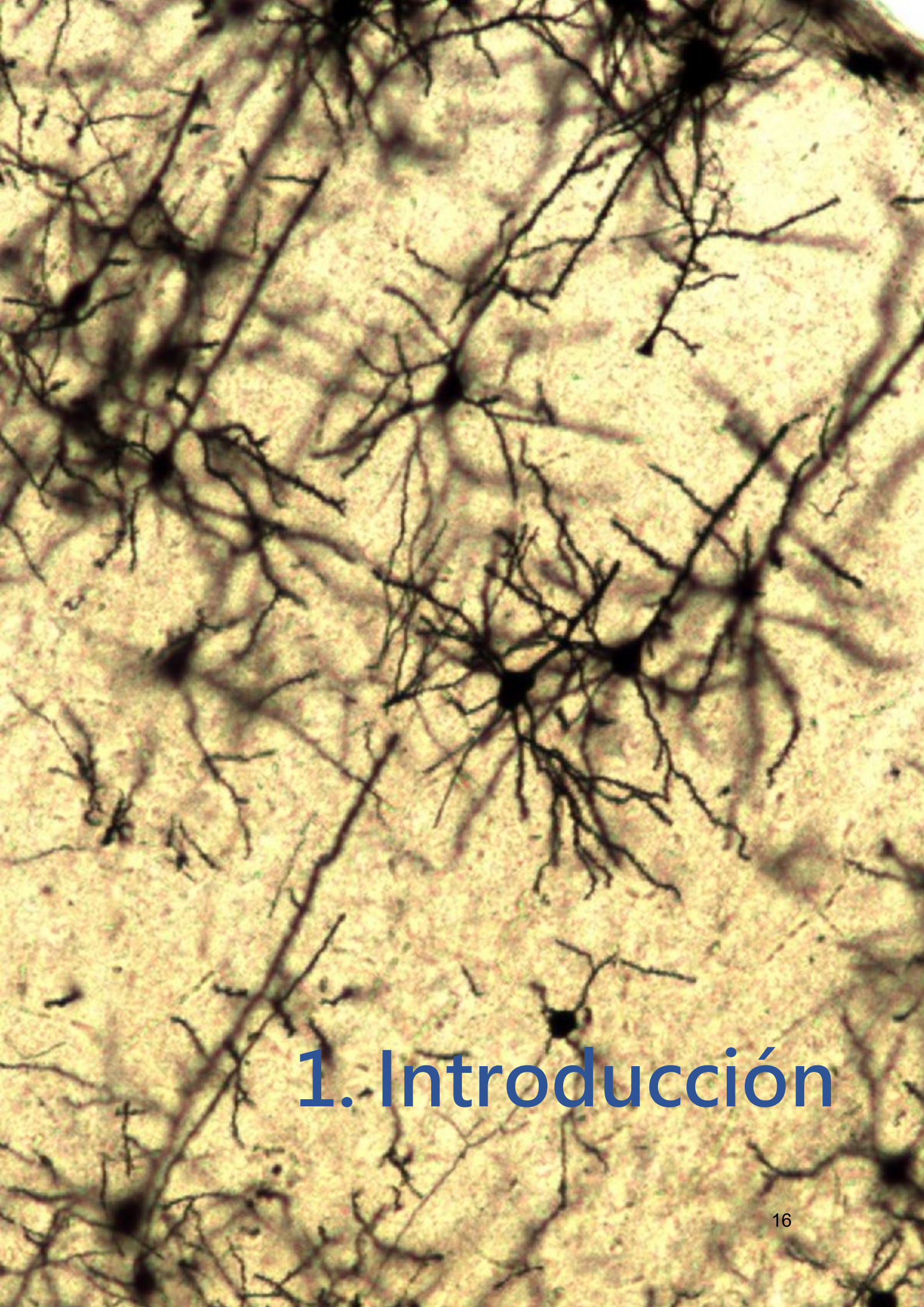
AhR is a ligand-activated transcription factor and, therefore, one reason for the observed increase in Cyp1B1 levels in both brain and liver could be an increase in

AhR agonists. For this reason, we decided to evaluate possible age-associated changes in their levels. Indeed, the AhR agonistic activity of the plasma of aged mice was higher than in the young mice.

In addition, in this Doctoral Thesis we have also shown that deletion of the AhR gene promotes the early appearance of phenotypic characteristics associated with brain aging, such as a decrease in cortical volume, a loss of the white matter integrity or motor and cognitive deficits. Likewise, AhR^{-/-} mice exhibit an acceleration of the “inflammaging” phenomenon and an increase in astroglial reactivity in aging.

Finally, we wanted to determine the possible role of AhR in a pathological aging setting, as in the case of AD. For this, we used APP^{NL-F} mice, in which the human gene for APP has been inserted with two mutations: the Swedish "NF" and the Iberian "L". The results presented in this Doctoral Thesis show, for the first time, that the administration of a diet rich in xenobiotics with AhR agonist activity accelerates the development of amyloid plaques, possibly due to chronic activation of this receptor. In addition, mice fed with this diet present an alteration in working memory that does not appear in their controls.

The set of results presented in this Doctoral Thesis indicates that AhR, as well as other mediators in its signalling pathway, suffer changes throughout the age. In addition, our data suggest that receptor regulation is essential in physiological aging and that changes in this regulation may contribute to and/or accelerate the appearance of pathological features.



1. Introducción

1.1. Concepto de envejecimiento

Se denomina envejecimiento al proceso biológico que se da en la etapa final de la vida de un organismo. Aunque es difícil encontrar una definición universal de envejecimiento, se podría definir como una **pérdida de la integridad fisiológica** que conduce a un declive funcional, que se da con el paso del tiempo y que afecta a los organismos vivos (López-Otín et al. 2013). Bernard Stehler, un reconocido geriatra, propuso los siguientes postulados para definir los cambios asociados al envejecimiento: *1) Son **universales**, y están presentes, en algún grado, en todos los individuos de una misma especie; 2) Son **intrínsecos**, su causa debe ser endógena e independiente de factores externos; 3) Se producen de manera **progresiva**, a lo largo de la vida, apareciendo incluso, en menor medida, en los individuos jóvenes; 4) Son **deletéreos**, ya que reducen la funcionalidad y por tanto resultan perjudiciales para el individuo (Strehler and Mildvan 1960).* El envejecimiento es un proceso multifactorial que afecta en mayor o menor medida a todos los sistemas y niveles de organización biológica. Todas las células de nuestro organismo sufren las consecuencias de la edad, presentando cambios estructurales y funcionales que pueden variar para cada especie e incluso entre los individuos de una especie. En este sentido, es importante definir el concepto de **edad biológica**, que es el conjunto de parámetros biológicos de un organismo que, en ausencia de enfermedad, van a predecir mejor la capacidad funcional a una determinada edad que la propia edad cronológica (Baker III and Sprott 1988).

Es fundamental aclarar que la vejez en sí misma no es una enfermedad y que en ningún caso se puede evitar. Sin embargo, los cambios que acontecen durante el envejecimiento hacen al individuo más frágil y susceptible al entorno, siendo uno de los principales factores de riesgo para diferentes patologías (Vina, Borras, and Miquel 2007). Las investigaciones en el campo de los últimos años se han focalizado en entender los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a este proceso. El objetivo que se pretende alcanzar es el retraso de la aparición de los cambios

INTRODUCCIÓN

asociados al envejecimiento y, una vez que han aparecido, ralentizarlos lo máximo posible.

1.2. Datos poblacionales

Durante los últimos años la esperanza de vida se ha incrementado de forma espectacular. La clave de este aumento ha sido un descenso de la tasa de mortalidad, reflejo de los avances científicos en el campo de la salud y la mejora de los sistemas sanitarios. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que entre el 2000 y el 2050 la proporción de la población mayor de 60 años se duplicará, pasando del 11% al 22%. En números absolutos, este grupo pasará de 605 millones de personas a 2000 millones en medio siglo. En España, según el Instituto Nacional de Estadística (INE), en 2016 había 8.657.705 de personas por encima de los 65 años, y se calcula que para el 2066 habrá más de 14 millones, que supone un 34,6% de la población total (**Ver figura 1.1**). El género predominante en la vejez es el femenino, habiendo actualmente un 32,9% más de mujeres mayores que de hombres. Esto se debe a que la esperanza de vida de las mujeres es mayor.

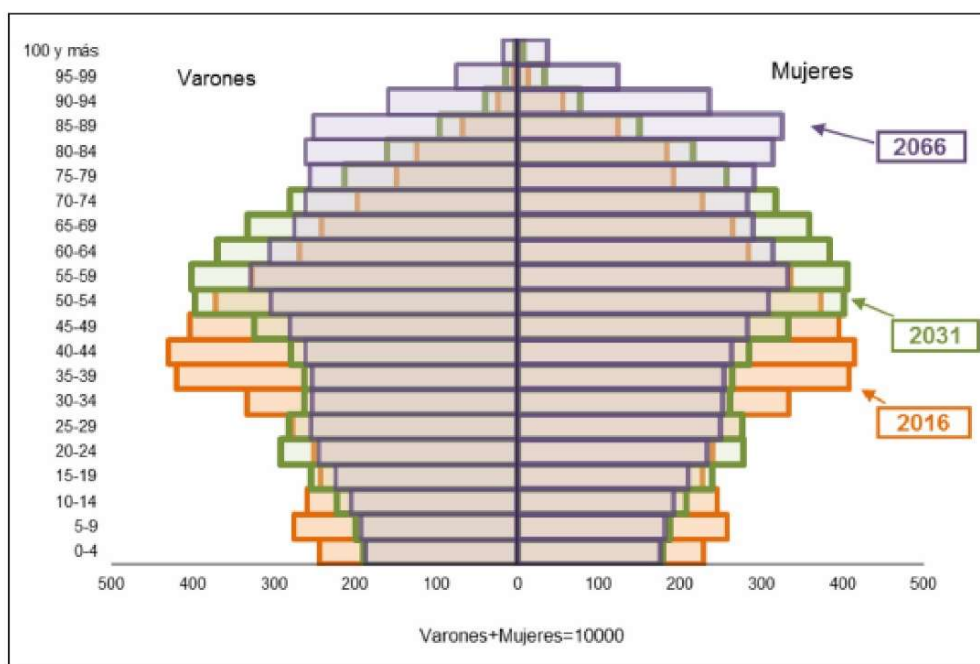


Figura 1.1. Pirámides poblacionales de España en 2016-2031-2066. Se espera un crecimiento de más de un 11% de la población mayor en las próximas cinco décadas (INE, 2016).

Si bien el incremento en la esperanza de vida puede considerarse un logro, también supone un coste socio-sanitario mayor y un reto para la comunidad

científica, puesto que se impone la necesidad de hallar estrategias para prevenir, tratar y curar las enfermedades crónicas asociadas a la edad y el deterioro fisiológico que acompaña al envejecimiento.

1.3. Características generales del envejecimiento cerebral fisiológico

Como hemos comentado, a medida que envejecemos, se produce un declive fisiológico que implica un aumento de la prevalencia de ciertas enfermedades. A continuación, se detallan algunos de los cambios fisiológicos que tienen lugar en la vejez (Finch 1976):

- Declive progresivo de los sentidos, como pérdida progresiva de la capacidad visual y auditiva.
- Pérdida de la elasticidad y la fuerza muscular.
- Disminución del colágeno de la piel que conduce a la aparición de arrugas.
- Degeneración de las estructuras óseas a causa de la disminución de calcio y otros minerales que conduce a una curvatura de la columna vertebral (cifosis).
- Aumento de la tensión arterial.
- Engrosamiento de la pared de las arterias que produce una disminución de la elasticidad arterial.
- Déficit en la respuesta inmunológica frente a patógenos.
- Pérdida de la capacidad regenerativa en los tejidos.

Todas las alteraciones que se dan a nivel molecular y celular en el envejecimiento acaban produciendo una pérdida de la homeostasis en los órganos y sistemas que, en último término, afecta a su función. Si bien es cierto que estos cambios afectan a todos los tejidos, no todos los tejidos son igual de vulnerables. El impacto del envejecimiento en el sistema nervioso central es especialmente dramático (Møller et al. 2010).

INTRODUCCIÓN

1.3.1. Cambios funcionales en el envejecimiento cerebral: declive cognitivo y motor

1.3.1.1. Declive cognitivo asociado a la edad

Durante el envejecimiento se produce un deterioro en las funciones cognitivas, que afecta principalmente a la memoria y a la velocidad de procesamiento de la información (Albert, Duffy, and Naeser 1987; Craik, Moscovitch, and McDowd 1994).

La memoria puede clasificarse, en función del tiempo de almacenamiento de la información, en memoria a corto plazo o memoria de trabajo y memoria a largo plazo (Atkinson and Shiffrin 1968). La **memoria de trabajo** es el almacenamiento temporal de la información necesaria para realizar una determinada tarea (Baddeley 1992). Las estructuras implicadas en este tipo de memoria son principalmente la corteza prefrontal y el hipocampo (Rypma et al. 1999; Nadel and MacDonald 1980), aunque también pueden contribuir otras regiones como el estriado o el cerebelo (Lewis et al. 2004; Desmond et al. 1997).

La **memoria a largo plazo**, que es la codificación y retención de la información durante un largo periodo de tiempo, puede a su vez dividirse en **memoria episódica** (almacenamiento de la información relativa a eventos vividos y a la relación espacio-temporal entre ellos), **memoria semántica** (almacenamiento de la información relativa a conceptos y palabras) y **memoria procedimental** (retención de habilidades motoras y ejecutivas necesarias para la realización de una tarea) (Tulving 1972).

Según un estudio longitudinal que evaluó a 106 individuos durante 16 años, el tipo de memoria que más se altera a lo largo de la edad es la memoria de trabajo (Zelinski and Burnight 1997). También se ha demostrado que la memoria espacial decae con el paso del tiempo en ratones (Bach et al. 1999), perros (Head et al. 1995), primates no humanos (Lai et al. 1995) y humanos (Montgomery et al. 2000). Sin embargo, la memoria a largo plazo se preserva bien a lo largo del envejecimiento normal (Yankner, Lu, and Loerch 2008).

1.3.1.2. Declive motor asociado a la edad

Junto con el deterioro cognitivo, en la vejez también se produce un deterioro a nivel motor caracterizado por la **pérdida de fuerza muscular, la disminución del equilibrio y problemas de coordinación**, que se manifiestan con dificultades en la marcha (Seidler et al. 2010; Contreras-Vidal, Teulings, and Stelmach 1998).

Estas alteraciones motoras son consecuencia de disfunciones tanto en el SNC como en la unión neuromuscular (Buckles 1993). Se ha descrito que en el envejecimiento se produce una atrofia del cerebelo y de las regiones motoras de la corteza (Seidler et al. 2010), así como una pérdida progresiva de los circuitos de los ganglios basales (Hubble 1998). No obstante, los déficits motores no se deben únicamente a cambios a nivel del sistema nervioso central. A nivel periférico, la unión neuromuscular también sufre alteraciones con la edad y los músculos experimentan un declive anatómico y funcional que se denomina sarcopenia (Rygiel, Picard, and Turnbull 2016).

1.3.2. Cambios estructurales en el cerebro envejecido

El cerebro de una persona joven difiere del de una persona mayor a todos los niveles, desde el celular al anatómico (Raz 2004), y este declive funcional es el reflejo de las alteraciones macroscópicas y microscópicas que se producen en esta estructura durante el envejecimiento.

El cambio anatómico más destacado en el cerebro envejecido es una **disminución del volumen** y del peso cerebral, que afecta tanto a la sustancia blanca como a la sustancia gris. Para evaluar estas dos variables, se han realizado numerosos estudios transversales en cerebros post-mortem (Piguet et al. 2009; Coleman and Flood 1987). Sin embargo, los datos más fiables derivan de estudios longitudinales con imagen por resonancia magnética (IRM) (Scahill et al. 2003). En el humano, el volumen del cerebro empieza a disminuir a los 20 años de forma progresiva (Svennerholm, Boström, and Jungbjer 1997). A partir de los 50 años de edad, la reducción del volumen global del cerebro por década es del 2% (Takao, Hayashi, and Ohtomo 2012). La disminución del volumen cerebral se acompaña de un aumento de los surcos cerebrales y una disminución de las circunvoluciones,

INTRODUCCIÓN

junto con un incremento en el volumen ventricular, especialmente marcada en los ventrículos laterales (Coffey et al. 1992a; Brody 1992).

Los cambios volumétricos a nivel global implican necesariamente cambios locales. No todas las estructuras cerebrales presentan igual afectación con el envejecimiento. Las estructuras cerebrales que presentan mayor reducción de volumen con la edad son el hipocampo, el cuerpo estriado, el cerebelo y ciertas regiones corticales, siendo el córtex prefrontal la región más reducida (Raz et al. 2005). No obstante, los cambios presentan importantes variaciones interindividuales.

El gran avance en las técnicas de imagen ha permitido progresar enormemente en el conocimiento de las características del cerebro envejecido. Esto tiene una gran importancia puesto que nos permite distinguir y diagnosticar aquellas variaciones que ocurren en un envejecimiento patológico frente aquellos cambios que tienen lugar en un envejecimiento normal. Cabe destacar que, en ciertos casos como en la enfermedad de Alzheimer (EA), los cambios patológicos son una acentuación y/o aceleración de los procesos que acontecen en el envejecimiento normal (Schuff et al. 2009; Hickie et al. 2005).

Los cambios morfológicos del cerebro a lo largo de la edad son producto de las modificaciones que se producen a nivel histológico y que se describen a continuación.

1.3.3. Cambios a nivel celular

1.3.3.1. Neuronas

Las primeras investigaciones sobre neurodegeneración y envejecimiento sugerían una pérdida neuronal a lo largo de la edad en corteza e hipocampo (O'Banion, Coleman, and Callahan 1994). Sin embargo, estudios posteriores con contajes estereológicos mostraron que la magnitud de la pérdida se había sobrestimado y que tenía escasa correlación con los déficits funcionales (Burke and Barnes 2006).

Actualmente, los estudios de neurodegeneración se centran en la morfología, plasticidad y conectividad de las neuronas más que en su número (Wiśniewski and

Terry 1973). En un contexto no patológico, los cambios en la morfología neuronal causados por la edad son sutiles y no se rigen por un único patrón, y difieren según la región cerebral estudiada. Mientras que en el hipocampo no se han detectado alteraciones morfológicas significativas a lo largo del envejecimiento (Flood 1993; Curcio and Hinds 1983), en las neuronas piramidales de la corteza se observa una reducción de la longitud y ramificación dendrítica, así como una disminución del área del soma tanto en humanos como en roedores (De Brabander, Kramers, and Uylings 1998; Markham and Juraska 2002; Peinado et al. 1997).

Probablemente los cambios neuronales más drásticos sean a nivel de plasticidad sináptica. En roedores, la edad produce, en el hipocampo, una menor respuesta neuronal en la señalización por los receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) que conduce a alteraciones en la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) y que se correlaciona con una deficiencia en la consolidación de la memoria (Barnes 2003). Además, con la edad se produce una reducción del número de sinapsis en hipocampo junto con alteraciones de las espinas dendríticas que contribuyen a los déficits cognitivos asociados a la edad (Gureviciene, Gurevicius, and Tanila 2009)

A nivel histológico, probablemente el cambio más llamativo que se produce en las neuronas durante el envejecimiento es la acumulación de los denominados depósitos de lipofucsina y la agregación de proteínas en el citoplasma (Keller et al. 2004). Los depósitos de lipofucsina son gránulos compuestos principalmente por polímeros lipídicos derivados de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas subcelulares y que no han sido degradados eficientemente en el lisosoma (Terman and Brunk 2004). Aunque el componente lipídico es mayoritario, también pueden contener proteínas oxidadas y trazas de hierro, y se cree que pueden ser perjudiciales para las funciones celulares (Brunk and Terman 2002). Las agregaciones proteicas que aparecen en el envejecimiento ocurren principalmente como consecuencia de modificaciones post-traduccionales, como la oxidación de proteínas (Keller et al. 2004). Se ha sugerido que esta oxidación puede contribuir a su mal plegamiento, incrementar su hidrofobia haciéndolas más insolubles y alterar la ratio de degradación (Agarwal

INTRODUCCIÓN

and Sohal 1994; Davies 1987). Además, los agregados proteicos también son resultado de una pérdida de la homeostasis proteica, como se comentará más abajo. Es importante destacar que enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Huntington o la EA comparten una característica común: la acumulación de agregados proteicos (Ross and Poirier 2004).

1.3.3.2. Células gliales

Durante un tiempo se asumió que los cambios en la glía eran secundarios a la neurodegeneración. Sin embargo, las alteraciones en estas células ocurren en las etapas más tempranas del envejecimiento en ausencia de un contexto patológico (Finch 2003).

La **sustancia blanca** sufre grandes cambios con el envejecimiento y se ha estimado que se puede llegar a perder un 11% de su volumen con el paso del tiempo (Haug and Eggers 1991). En humano, el número de oligodendrocitos puede llegar a reducirse hasta un 30% durante el envejecimiento (Fabricius, Jacobsen, and Pakkenberg 2013).

Los **astrocitos** son los responsables del mantenimiento de la homeostasis del SNC y, por lo tanto, su función tiene una enorme importancia en la vejez puesto que, como se ha mencionado con anterioridad, en esta etapa de la vida la homeostasis de los tejidos está gravemente comprometida. En el envejecimiento fisiológico, el número de células astrocitarias no varía (Soreq et al. 2017). Tradicionalmente se ha creído que los astrocitos tienden con la edad a polarizarse hacia un fenotipo más reactivo. La **reactividad glial** (o activación glial) es la respuesta de las células gliales a cualquier estímulo perjudicial para el SNC (Sofroniew 2005). Para el estudio de la activación astrocitaria, uno de los marcadores que más se ha usado es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés). Aunque, a nivel global, se produce un aumento con la edad en los niveles de expresión de GFAP en el cerebro (Morgan et al. 1997; Nichols et al. 1993), hay regiones donde los estudios de la densidad del marcador han arrojado resultados controvertidos. En hipocampo, se ha observado tanto un aumento (Diniz et al. 2010) como un descenso en la expresión de GFAP (Cerbai et al. 2012). Los estudios en corteza son menos numerosos que los realizados en hipocampo, pero

los datos parecen apuntar a un aumento del marcaje con GFAP en los animales envejecidos (Amenta et al. 1998). Lo más probable es que, al igual que los cambios neuronales, los cambios en los astrocitos se regulen a nivel local y difieran de unas regiones a otras.

La primera línea de defensa del SNC es la **microglía**, que son los macrófagos residentes del tejido nervioso (Perry and Teeling 2013). Las células microgliales vigilan constantemente el microambiente que las rodea y reaccionan ante cualquier estímulo potencialmente perjudicial (Chen, Zhang, and Huang 2016). Por lo tanto, su correcto funcionamiento es vital para la protección y el mantenimiento del tejido. Al igual que sucedía con los astrocitos, no parece que la edad afecte al número total de células microgliales (Long et al. 1998). La mayoría de estudios sobre los cambios de la microglía asociados a la edad han revelado un aumento en la expresión de los marcadores característicos de la activación microglial (DiPatre and Gelman 1997; Rogers et al. 1988), como el MHC II (complejo mayor de histocompatibilidad de clase II) (Perry, Matyszak, and Fearn 1993). Además del aumento en la expresión de marcadores reactivos, las células de la microglía también sufren cambios morfológicos en el envejecimiento (Conde and Streit 2006). La microglía del cerebro envejecido se caracteriza por una hipertrofia del citoplasma, una desramificación, la formación de esferoides citoplasmáticos y una fragmentación y tortuosidad de los procesos (Streit et al. 2004). Estos cambios morfológicos se conocen bajo el término de distrofia microglial y, generalmente, una célula distrófica no presenta todos los cambios a la vez, sino uno o dos de ellos.

1.4. Características moleculares del envejecimiento.

Las investigaciones sobre el envejecimiento han revelado varias características moleculares y celulares distintivas que acontecen durante el envejecimiento y que cumplen los siguientes requisitos: 1) tienen lugar durante el envejecimiento normal; 2) su empeoramiento de forma experimental acelera el envejecimiento y 3) su mejoría lo retrasa e incrementa la esperanza de vida (López-Otín et al. 2013). Entre las características distintivas del envejecimiento más importantes a nivel molecular, podemos encontrar: la disfunción mitocondrial, la pérdida de la homeostasis

INTRODUCCIÓN

proteica, la inestabilidad genómica, el acortamiento telomérico, el estrés oxidativo, el agotamiento de los reservorios de células madre, senescencia/ inmunosenescencia y el proceso de inflammaging (**Figura 1.2**).

Disfunción mitocondrial: en los organismos de edad avanzada, se produce en las células una disfunción mitocondrial, causante de la acumulación de especies reactivas de oxígeno, que acaba teniendo un efecto perjudicial en las macromoléculas presentes en las células y que incluyen ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y azúcares (Reiter et al. 2001).

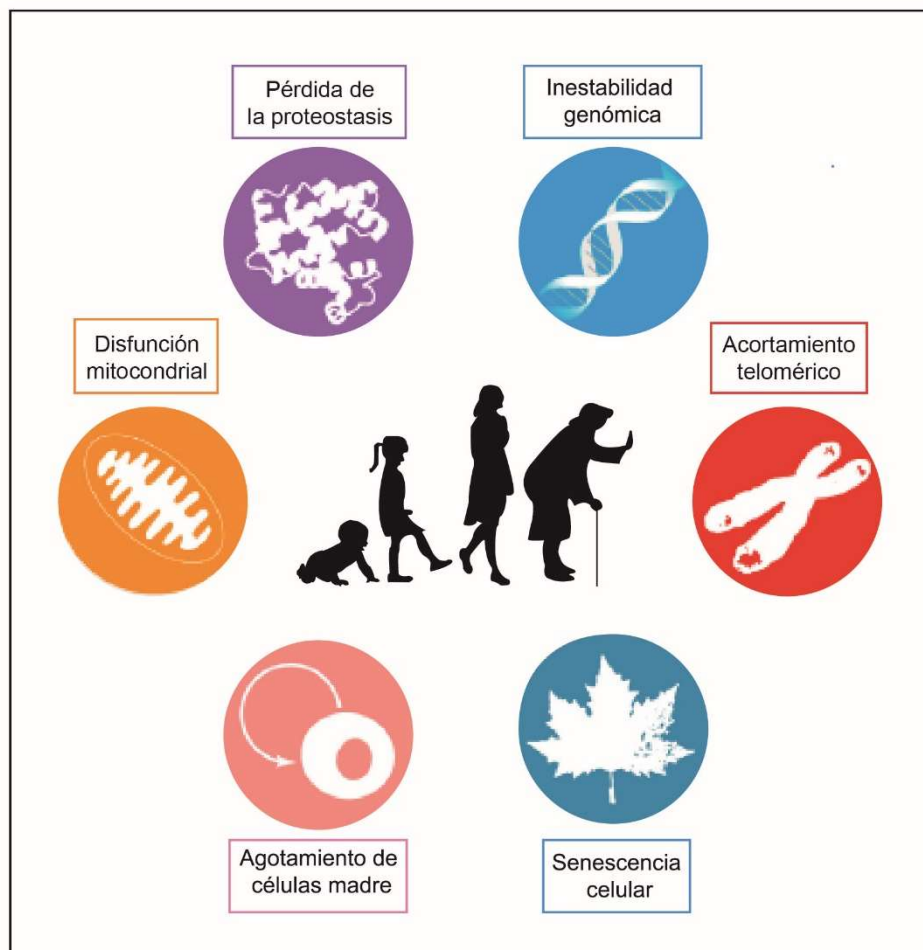


Figura 1.2. Marcadores del envejecimiento (Esquema adaptado de López-Otín, Blasco et al. 2013).

Pérdida de la homeostasis proteica: La homeostasis proteica o proteostasis consiste en el mantenimiento de la integridad en las vías que regulan la biogénesis, el plegamiento, el tráfico y la degradación de proteínas tanto en el interior de las células como en el medio extracelular. Con la edad, la habilidad de muchas células

y tejidos para mantener la proteostasis se ve comprometida (Kaushik and Cuervo 2015). Existen dos vías principales para la eliminación de proteínas: la autofagia celular mediada por chaperonas y la vía ubiquitina-proteosoma. Ambas vías sufren un declive en el envejecimiento (Tomaru et al. 2012; Rubinsztein, Mariño, and Kroemer 2011). Se ha demostrado que potenciar tanto la autofagia mediada por chaperonas como el sistema ubiquitina-proteosoma, que se describirá con mayor detenimiento más adelante, alarga la esperanza de vida en levaduras y en *C. elegans* y tiene un efecto detoxificador en células humanas (Lee et al. 2010; Kruegel et al. 2011; Vilchez et al. 2012; Zhang and Cuervo 2008).

Alteraciones en el DNA: La inestabilidad genómica es un denominador común del envejecimiento (Moskalev et al. 2013). EL ADN están constantemente sometidos a amenazas tanto exógenas como endógenas, que se acumulan a lo largo de la vida, promueven daño genómico y terminan comprometiendo la integridad del ADN (Moskalev et al. 2013). La acumulación de daño en el genoma afecta más a ciertas regiones cromosómicas que a otras. Entre las regiones más susceptibles están los telómeros, cuyo deterioro con la edad es especialmente marcado debido al fenómeno de **acortamiento telomérico** se produce por replicación incompleta de los cromosomas en la división celular (Blackburn, Greider, and Szostak 2006). Cuando éstos alcanzan un tamaño crítico, se desencadena en la célula una respuesta que desencadena la muerte de la célula por apoptosis (Artandi and Attardi 2005). La principal consecuencia de este proceso es el fenómeno de **senescencia celular**, que es la interrupción del ciclo celular, y el **agotamiento de células madre**, que limita la capacidad de regeneración de los tejidos (Campisi and di Fagagna 2007). Además del acortamiento telomérico, otros procesos pueden contribuir a la senescencia de una célula, como el daño genómico o el exceso de señales prometóticas que desencadenan respuestas de estrés celular (Collado, Blasco, and Serrano 2007). En los organismos envejecidos, el número de células senescentes es mayor que en los jóvenes y, por esta razón, se ha asociado este suceso al envejecimiento (López-Otín et al. 2013). Se ha observado que las células senescentes son propensas a secretar citoquinas proinflamatorias y

INTRODUCCIÓN

metaloproteasas de la matriz extracelular, lo que termina causando daños tisulares (Kuilman et al. 2010).

Las células del sistema inmune son especialmente susceptibles al fenómeno de senescencia. Este declive de las células inmunes se conoce como **inmunosenescencia**. Los cambios inmunológicos a lo largo de la edad son tan característicos que han llevado a la formulación de la **teoría inmunológica del envejecimiento** (Walford 1969). La inmunosenescencia se caracteriza por una involución del timo, un descenso en el número de precursores linfoides y de la capacidad proliferativa de los linfocitos T y una deficiencia en la respuesta antigénica de los linfocitos B (Malaguarnera et al. 2001). Sin embargo, los cambios que se producen en el sistema inmune no se limitan solamente al fenómeno de inmunosenescencia. Paralelamente, aparece un estado inflamatorio crónico que se denomina *inflammaging*.

1.4.1. Inflammaging

El denominado proceso de "*inflammaging*" se podría definir como un estado pro-inflamatorio de bajo grado característico del envejecimiento de los mamíferos (Salminen, Kaarniranta, and Kauppinen 2012).

La inflamación es una red compleja de interacciones moleculares y celulares que se desencadena en respuesta a un daño tisular de origen mecánico, infeccioso, post-isquémico, tóxico o autoinmune (Nathan 2002). Desde un punto de vista fisiológico, un proceso inflamatorio debe interpretarse como un intento de eliminar el estímulo perjudicial que lo ha originado (Henson 2005). La inflamación establece una conexión entre el sistema inmune innato y el adaptativo: las células de la **inmunidad innata** detectan y señalizan la presencia de daño, iniciando una cascada inflamatoria que, por un lado, frena al agente agresor y, por el otro, permite la activación específica del **sistema adaptativo**. Sin embargo, es esencial que la resolución del daño se efectúe de manera organizada y controlada para evitar una respuesta inflamatoria permanente y desmesurada. Cuando esto ocurre, la inflamación pierde su valor adaptativo y adquiere un carácter nocivo para el tejido (Medzhitov 2008). Esta inflamación, carente de un propósito aparente y con

consecuencias perjudiciales para el organismo, es la que se da durante el proceso de envejecimiento (Franceschi et al. 2000).

A medida que se envejece, se produce un incremento en los niveles séricos de varias **citoquinas proinflamatorias**, como la IL-6 (interleucina 6), TNF α (factor de necrosis tumoral α) y la IL-1 (interleucina 1), y otros mediadores de la inflamación (Michaud et al. 2013). Además, concentraciones elevadas de IL-6, TNF α y PCR (proteína C reactiva) se correlacionan con un aumento en el riesgo de comorbilidad y muerte en personas ancianas (Alley et al. 2007). Respecto a la IL-6, el incremento en sus niveles se ha asociado a un declive en la velocidad de la marcha (Verghese et al. 2011). Asimismo, los ancianos con dificultades en la realización de sus actividades diarias tienen mayores concentraciones plasmáticas de esta citoquina que los ancianos que no están impedidos (Katz et al. 1970). En lo que concierne a las comorbilidades, en la **tabla 1.1** se muestran los mediadores inflamatorios que se han asociado a cada fisiopatología (Michaud et al. 2013).

Aunque está ampliamente demostrado que existe una relación entre el envejecimiento y la inflamación, es difícil establecer una relación causal entre ambos procesos. Se han propuesto varias fuentes que podrían originar o contribuir al *inflammaging*, como son la eliminación deficiente de desechos celulares causados por una respuesta autofágica defectuosa, la propensión de las células senescentes a liberar factores pro-inflamatorios, la carga antigénica acumulada a lo largo de la vida que provoca la activación progresiva de las células del sistema inmune o la propia inmunosenescencia característica del envejecimiento (Franceschi and Campisi 2014).

Esta inflamación crónica da lugar a una regulación al alza de la ruta de NF κ B (factor nuclear kappa B). NF κ B es un factor de transcripción, presente en el citoplasma de la mayoría de tipos celulares, y que puede considerarse como el director de orquesta de la cascada inflamatoria. Su activación induce una batería de genes relacionados con la inflamación, como citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (Lawrence 2009). En los tejidos de organismos envejecidos, se produce un incremento en la unión de NF κ B al ADN y, de hecho, la sobreactivación de la vía de NF κ B se considera una huella transcripcional del envejecimiento (Helenius et al.

INTRODUCCIÓN

1996). Además, la inhibición farmacológica o genética de la señalización de NFkB previene características asociadas a la edad en diferentes modelos de envejecimiento prematuro en ratones (Osorio et al. 2012; Tilstra et al. 2012).

Citoquinas implicadas	Fisiopatología
Declive cognitivo: TNF α , IL-6, IL-1	Riesgo de enfermedad de Alzheimer Menor volumen hipocampal Activación microglial Estrés oxidativo
Envejecimiento vascular CRP, TNF α , IL-6	Activación endotelial Inhibición de la fibrinólisis Activación plaquetaria Actividad pro-trombótica Arteriosclerosis
Estado nutricional y metabólico TNF α , IL-6, IL-1, IFN γ	Aumento de la lipólisis y la proteólisis Disminución de la síntesis lipídica y proteica Aumento de las hormonas anorexigénicas Disminución de la capacidad de llenado gástrico Disminución de los movimientos peristálticos
Metabolismo óseo TNF α , IL-6	Aumento del remodelado y de la reabsorción ósea Disminución de la osteoclastogénesis Menor supervivencia de los osteoblastos
Metabolismo muscular TNF α , IL-6	Aumento del catabolismo muscular Estrés oxidativo Disminución de las miofibrillas

Tabla 1.1. Citoquinas asociadas a distintos rasgos fisiopatológicos que ocurren durante el envejecimiento (Michaud et al. 2013).

1.4.1.1 Neuroinflamación

El *inflammaging* es un proceso generalizado y que, por lo tanto, afecta a todo el organismo. Hay evidencias experimentales y clínicas que sugieren que la inflamación del SNC incrementa con la edad y que está asociada con el envejecimiento cognitivo y con una mayor vulnerabilidad a padecer enfermedades neurodegenerativas (Ownby 2010).

La neuroinflamación es una respuesta coordinada entre todos los tipos celulares del SNC frente a un estímulo potencialmente dañino. Tradicionalmente, se le ha dado una connotación negativa al término, asociándolo a la

neurodegeneración; sin embargo, el propósito inicial de la neuroinflamación es frenar y reparar el daño y, por lo tanto, tiene una función neuroprotectora (Stoll, Jander, and Schroeter 2002). No obstante, en ciertos contextos patológicos, la reactividad glial exacerbada y perdurable en el tiempo puede ser más perjudicial que beneficiosa y en **enfermedades neurodegenerativas**, como el Huntington, el Parkinson o la EA, está asociada a daño neuronal (Maragakis and Rothstein 2006).

La neuroinflamación crónica puede tener efectos deletéreos en las neuronas (Ransohoff 2016), además de producir una disminución en la síntesis y liberación de ciertos factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF1, por sus siglas en inglés), que son fundamentales para la plasticidad sináptica y la supervivencia neuronal (Ghosh, Carnahan, and Greenberg 1994; Di Benedetto et al. 2017).

Como se ha descrito en el apartado anterior, los cambios morfológicos en astrocitos y microglía parecen apuntar a una mayor reactividad glial en el envejecimiento. Además, los niveles basales de citoquinas proinflamatorias en cerebro, al igual que los niveles circulantes, incrementan al envejecer (Sparkman and Johnson 2008). La citoquina de la que más estudios se han realizado es la IL-6 debido, probablemente, a que su aumento a nivel sistémico durante el envejecimiento es muy llamativo (ver apartado de *inflammaging*). Los niveles de IL-6 aumentan en hipocampo, corteza y cerebelo durante la vejez (Ye and Johnson 1999). Aunque en un principio se pensó que el aumento de las concentraciones eran resultado del incremento de los niveles circulantes, a través de experimentos *in vitro* y *ex vivo* se ha demostrado que la IL-6 en los animales envejecidos se produce en el propio cerebro y que es secretada principalmente por astrocitos, microglía y células endoteliales (Prechel et al. 1996; Ye and Johnson 2001). Pese a que la síntesis se da mayoritariamente a nivel local, el aumento en los niveles de citoquina circulantes también parece influir en la función cerebral. Un estudio longitudinal demostró que los niveles circulantes altos de IL-6 en personas mayores se asociaban a un empeoramiento a largo plazo de las funciones cognitivas (Weaver et al. 2002). De hecho, está demostrado que las células endoteliales que forman la barrera

INTRODUCCIÓN

hematoencefálica (BHE) pueden secretar citoquinas al parénquima cerebral en respuesta a señales inflamatorias periféricas. Por lo tanto, es posible que las citoquinas circulantes estimulen la secreción de mediadores pro-inflamatorios en el cerebro a través de las células endoteliales (Reyes, Fabry, and Coe 1999).

Además de la IL-6, el TNF y la IL-1 presentan concentraciones más altas en el cerebro envejecido que en el cerebro joven (Terao et al. 2002; Weindruch et al. 2002). Normalmente, tras la aparición de un agente nocivo se desencadena una cascada inflamatoria, que se sigue de una liberación masiva de mediadores antiinflamatorios para frenar la respuesta inicial cuando ya se ha frenado el estímulo que la había desencadenado. Sin embargo, junto al aumento de citoquinas proinflamatorias, en el envejecimiento cerebral se produce un descenso en los niveles de IL-10, que tiene propiedades antiinflamatorias (Frank et al. 2006). Esta reducción de la IL-10 podría exacerbar la neuroinflamación asociada a la edad y predisponer a los individuos envejecidos a una respuesta inflamatoria persistente tras un estímulo dañino o estresante (Sparkman and Johnson 2008). En humanos, el descenso en las concentraciones cerebrales de IL-10 se ha asociado a una mayor vulnerabilidad a distintas enfermedades neurodegenerativas como la EA (De Luigi et al. 2001). Con todos estos datos se puede concluir que la neuroinflamación está estrechamente ligada al envejecimiento cerebral; sin embargo, queda por esclarecer si es causa o consecuencia.

1.5. Envejecimiento fisiológico vs patológico: Enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento

Las enfermedades neurodegenerativas son aquellas en las que se produce una degeneración progresiva de las células del sistema nervioso, y con ellas, de sus funciones. Estas enfermedades, hoy en día, constituyen un problema importante de salud cuya incidencia crece año a año debido, en parte, a un aumento de la esperanza de vida, puesto que la edad es el principal factor de riesgo (Heemels 2016). El envejecimiento no sólo hace que las personas sean más propensas a padecer dichas enfermedades, sino que además limita la capacidad de reparar el tejido dañado y proteger el que todavía no lo está.

Los primeros síntomas clínicos de las enfermedades neurodegenerativas pueden afectar a la función motora, como el Parkinson, o a la función cognitiva, como las demencias seniles o la enfermedad de Alzheimer.

1.5.1. Envejecimiento patológico: enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (o demencia senil de tipo Alzheimer) debe su nombre al médico alemán Alois Alzheimer que la describió por primera vez en 1906. La EA es una enfermedad neurodegenerativa cuyo principal factor de riesgo es la edad, y que se manifiesta con un deterioro cognitivo y una serie de síntomas conductuales y psiquiátricos, por los cuales se pierde la habilidad de realizar las actividades de la vida diaria (Cummings 2004).

La EA es la causa de demencia más frecuente. Según la Asociación Internacional de la Enfermedad de Alzheimer, en el año 2010 35,6 millones de personas sufrían la enfermedad. Dado que el principal factor de riesgo es la edad y que la población de personas mayores está aumentando vertiginosamente (ver apartado datos poblacionales) se estima que en el año 2050 las personas con EA llegarán a los 114,5 millones. Aunque entre el 90-95% de los casos de EA son esporádicos o de aparición tardía, existe una forma familiar de la enfermedad de Alzheimer de inicio precoz, con aparición de los primeros síntomas antes de los 60 años (Bertram, Lill, and Tanzi). Los genes implicados en estas formas de EA hasta la fecha son los de presenilina 1 (PS1), presenilina 2 (PS2) y la **proteína precursora del β -amiloide** (Harman 2006).

Los principales síntomas cognitivos de esta enfermedad son alteraciones de la memoria, incapacidad para procesar nueva información, pérdida de la capacidad de razonamiento, afasia (alteraciones del lenguaje), apraxia (deterioro de la capacidad para llevar a cabo actividades motoras), agnosia (fallo en el reconocimiento de estímulos previamente aprendidos) y desorientación espacial (Garcia-Alloza et al. 2004). A nivel psiquiátrico pueden padecer síntomas depresivos, ansiedad, ideas delirantes y comportamiento agresivo (Ravetz 1999). Además pueden presentar alteraciones del sueño y del apetito (Bliwise 1993).

INTRODUCCIÓN

1.5.1.1. Fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer

La fisiopatología de la EA incluye pérdida sináptica, muerte neuronal selectiva, descenso en los niveles de ciertos neurotransmisores y presencia anormal de agregados proteicos en las neuronas (ovillos neurofibrilares) y en el espacio extrasináptico (placas neuríticas, seniles o amiloides) (Masters et al. 2015). Actualmente no se conoce la causa de la enfermedad; no obstante, a partir de los rasgos patológicos, se han propuesto dos hipótesis, la hipótesis colinérgica y la amiloidea

a) Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica se propuso en 1976 a partir de ciertas observaciones que apuntaban a un déficit en el **sistema colinérgico** (Francis et al. 1999). Estas observaciones consistían en un déficit cortical en la colina acetil transferasa, enzima responsable de la síntesis de la acetilcolina (ACh, por sus siglas en inglés); una reducción de la recaptura de colina y de la liberación de ACh y una pérdida de las neuronas colinérgicas en los núcleos basales de Meynert (Bowen et al. 1976; Perry et al. 1977; Whitehouse et al. 1982). Esta hipótesis está respaldada por el papel modulador de la ACh en los procesos de aprendizaje y memoria (Gais and Schönauer 2017). Estos datos abrieron las puertas al tratamiento de los pacientes con EA con inhibidores de la acetilcolinesterasa (ICE) y, de hecho, a día de hoy, son los únicos fármacos aprobados para la EA junto con la memantina (un antagonista del receptor NMDA). Sin embargo, el tratamiento con ICE es sintomático y sus efectos son transitorios, probablemente porque no actúan sobre el origen de la enfermedad (Dominguez and De Strooper 2002).

b) Hipótesis amiloidea

Existe cada vez un mayor consenso en que la acumulación de A β en el cerebro es la piedra angular de la patogénesis de la EA y que la degeneración colinérgica es un proceso secundario causado por los efectos tóxicos de las placas neuríticas (Hardy and Selkoe 2002). La hipótesis amiloide sostiene que en los enfermos de Alzheimer se produce un desequilibrio entre los niveles de producción y de eliminación de los **péptidos amiloides** (Mawuenyega et al. 2010).

La proteína precursora amiloide (APP por sus siglas en inglés) es una proteína transmembrana presente en neuronas y en muchos otros tipos celulares (O'Brien and Wong 2011). Aunque no se conoce su función neuronal, se cree que podría estar implicada en la plasticidad sináptica (Klevanski et al. 2015).

El fragmento extracelular carboxiterminal de APP se metaboliza por tres proteasas distintas (α , β y γ -secretasas) y, dependiendo de las enzimas que actúen en el metabolismo, se generan péptidos amiloides de longitudes entre 38 y 43 aminoácidos (siendo las formas mayoritarias las de 40 - $A\beta_{40}$ - y 42 - $A\beta_{42}$ - aminoácidos) y con diferentes características (**figura 1.3**) (Murphy and LeVine III 2010). Los péptidos β -amiloides son el principal componente de las **placas neuríticas** (Harman 2006). De hecho, las mutaciones conocidas que dan lugar a la **EA familiar** inducen la sobreproducción de $A\beta$, especialmente la isoforma $A\beta_{42}$, que es el producto proteolítico mayoritario en las placas por su alta hidrofobia y capacidad de agregación (Murphy and LeVine III 2010). Estas mutaciones se localizan en genes que están relacionados con el metabolismo de APP, como las subunidades catalíticas del complejo γ -secretasa, la PS1 y la PS2, o en el gen de la propia proteína precursora de amiloide. Los monómeros de β -amiloide son liberados al espacio extracelular donde primero forman oligómeros que acaban uniéndose entre sí, formando agregados mayores que dan lugar a las placas neuríticas (Selkoe 1991).

Si bien la formación de placas neuríticas en los casos familiares de EA se produce por un incremento en la producción de péptidos amiloides, los mecanismos que subyacen a la acumulación de $A\beta$ en los casos esporádicos no se han determinado todavía. Normalmente, los niveles de $A\beta$ generados en cerebro son elevados pero la cinética de lavado es equivalente a la de producción (Bateman et al. 2006). El aumento en la generación, incluso cuando es moderado, o la disminución de lavado de $A\beta$ conduce a un rápido aumento de sus niveles que puede favorecer la deposición de placas amiloides (Lee and Landreth 2010). Se ha demostrado que los enfermos de Alzheimer, incluso en las fases más tempranas, presentan una reducción en la tasa de eliminación de $A\beta$ (Mawuenyega et al. 2010). También hay evidencias de una disfunción microglial en la degradación de los

INTRODUCCIÓN

péptidos amiloides, lo cual podría contribuir a su acumulación en placas (Krabbe et al. 2013).

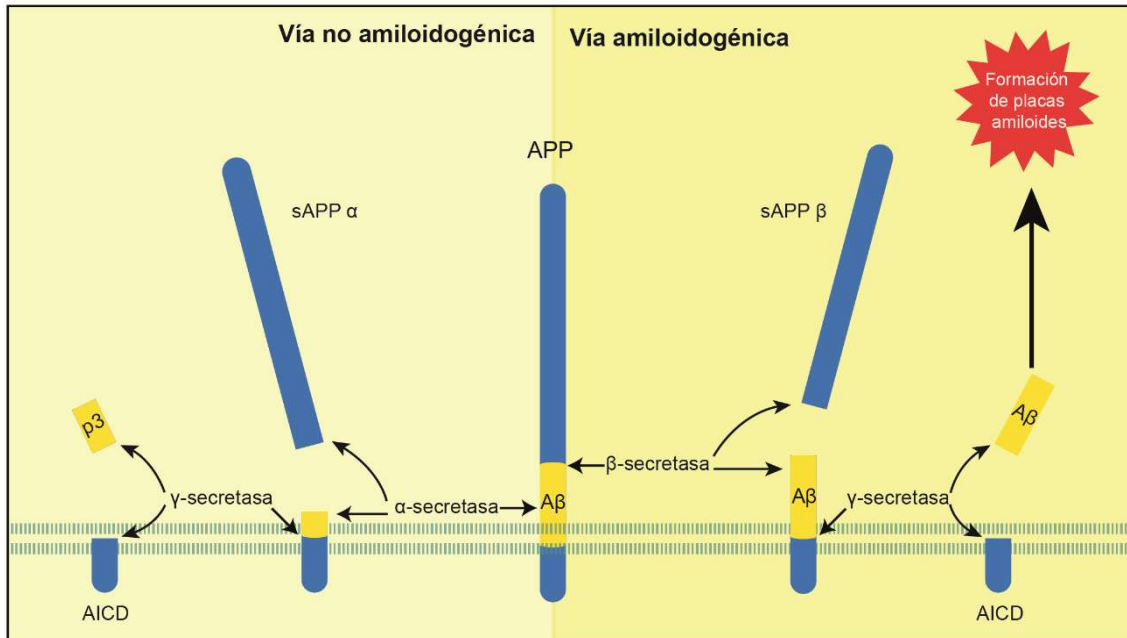


Figura 1.3. Proteólisis de la proteína precursora amiloide. El primer corte que se produce en la proteólisis de APP es en el dominio extracelular de la proteína. Este corte puede darse por dos enzimas: la α -secretasa y la β -secretasa. Cuando el corte lo efectúa la primera, se desencadena la vía no amiloidogénica. La α -secretasa corta por el aminoácido 17 de la secuencia A β , secretando al espacio extracelular el fragmento sAPP α , un péptido largo procedente del dominio N-terminal. Después, la γ -secretasa corta el dominio C-terminal que queda asociado a la membrana, dando lugar al fragmento p3 y al dominio intracelular de APP (AICD). En la vía amiloidogénica, la primera enzima en cortar es la β -secretasa, que lo hace en el primer o undécimo residuo de la secuencia A β , liberando al exterior celular el fragmento sAPP β . Tras este primer corte, la acción de la γ -secretasa da lugar al AICD y a A β , que se secreta al espacio extracelular.

Generalmente, la deposición de placas precede a la de ovillos neurofibrilares, detectándose primero en el lóbulo temporal medial y en la región ventral del lóbulo frontal (en hipocampo y regiones del sistema límbico) y extendiéndose después a otras áreas del neocórtex (figura 1.4) (Masters et al. 2015).

1.5.1.4. Otras características fisiopatológicas

Actualmente, hay evidencias sustanciales de que la proteína Tau y la apolipoproteína E (APOE) están involucrados en el desarrollo la enfermedad (Corder et al. 1993; Alonso et al. 2008). La APOE es una proteína implicada en el catabolismo de lipoproteínas, cuyo gen se localiza en el cromosoma 19 y tiene tres variantes alélicas: APOE2, con un 7% de prevalencia, APOE3, con un 78%, y APOE4, con un 15% (Saunders et al. 1993). Esta última variante representa el mayor riesgo genético para en los casos de aparición tardía de EA, pudiendo llegar a incrementar el riesgo de padecer la enfermedad hasta 12 veces con la presencia en ambos alelos (Farrer et al. 1997). La APOE está presente en las placas amiloides y en los ovillos neurofibrilares (Namba et al. 1991). En el cerebro, los niveles de APOE son altos y la síntesis se realiza principalmente en astrocitos y microglía. Los mecanismos a través de los cuales esta proteína podría estar contribuyendo a la enfermedad han sido objeto de investigación en los últimos años. En modelos animales de Alzheimer, APOE4 no interfiere en la producción de péptidos amiloides, pero sí puede contribuir a su agregación (Masters et al. 2015). APOE tiene la capacidad de unirse a A β y se ha sugerido que esta unión podría contribuir a la formación de las placas amiloides (Bales et al. 1999) e interferir en su lavado (Holtzman 2001).

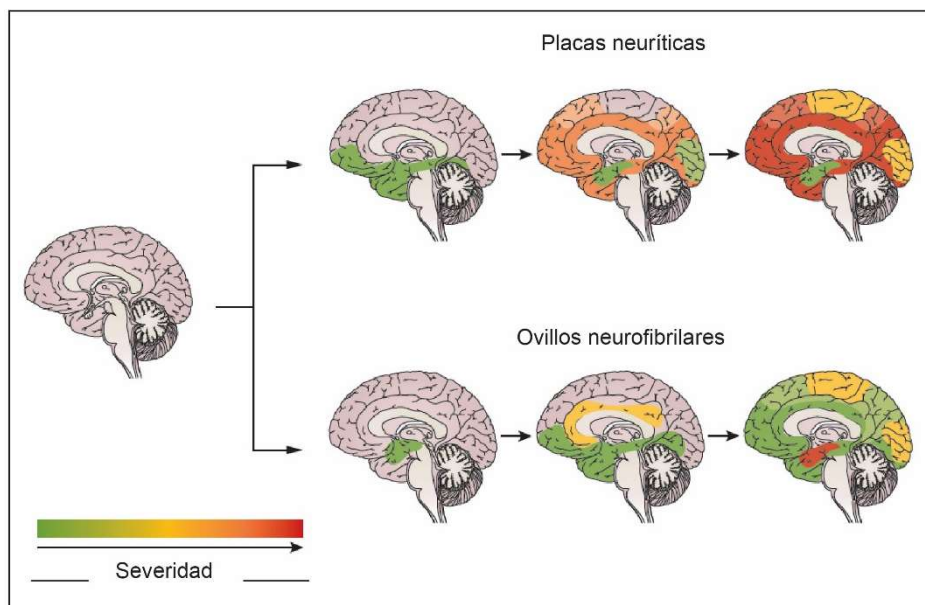


Figura1.4. Evolución de la patología de la EA (figura adaptada de Masters et al. 2015)

INTRODUCCIÓN

La agregación de Tau, una proteína asociada a microtúbulos con niveles altos de expresión en el SNC, es una característica común a varias enfermedades neurodegenerativas conocidas como **taupatías**. Se ha observado que la formación de estos agregados contribuye a la neurodegeneración en la EA (Ballatore, Lee, and Trojanowski 2007). Varios estudios han demostrado que tanto la cantidad de Tau total como de la forma fosforilada está incrementada en el parénquima cerebral y en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes (Ryman et al. 2014). Sin embargo, los mecanismos por los cuales se produce este aumento no se han dilucidado todavía.

1.6. Factores que pueden aceleran el envejecimiento y/o aumentar la predisposición a sufrir un envejecimiento patológico

Los mecanismos del envejecimiento normal pueden verse alterados tanto por factores extrínsecos como intrínsecos, que pueden contribuir a la aparición de enfermedades neurodegenerativas (L Woodard et al. 2012).

1.6.1. Factores intrínsecos: modelos animales de envejecimiento prematuro

La investigación con animales de experimentación ha permitido crear una amplia base de datos genómica que, a lo largo de los años, ha proporcionado una gran cantidad de información sobre los fenotipos asociados a determinadas mutaciones o variantes alélicas. Estos conocimientos, junto al avance en la manipulación genética en ratón, han dado lugar a una serie de modelos animales de envejecimiento prematuro asociados a un determinado genotipo.

Los fenotipos asociados a los distintos genes han contribuido al conocimiento de factores intrínsecos y rutas de señalización implicados en la pérdida de la homeostasis fisiológica que se da en el envejecimiento. De hecho, muchos de estos genes participan en los mismos procesos, como la regulación del ciclo celular o el mantenimiento y reparación del ADN (Harkema, Youssef, and de Bruin 2016).

En prácticamente todos estos modelos genéticos se produce una disminución de la esperanza de vida de los animales (Harkema, Youssef, and de Bruin 2016). Además, hay una serie de características que se repiten en muchos de ellos, como la aparición temprana de cifosis, alopecia, pérdida de peso, prolapso rectal, hipertrofia cardíaca y reducción de la fertilidad, entre otras (Trifunovic et al. 2004;

Kuro-o et al. 1997). Uno de los modelos más recientes es el de $\text{NF}\kappa\text{B}^{-/-}$, que resulta especialmente interesante en el contexto del *inflammaging*. Estos ratones presentan un amplio rango de características asociadas al envejecimiento a partir de los 10-12 meses, como un aumento de la senescencia celular, una mayor inflamación y un incremento de la reactividad glial (Bernal et al. 2014). A nivel del SNC, el denominador común de todos los modelos es precisamente la reactividad de astrocitos y microglía (Harkema, Youssef, and de Bruin 2016). Sin embargo, en muchos de estos modelos suelen aparecer rasgos que, más que asemejarse a las características de un envejecimiento fisiológico, son característicos de ciertas enfermedades neurodegenerativas. Este es el caso de los ratones $\text{Xpg}^{-/-}$, cuyas neuronas de Purkinje del cerebelo empiezan a degenerar hacia los 14 meses (Barnhoorn et al. 2014), o de los ratones $\text{Ercc1}^{-/\Delta}$, que presentan una pérdida selectiva de motoneuronas y una denervación de los músculos esqueléticos (de Waard et al. 2010).

En este sentido, es importante tener en cuenta que los ratones usados en los distintos modelos de envejecimiento prematuro suelen presentar una o varias características asociadas a la edad, pero también muestran rasgos que no se dan en el envejecimiento normal del ratón, por lo que hay que ser cuidadoso a la hora de interpretar los resultados obtenidos a través de ellos (Köks et al. 2016).

1.6.2. Factores exógenos

Además de los factores intrínsecos del organismo, los **factores ambientales** pueden ser determinantes en la forma de envejecer. La asociación entre ciertos hábitos de vida, tales como el sedentarismo, fumar o una dieta poco equilibrada, con el riesgo de padecer enfermedades cardiorrespiratorias en la vejez está fuertemente establecida (Jackson et al. 2009). En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, las investigaciones de los últimos años también apuntan a un papel fundamental del ambiente tanto en la aparición como en el desarrollo de la enfermedad (Heneka, Kummer, and Latz 2014; Hamer and Chida 2009).

Como para la mayoría de enfermedades neurodegenerativas, el mayor factor de riesgo para los casos esporádicos de EA es la edad (Hung et al. 2010). Sin embargo, se han realizado varios estudios intentando esclarecer si otros factores

INTRODUCCIÓN

pueden contribuir a la aparición de la enfermedad. Así, se sabe que la incidencia de EA es mayor en mujeres (Mielke, Vemuri, and Rocca 2014), en personas fumadoras (Durazzo, Mattsson, and Weiner 2014) y en personas con un nivel educativo bajo (Launer et al. 1999).

En los últimos años ha surgido un enorme interés en determinar si la exposición a la **contaminación ambiental** puede hacernos más vulnerables a padecer EA, así como otras enfermedades neurodegenerativas. Los efectos nocivos que ejercen las moléculas procedentes de la contaminación en enfermedades cardiovasculares o en algunos tipos de cáncer están bien establecidos. Actualmente, un creciente número de observaciones parecen indicar que la exposición a este tipo de partículas puede actuar también a nivel del SNC, acelerando el envejecimiento cognitivo e incluso aumentando el riesgo de padecer EA (Underwood 2017).

Los primeros indicios de la relación entre contaminación y demencia provienen de estudio sobre perros “dementes” en la Ciudad de México. La Dra. Calderón-Garcidueñas observó que los perros viejos que habitaban en áreas particularmente contaminadas presentaban síntomas de confusión y desorientación. El examen de los cerebros tras su muerte reveló depósitos más extensos de A β que en los cerebros de los perros que habían vivido en ciudades menos contaminadas (Calderón-Garcidueñas et al. 2008).

La mayoría de estudios epidemiológicos sobre la relación entre demencia y contaminación se han realizado utilizando el PM_{2.5} que indica la cantidad de partículas en suspensión menores a 2.5 μ m. En 2017, un estudio en Ontario, Canadá, reveló que la incidencia de demencia es mayor en zonas cercanas a grandes carreteras y autopistas con PM_{2.5} altos (Chen et al. 2017). En el mismo año, se publicó un análisis epidemiológico, realizado a lo largo de 11 años en E.E.U.U., en el que se observó que en las mujeres mayores de 65 años residentes en zonas con valores de PM_{2.5} por encima de 12 μ g/m², las posibilidades de padecer algún tipo de demencia aumentan casi el doble (Cacciottolo et al. 2017). En este mismo estudio se demostró que, en ratones modificados genéticamente que presentan deposición de placas, la exposición a PM_{2.5} aceleraba la formación de oligómeros amiloides.

Los niveles altos de $PM_{2.5}$ están generalmente acompañados de otro tipo de contaminantes ambientales, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos e hidrocarburos aromáticos halogenados (PAH y HAH, respectivamente, por sus siglas en inglés) (Xing et al. 2017). Es muy posible, por lo tanto, que este otro tipo de contaminantes ambientales contribuya a estos procesos.

El conjunto de datos obtenidos en estos estudios sugiere que los niveles altos de contaminación pueden contribuir al desarrollo de demencias. Sin embargo, es necesario continuar la investigación en el campo para determinar una relación causal entre ambos factores.

INTRODUCCIÓN

1.7. El Receptor de Hidrocarburos Aromáticos: perspectiva histórica

Bajo el término de **xenobióticos** se agrupan todos aquellos compuestos químicos que pueden encontrarse en un organismo siendo su procedencia ajena al mismo. Entre estos compuestos se encuentran los PAHs y los HAHs, presentes en pesticidas, disolventes y muchos otros productos químicos derivados de procesos industriales y que son una de las principales fuentes de contaminación ambiental y enormemente perjudiciales para la salud (Beischlag et al. 2008).

A lo largo de la historia, ha habido varios casos de exposición accidental a PAH/HAHs. El primer caso registrado fue en 1949, en una planta química de la empresa *Monsanto*, en Virginia del Este, donde se produjo la liberación accidental de PAH/HAHs, incluyendo la de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), la dioxina más potente (Schechter et al. 2006). Esta fuga provocó varios casos de cloracné, una dolorosa y desfigurante enfermedad de la piel que cursa con comedones, pústulas y abscesos (Ju, Zouboulis, and Xia 2009). Además, entre las personas afectadas por el TCDD también hubo casos de disfunción hepática, neuropatía periférica y trastornos metabólicos (Zack and Suskind 1980).

Probablemente el caso más sonado de exposición a PAH/HAHs fue con el agente naranja utilizado en la operación "*Ranch Hand*" durante la guerra de Vietnam. Como parte de su programa de guerra química, EEUU utilizó este compuesto con el fin de atacar los cultivos y deforestar los bosques. El agente naranja era una mezcla 1:1 de 2 herbicidas: el 2,4,5-triclorofenoxiacético y el 2,4-diclorofenoxiacético, el primero de los cuales estaba contaminado con TCDD. En 1964, *Dow Chemicals*, una de las empresas encargadas de sintetizar el agente naranja, informó de los posibles peligros de esta sustancia tras la aparición de cloracné en varios de sus empleados que habían estado en contacto con el compuesto. Sin embargo, el agente naranja siguió esparciéndose hasta 1971 por los campos y bosques vietnamitas dejando terribles secuelas tanto entre la población vietnamita como en los soldados estadounidenses.

En 1976, se produjo un escape de TCDD en otra planta química; esta vez en Seveso, Italia. Cantidades cercanas al kilogramo de TCDD y otras dioxinas se dispersaron por el aire, afectando gravemente la salud de la población local (Beischlag et al. 2008).

Sin embargo, las fuentes de exposición accidental a PAHs no se limitan a fugas en plantas industriales. A lo largo de los últimos 20 años ha habido varios casos de

detección de dioxinas y compuestos relacionados en productos alimentarios. Por ejemplo, en 1999, en Bélgica, se detectaron altos niveles de PCBs en varios tipos de carne y en productos lácteos que causaron varias intoxicaciones (Bernard et al. 2002); en 2007 se detectaron por toda Europa niveles altos de dioxina en la goma guar, un aditivo alimentario procedente de la india (Weber et al. 2008); y, en 2008, en Irlanda, se detectó carne de cerdo altamente contaminada con dioxina, entre otros casos. En el año 2006, la Comisión Europea (CE) estableció unos contenidos máximos de determinados contaminantes en productos alimenticios ((CE) N° 1881/2006).

El descubrimiento del **Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (AhR)** tuvo origen en el campo de la toxicología de este tipo de compuestos en vertebrados. La gran similitud en los efectos biológicos de varios tipos de PAHs como los bifenilos policlorados (PCBs), los policlorodibenzodioxinas (PCDDs), o los policlorobenzofuranos (PCDFs) condujo a la hipótesis de que estos xenobióticos inducían sus efectos a través de un mecanismo común (Poland and Glover 1973). Los estudios del metabolismo de xenobióticos demostraron que éstos inducían en el organismo una batería de enzimas que, si bien parecía una respuesta adaptativa para inducir la detoxificación y eliminación de estos compuestos, en algunos casos mediaba directamente la toxicidad, puesto que los metabolitos generados eran más tóxicos que el compuesto inicial (Conney 1982). Como parte de la caracterización de este metabolismo adaptativo, se realizaron estudios en distintas cepas de ratón y se observó que existían entre ellas diferencias en su respuesta a los PAHs (Poland et al. 1974) y que estas diferencias eran de carácter genético (POLAND and GLOVER 1975). Mediante cruces entre cepas de ratón capaces de responder a los PAHs y cepas que no lo eran, se demostró que el responsable era un único locus autosómico dominante (NEBERT, Goujon, and Gielen 1972) que se denominó *Aryl Hydrocarbon Responsiveness* y al que se caracterizó como un receptor para este tipo de xenobióticos.

Actualmente este receptor se conoce como Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (AhR por sus siglas en inglés) y, aunque su función como mediador en el metabolismo de xenobióticos es la más conocida, a medida que se ha avanzado en su estudio, se ha ido reconociendo su participación en importantes procesos de homeostasis celular (Barouki, Coumoul, and Fernandez-Salguero 2007).

INTRODUCCIÓN

1.8. AhR: un factor de transcripción bHLH/PAS

El receptor AhR es un factor de transcripción activado por ligando de la familia bHLH (dominio básico hélice bucle hélice) / PAS (Per-ARNT-Sim). A esta familia de proteínas pertenecen una serie de factores de transcripción cuya función es el control de procesos biológicos muy diversos, que van desde el control de la hipoxia hasta la regulación hormonal y de los ritmos circadianos (Crews 1998).

El nombre de bHLH/PAS se asignó por la presencia de estos dos dominios en todos los factores de transcripción pertenecientes a esta familia. El dominio PAS se sitúa en el extremo N-terminal y consiste en una secuencia de entre 260 y 310 aminoácidos (Crews, Thomas, and Goodman 1988) que se divide en dos regiones altamente conservadas: PAS-A y PAS-B. A través de este dominio pueden darse uniones tanto entre proteínas PAS (Huang, Ederly, and Rosbash 1993), como a otras proteínas (McGuire et al. 1995). El dominio bHLH también se encuentra en la zona amino terminal y consiste en una región básica, adyacente a otra región que forma una estructura tridimensional conocida como hélice-bucle-hélice (Kewley, Whitelaw, and Chapman-Smith 2004). A través de la región básica, los factores de transcripción de esta familia, se unen a regiones E-box del ADN, que son regiones promotoras de los genes diana. Además, el dominio bHLH participa también en la unión a otras proteínas de la misma familia. En la región C-terminal, se sitúan dominios de transactivación o de represión (**Figura 1.5**) (Fukunaga et al. 1995).

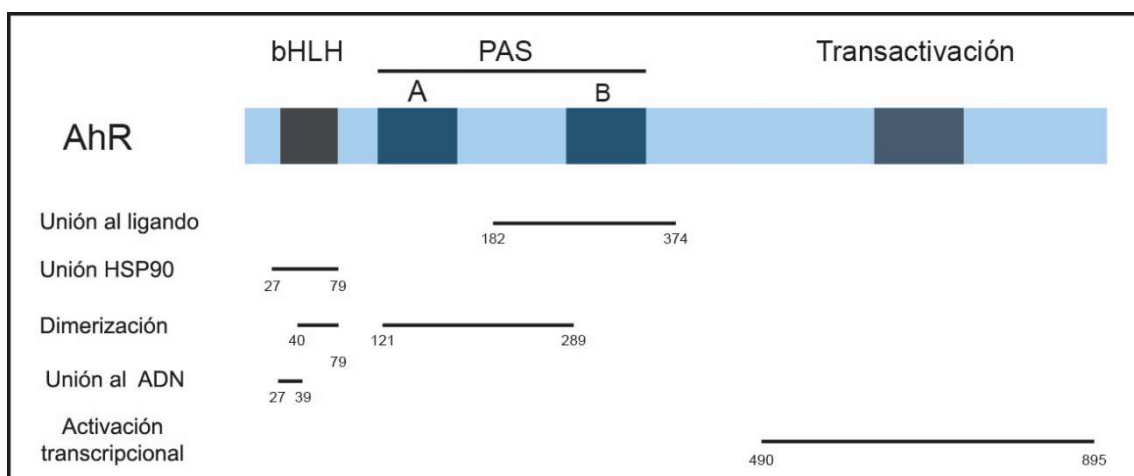


Figura 1.5. Dominios funcionales de AhR en ratón. (Esquema adaptado de Fukunaga et al. 1995).

Los factores de transcripción de tipo bHLH/PAS se caracterizan porque necesitan dimerizar con otras proteínas de tipo PAS para formar un complejo

transcripcionalmente activo (Taylor and Zhulin 1999). En el caso de AhR, el dímero lo forma con el **Traslador del Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (ARNT)**.

1.9. Variantes polimórficas de AhR

Como se mencionó previamente, el estudio del metabolismo de xenobióticos en ratón permitió identificar diferentes variantes alélicas en esta especie, que podían diferenciarse por su grado de respuesta a PAHs. Estos alelos, nombrados de mayor a menor capacidad de respuesta, son: AhR^{b-1}, AhR^{b-2}, AhR^{b-3} y AhR^d. De esta forma, la cepa de ratón DBA/2J, que expresa el polimorfismo AhR^d, necesita una dosis de TCDD 15 veces mayor que los ratones C57/BL6, que presentan la variante AhR^{b-1}, para responder a este compuesto (Okey, Vella, and Harper 1989).

En humano, el gen AhR se encuentra en la posición 7p15, en el brazo pequeño del cromosoma 7 (Micka et al. 1997) y consta de 12 exones que codifican un mRNA de 5483 nucleótidos. Su producto génico es una proteína de 96,147 kD. Hasta el momento, las variantes alélicas descritas en humano son seis: -459G>A, 132T>C, 1549C>T, 1661G>A, 1708G>A y 2356A>G (Harper et al. 2002). En 4 de ellas, el polimorfismo se sitúa en el exón 10, una región relacionada con la transactivación de otros genes, y en las dos restantes se encuentra en la región bHLH (**Figura 1.6**).

El polimorfismo más estudiado ha sido el de la variante 1661G>A, que implica la sustitución de una arginina por una lisina en el codón 554. Recientemente se ha asociado este polimorfismo con el riesgo de padecer retinitis pigmentosa. Respecto al resto de variantes alélicas, la interpretación de los estudios fenotípicos ha sido confusa. No obstante, será necesario un mayor estudio de estos polimorfismos para clarificar los posibles efectos fenotípicos asociados.

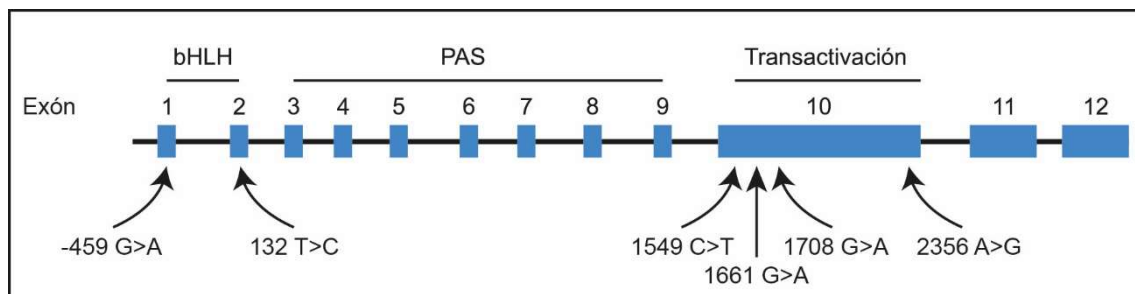


Figura 1.6. Polimorfismos humanos de AhR (Esquema adaptado de Harper et al. 2002).

INTRODUCCIÓN

1.10. Señalización por AhR

1.10.1. Vía clásica de señalización: AhR como factor de transcripción

AhR es un factor de transcripción activado por ligando que, en ausencia de éste, se encuentra en el citoplasma formando un complejo transcripcionalmente inactivo con las proteínas HSP90 (proteína de choque térmico 90) (Wilhelmsson et al. 1990), p23 (Kazlauskas, Poellinger, and Pongratz 1999), AIP1 (proteína de interacción con AhR) y la proteína ARA9 o XAP2 (proteína asociada al virus de la hepatitis B) (Ma and Whitlock 1997; Carver and Bradfield 1997; Meyer et al. 1998). La unión de AhR a un ligando, provoca un cambio conformacional que permite la translocación del complejo al núcleo, donde el receptor se disocia de las proteínas a las que se mantenía unido para formar un heterodímero transcripcionalmente activo junto a **ARNT** (Heid, Pollenz, and Swanson 2000). Una vez formado, este complejo es capaz de unirse a secuencias específicas del ADN que son regiones promotoras de los genes diana de AhR, denominadas XRE o DRE (Elementos de Respuesta a Xenobióticos o Elementos de Respuesta a Dioxinas, respectivamente) (Denison, Fisher, and Whitlock 1989)

La unión del complejo transcripcional a las regiones XRE induce una batería de genes que codifican para una serie de enzimas responsables del metabolismo de xenobióticos, entre las que se incluyen varios miembros de la familia del **citocromo P450** (como Cyp1A1, Cyp1A2 y Cyp1B1), la subunidad Ya de la glutatión-S-transferasa, la NADPH/Quinona oxidoreductasa y la aldehído deshidrogenasa (Hankinson 1995). Es importante destacar que existe un patrón diferencial en la expresión de los genes diana de AhR. Mientras algunos de ellos son fácilmente inducibles tras la administración de un agonista del receptor, como el Cyp1A1, otros tienen un carácter más constitutivo, como el Cyp1B1 (Hakkola et al. 1997).

Además, AhR puede inducir la expresión de genes cuyas regiones promotoras carecen de la secuencia XRE, como es el caso de la proteína BAX (factor bcl-2 asociado a la proteína X), implicada en la inducción de la apoptosis (Matikainen et al. 2001) o el de PON1 (Paraoxonasa 1), una esterasa sérica responsable de la hidrólisis de organofosfatos (Gouédard, Barouki, and Morel 2004).

1.10.2. Vía alternativa de señalización: AhR como E3 ubiquitina ligasa

Además de actuar como un factor de transcripción, AhR también puede ejercer una función E3 ubiquitina ligasa formando parte del complejo Cullin4B/E3ubiquitina ligasa. El **sistema ubiquitina-proteosoma** juega un papel fundamental en la homeostasis celular siendo el principal sistema de degradación de proteínas (Fang and Weissman 2004). Este sistema sigue una secuencia de reacciones bien definida que comienza con la activación de la ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos, por parte de la enzima E1 activadora de la ubiquitina. La ubiquitina activada es transferida por una enzima E2 de conjugación de ubiquitina al sustrato, que tiene que haber sido reconocido previamente por una E3 ubiquitina ligasa (Schwartz and Ciechanover 2009). Hasta el momento se han descrito en humano 8 enzimas con actividad E1 (Schulman and Harper 2009), más

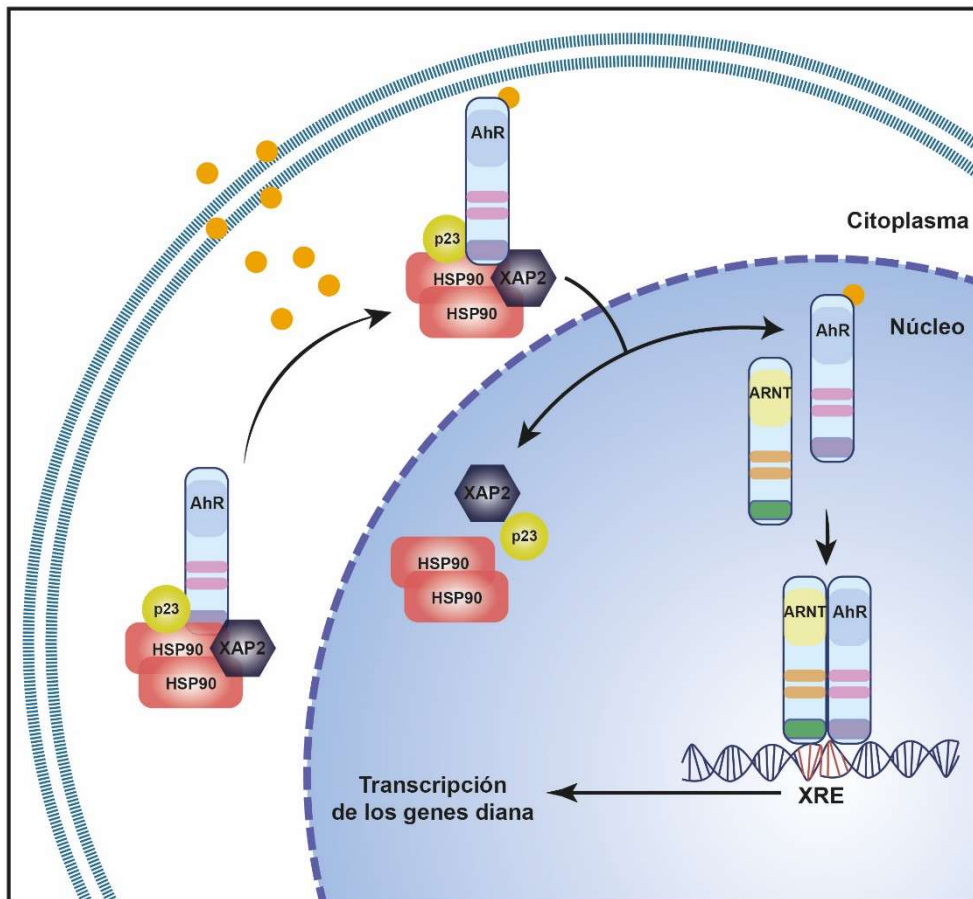


Figura 1.7. Vía clásica de señalización de AhR. En ausencia de ligando, AhR se encuentra en el citoplasma formando un complejo con HSP90, p23 y XAP2, que mantienen al receptor inactivo. Al llegar el ligando y unirse a AhR, el complejo entra al núcleo donde se disocia. Una vez libre, AhR se une a ARNT formando un dímero transcripcionalmente activo, que se une a las secuencias promotoras XRE e iniciar la transcripción de los genes diana.

INTRODUCCIÓN

de 40 enzimas con actividad E2 (Stewart et al. 2016) y más de 1000 con actividad E3 (Sun 2006). Dado que las enzimas de la familia E3 ubiquitina ligasa son responsables del reconocimiento del sustrato, su papel es fundamental en la especificidad del proceso.

Para que AhR pueda actuar como ubiquitina ligasa es necesario la formación del complejo CUL4^{AhR}, que está constituido por la proteína CUL4B (cullina 4B), la proteína DDB1 (Proteína de unión al ADN dañado 1), la β -transducina TBL3, la RBX1 (*Ring box protein 1*) y la subunidad 19S del proteosoma, junto a ARNT y AhR (Figura 1.8) (Ohtake et al. 2007). Tanto la formación como la actividad del complejo son dependientes de la presencia de ligando de AhR. El receptor de estrógenos, el receptor de andrógenos y la β -catenina son las únicas proteínas cuya degradación

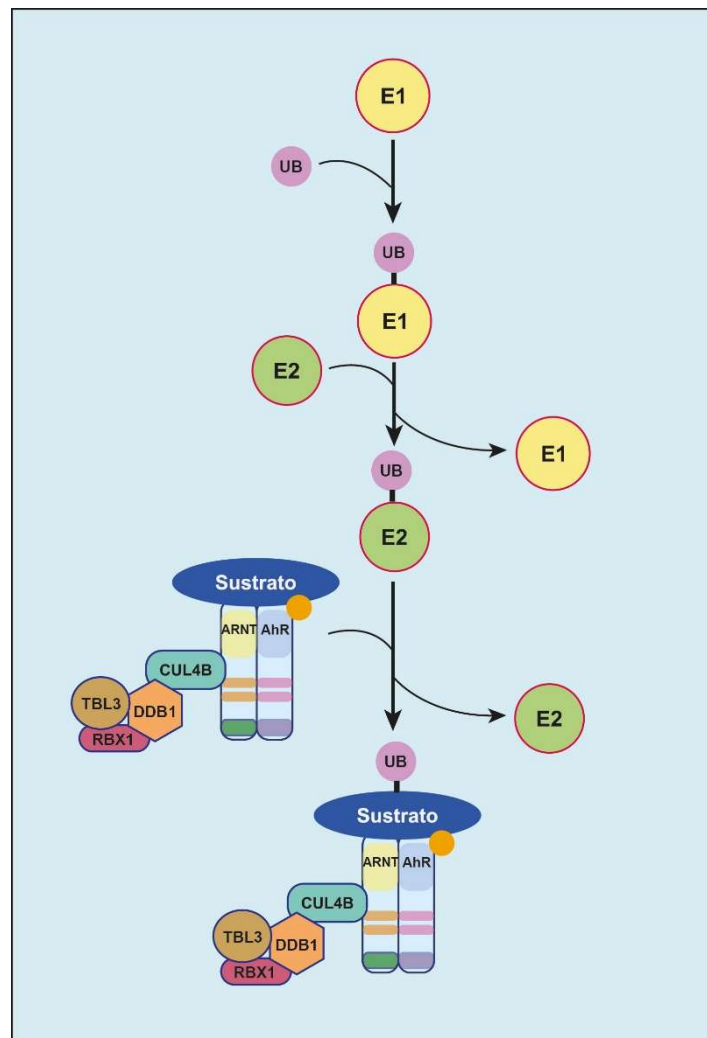


Figura 1.8. Vía de señalización alternativa de AhR. AhR es capaz de regular los niveles proteicos actuando como una ubiquitina E3 ligasa. El complejo formado por las proteínas CUL4B, DDB1, TLR3 y RBX1, junto a ARNT y AhR, reconoce el sustrato que tiene que ser degradado. Tras la activación de la ubiquitina por parte de E1 y la transferencia de la misma al sustrato por parte de la E2, el complejo formado por AhR y el resto de proteínas conduce a la proteína que va a ser degradada al proteosoma.

vía CUL4^{AhR} se ha descrito hasta ahora (Ohtake, Fujii-Kuriyama, and Kato 2009; Kawajiri et al. 2009).

1.10.3. Regulación de la señalización por AhR

Como se ha mencionado anteriormente, AhR tiene un papel dual en la regulación de los niveles celulares de proteínas: por un lado, puede inducir los niveles de expresión como factor de transcripción y, por otro, puede inducir la degradación como ubiquitina ligasa. Su señalización tiene que estar, por lo tanto, estrechamente regulada (**Figura 1.9**).

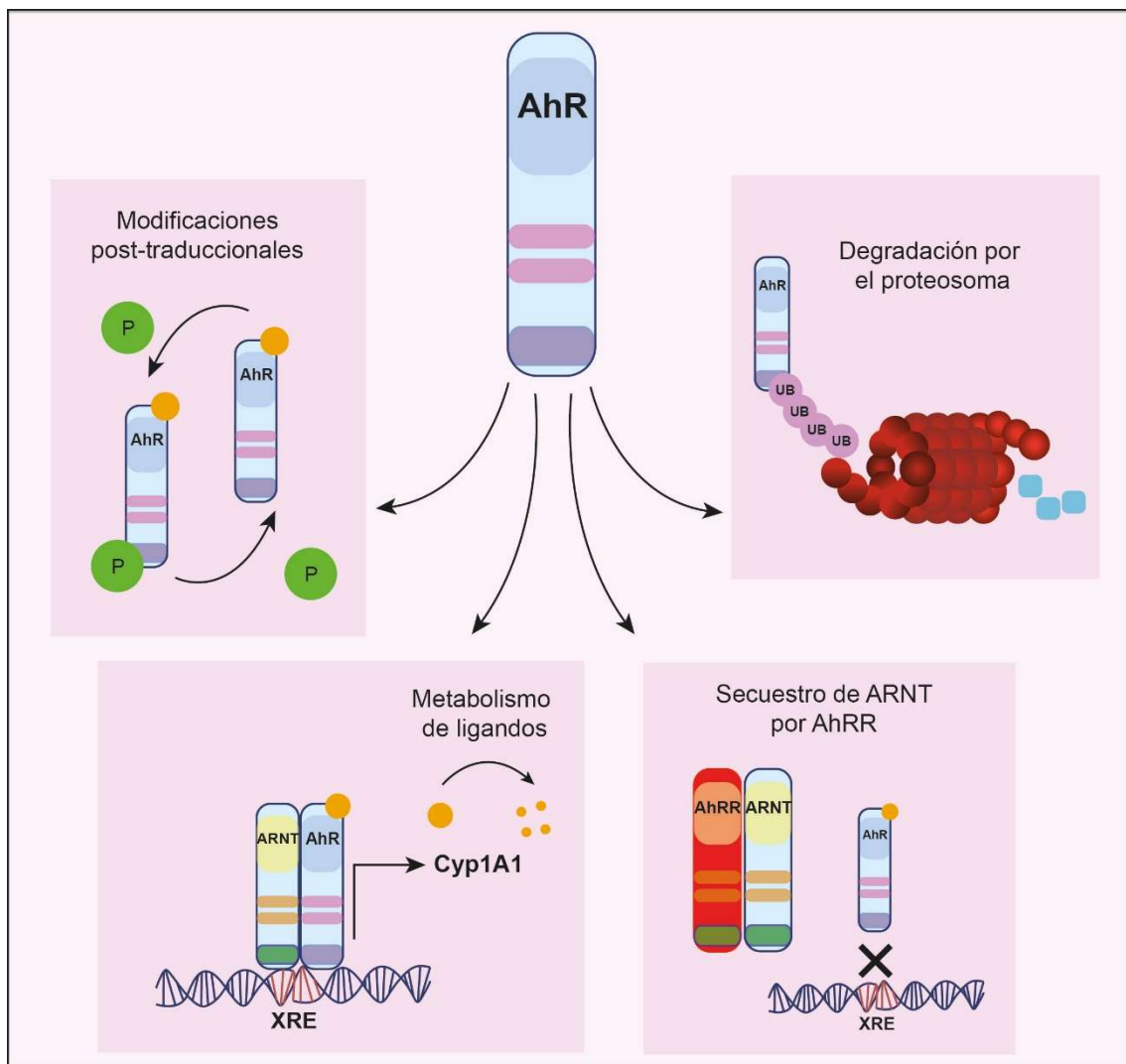


Figura 1.9. Regulación de la señalización de AhR. El receptor AhR está regulado a varios niveles. Por un lado, AhR puede sufrir modificaciones post-traduccionales que afectan a su transporte del citoplasma al núcleo; por el otro, la degradación del receptor por parte del proteosoma regula sus niveles citoplasmáticos. Además, el metabolismo de sus ligandos por las enzimas inducidas por el propio receptor finaliza su señalización, así como el secuestro de ARNT por AhRR, que es uno de los genes diana de AhR.

INTRODUCCIÓN

La **fosforilación/desfosforilación** de AhR en la señal de localización nuclear participa en el tráfico citoplasma-núcleo del receptor y también influye en la afinidad del dímero AhR/ARNT para unirse a las secuencias XRE (Ikuta, Kobayashi, and Kawajiri 2004).

Además de las modificaciones post-traduccionales, existen dos bucles de **retroalimentación negativa** en la señalización de AhR. Por un lado, cuando AhR se activa por un ligando metabolizable, la inducción de la expresión de enzimas metabolizadoras como la Cyp1A1 disminuirá los niveles de ligando por degradación del mismo (Furness, Lees, and Whitelaw 2007). Por otro lado, uno de los genes diana de AhR es el **Represor de AhR (AhRR)**, que codifica para una proteína bHLH/PAS con un alto grado de homología con AhR en la secuencia amino terminal. Esto le permite formar un dímero con ARNT, capaz de unirse a las secuencias XRE, pero transcripcionalmente inactivo (Hahn, Allan, and Sherr 2009). El secuestro de ARNT por parte de AhRR impide la unión AhR/ARNT que es necesaria para la función transcripcional de AhR (Mimura et al. 1999; Baba et al. 2001). Además, los niveles de AhRR y de ARNT no sólo afectan a la función de AhR como factor de transcripción, sino que también determinan su actividad E3 ubiquitina ligasa, que se favorece tanto al incrementarse la expresión de AhRR como al reducirse la de ARNT (Luecke-Johansson et al. 2017).

También es determinante en la regulación de la señalización la propia **degradación del receptor**. Tras su activación y una vez finalizada su señal, AhR se transloca al citoplasma gracias a una señal de exportación nuclear, donde es degradado vía proteosoma 26S (Song and Pollenz 2002).

1.10.4. Interacción con otras rutas de señalización

AhR puede interactuar con diversas rutas de señalización de función muy variada, lo que hace a este receptor partícipe de importantes procesos a nivel celular y tisular. Quizás la más estudiada haya sido la estrecha relación que mantienen AhR y el receptor de estrógenos tanto a nivel transcripcional como a nivel de degradación de los receptores (Ohtake, Fujii-Kuriyama, and Kato 2009).

Se ha descrito también que AhR es capaz de interactuar con varias vías de señalización implicadas en la proliferación, diferenciación y migración celular, como las rutas de TGF β , la Wnt/ β -catenina y la de Notch (Roman et al. 2017).

Asimismo, existe una interrelación de AhR con rutas inflamatorias, como la vía de **NFκB** (Tian et al. 1999). Además, está ampliamente demostrado que la inflamación reprime el metabolismo de xenobióticos (Morgan 1997); citoquinas como la IL-6 (interleucina 6) o el TNF-α (factor de necrosis tumoral α) suprimen la inducción de CYP1A1 AhR-dependiente y también su actividad constitutiva (Tinel et al. 1995).

1.11. Ligandos que activan AhR

Aunque se ha descrito que ante determinados contextos AhR es capaz de activarse en ausencia de ligando, generalmente la acción de AhR requiere la presencia de un agonista (Xiao et al. 2015). Dentro de los ligandos del receptor se pueden distinguir los ligandos xenobióticos y los ligandos no xenobióticos, que se sintetizan naturalmente de forma endógena o como resultado de procesos biológicos (Denison and Nagy 2003).

1.11.1. Xenobióticos

La mayor parte de xenobióticos que son ligandos de AhR son compuestos lipofílicos que pueden clasificarse según su estructura en 3 clases: PAH, HAH y policlorados bifenílicos (PCB) (**Tabla 1.2**). Generalmente son carcinogénicos, además de producir otros efectos tóxicos para la salud. Estos compuestos suelen liberarse por procesos de combustión y pirolisis; por lo tanto, las fuentes de emisión, tanto naturales como antropogénicas, son numerosas.

1.11.1.1. PAHs: Fuentes de emisión y de exposición

A pesar de que existen causas naturales de emisión de PAH, como las erupciones volcánicas y los incendios forestales, la mayor parte de estos compuestos tiene origen antropogénico. Entre las actividades que generan este tipo de moléculas están la refinación de petróleo, la producción de coque y aluminio, la quema de combustible y la producción de asfalto, entre otras (Abdel-Shafy and Mansour 2016). En las ciudades, las emisiones derivan principalmente de los vehículos a motor y del uso de la calefacción y, a nivel doméstico, se pueden también producir PAHs a través de las estufas de carbón y al cocinar, siendo esta última actividad responsable del 37% de las emisiones domésticas (Zhu et al. 2009).

INTRODUCCIÓN

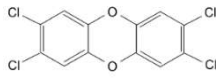
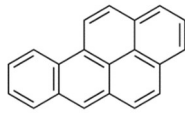
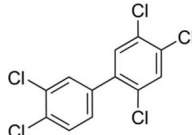
Compuesto	Estructura	Fuente de exposición	Efectos toxicológicos
TCDD o dioxina (HAH)		<ul style="list-style-type: none"> Dieta: carnes, pescados, mariscos, leche... Bajos niveles en humo de vehículos a motor y tabaco 	<ul style="list-style-type: none"> Exposición aguda: lesiones dermatológicas, problemas hepáticos Exposición crónica: carcinogénico, afectación sistema inmune, nervioso, endocrino.
Benzo[a]Pireno (PAH)		<ul style="list-style-type: none"> Vehículos a motor Tabaco Dieta: cereales, aceites... 	<ul style="list-style-type: none"> Exposición aguda: toxicidad baja Exposición crónica: carcinogénico, afectación sistema respiratorio, renal y gastrointestinal
Pentaclorobifenilo (PCB)		<ul style="list-style-type: none"> Dieta: carnes, pescados, mariscos, leche... 	<ul style="list-style-type: none"> Exposición aguda: lesiones dermatológicas, problemas respiratorios Exposición crónica: neurotoxicidad, alternación endocrina, inmunosupresión, hepatotoxicidad...

Tabla 1.2. Principales xenobióticos ligandos de Ahr.

Si bien es cierto que una de las fuentes de exposición de estas sustancias es a través del aire, la principal, en personas no fumadoras, es la **dieta** (Lodovici et al. 1995). Los PAHs de bajo peso molecular se concentran en verduras y frutas que los captan a través de la adsorción de superficie (Speer et al. 1990). Además, también pueden contaminar alimentos durante el procesamiento industrial de los mismos, lo cual es bastante frecuente en el proceso de secado de cereales y de las semillas utilizadas para ciertos aceites (Yusty and Davina 2005; Šimko 2002) (Tabla 1.3). Por último, estos compuestos se forman como resultado de ciertos métodos de preparación de alimentos como la parrilla, el asado o el ahumado.

	Grasas (aceites y mantequillas)	Productos lácteos	Carnes y productos de la carne	Huevos	Pescado y marisco	Verduras, legumbres y hortalizas	Bollería industrial	Cereales	Frutas
2000	0.27	0.08	0.10	0.02	0.24	0.01	NA	0.26	0.01
2006	0.50	0.0	0.13	0.09	0.14	0.02	0.12	0.05	0.02
2008	0.49	0.20	0.14	0.10	0.07	0.07	0.03	0.03	0.02

Tabla 1.3. Concentraciones de Benzo[a]pireno ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestras de alimentos en Cataluña en los años 2000, 2006 y 2008. NA: no analizado (Martorell et al. 2010).

1.11.1.2. HAHs y PCBs: Fuentes de emisión y de exposición

Los HAHs y PCBs se utilizaron durante muchos años para la producción de transformadores y generadores, materiales de construcción, lubricantes, recubrimientos, plastificantes y tintas. No obstante, hoy en día su uso está mucho más restringido dado que tanto las dioxinas como los PCB son altamente resistentes a los procesos de descomposición y, en consecuencia, persisten en el medio ambiente, incorporándose a la cadena alimenticia. Según la FSAI (*Food Safety Authority of Ireland*), el 90% de la exposición humana a HAHs y PCBs es el resultado del consumo de alimentos, principalmente productos alimenticios de origen animal con un alto contenido de grasa, puesto que estos contaminantes se acumulan en el tejido adiposo (Tabla 1.4)

	Grasas (aceites y mantequillas)	Productos lácteos	Carnes y productos de la carne	Huevos	Pescado y marisco	Verduras, legumbres y hortalizas	Cereales
2,3,7,8-TCDD	170	4.24	15	1	34.70	NA	0
PCB-105	8620	3559	3484	4970	15490	1396	2254

Tabla 1.4. Concentraciones de dioxina y PCB-105 (pg/kg de peso húmedo) en muestras de alimentos en Valencia en el año 2011 (Marin et al. 2011).

1.11.1.3. Regulación de los contenidos de PAHs/HAHs/PCBs en la dieta

Debido a los numerosos casos de intoxicación alimentaria con PAHs, HAHs y PCBs anteriormente mencionados, en el año 1990 la OMS estableció la ingesta diaria tolerable (TDI por sus siglas en inglés) de dioxina en 10 pg/kg de masa corporal (m.c.). En el año 2000 lo redujo a 1-4 pg WHO-PCDD/F-PCB-TEQ/ kg de m.c. (siendo WHO-PCDD/F-PCB-TEQ concentración de equivalentes tóxicos de sumas de dioxinas y PCBs similares a las dioxinas según la OMS).

En 2001, el comité científico para los alimentos de la CE fijó una ingesta semanal tolerable (TWI) de 14 pg/kg de m.c. Sin embargo, un estudio llevado a cabo en el año 2012 por este comité estimó que el porcentaje de individuos expuestos por encima de esta TWI era entre el 1,0 y 52,9%, siendo los niños el grupo más expuesto. En el caso de los PAHs, no están establecidas las TDI, pero la OMS publicó en 2006 que la media de ingesta diaria, en el caso del Benzo[a]pireno era de 4 ng/kg de peso corporal.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día existe una normativa que regula a nivel europeo las concentraciones máximas permitidas en los diferentes tipos de alimentos ((CE) N° 1881/2006) (Tabla 1.5). Aunque desde la puesta en marcha de la regulación europea se ha producido una tendencia a la baja en los contenidos de estas sustancias en los alimentos, todavía hay regiones cercanas a zonas industriales en las que los productos locales exceden con creces los contenidos máximos permitidos (Squadrone et al. 2015).

Productos alimenticios	Suma de dioxinas y PCBs similares a las dioxinas (EQT PCDD/F-PCB OMS)	Productos alimenticios	Benzo[a]pireno
Productos cárnicos (excluidos los despojos no comestibles) y grasa de:		Aceites y grasas (excluida la manteca de cacao) destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingrediente de los productos alimenticios	2,0 µg/kg de peso fresco
-bovinos y ovinos	4,5 pg/g grasa		
-aves de corral	4,0 pg/g grasa		
-cerdos	1,5 pg/g grasa		
Hígado de animales terrestres mencionados en el punto anterior y sus productos derivados	12,0 pg/ g grasa	Carnes ahumadas y productos cárnicos ahumados	5,0 µg/kg de peso fresco
Carne de pescado.	8,0 pg/ g peso fresco	Carne de pescado ahumado excluidos los moluscos bivalvos.	5,0 µg/kg de peso fresco
Leche y productos lácteos	6,0 pg/ g peso fresco	Carne de pescado no ahumada	2,0 µg/kg de peso fresco
Mezcla de grasas de origen animal	3,0 pg/g grasa	Moluscos bivalvos	10,0 µg/kg de peso fresco
Aceites y grasas vegetales	1,5 pg/g grasa	Alimentos elaborados a base de cereales	1,0 µg/kg de peso fresco
Aceites marinos	10,0 pg/g grasa	Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación	1,0 µg/kg de peso fresco

Tabla 1.5. Contenidos máximos de determinados contaminantes en los productos alimenticios ((CE) N° 1881/2006). EQT: concentración de equivalentes tóxicos. PCDD/F: policlorodibenzo-p-dioxinas/ policlorodibenzofuranos.

1.11.1.4. Efectos de la exposición a PAHs/HAHs/PCBs sobre la salud

La exposición a ligandos xenobióticos de AhR puede producir diversos efectos tóxicos como alteraciones inmunológicas, endocrinas, hepatotoxicidad, teratogénesis y aparición de tumores. No obstante, los efectos dependen de varios factores como la especie estudiada, la vía y el tiempo de exposición, así como el tipo y la cantidad de compuesto (Denison et al. 2011).

En humano, los estudios realizados hasta la fecha son principalmente por exposición aguda accidental (Beischlag et al. 2008). Las investigaciones sobre efectos a largo plazo se han realizado en personas que, debido a su profesión, han estado expuestas a estos compuestos por vía inhalatoria (Kim et al. 2013). Por lo tanto, se conoce muy poco sobre los efectos nocivos que estas moléculas pueden inducir a través de la dieta.

1.11.2. Ligandos naturales

Como se ha mencionado, los xenobióticos provienen principalmente de fuentes antropogénicas y no son sintetizados de manera endógena en los organismos. La activación de AhR por este tipo de compuestos es probablemente una adaptación evolutiva de los vertebrados puesto que, a pesar de que este receptor presenta un alto grado de conservación entre especies, el ortólogo de AhR en invertebrados es incapaz de responder a xenobióticos (Butler et al. 2001). Este hecho respalda la existencia de ligandos endógenos que activen el receptor para mediar funciones fisiológicas y de homeostasis celular.

Actualmente se conocen varios compuestos no xenobióticos o naturales capaces de activar AhR. La principal limitación es su baja concentración en los tejidos, pero el hecho de que pueden concentrarse de manera local ante determinadas condiciones fisiológicas o patológicas apunta a que la activación endógena de AhR es contexto-dependiente. Dentro de los ligandos naturales podemos encontrar compuestos sintetizados de manera endógena por ciertos alimentos que consumimos y compuestos que sintetizamos de manera endógena en nuestro organismo (Denison et al. 2011).

1.11.2.1. Ligandos naturales procedentes de la dieta

Las primeras evidencias de agonistas naturales de AhR surgieron con la observación de que ciertos extractos de verduras y hortalizas podían inducir la expresión de CYP1A1 (Wattenberg and Loub 1978; Bjeldanes et al. 1991).

INTRODUCCIÓN

Compuestos como el indol-3-carbinol (I3C), los carotinoides, el dibenoilmetano, la curcumina o los flavonoides, tienen la capacidad de unirse a AhR e inducir o reprimir la expresión de sus genes diana, dependiendo de su capacidad agonista o antagonista (**Tabla 1.6**) (MacDonald, Ciolino, and Yeh 2001; Gillner et al. 1993; Ciolino et al. 1998; Gradelet et al. 1996).

Los flavonoides representan el grupo más grande de ligandos de AhR naturales adquiridos a través de la dieta (Denison et al. 2011). Aunque muchos de ellos son antagonistas (Ashida et al. 2000), también se han identificado numerosos agonistas como la quercetina, la diosmina, la tangeritina o la tamarixetina (Ciolino et al. 1998; Ciolino, Wang, and Yeh 1998; Canivenc-Lavier et al. 1996). Además de interactuar con AhR, muchos de estos flavonoides también son sustratos de la CYP1A1 y de la CYP1B1 (Doostdar, Burke, and Mayer 2000). El rango de concentraciones plasmáticas en humano que pueden alcanzar estos compuestos es de 0,5 a 1,6 μM , que son niveles suficientes para inhibir o activar AhR (Paganga and Rice-Evans 1997).

1.11.2.2. Ligandos endógenos

Los ligandos de AhR sintetizados endógenamente descritos hasta ahora son derivados del metabolismo de diferentes compuestos como el **triptófano** (Trp), el indol-3-carbinol (I3C), el grupo hemo y el ácido araquidónico (Machado et al. 2006; Phelan et al. 1998; Bjeldanes et al. 1991; DiNatale et al. 2010) (**Tabla 1.6**).

Probablemente, de los ligandos endógenos de AhR conocidos, los indoles derivados del Trp y del I3C sean los que mayor afinidad presentan por el receptor. El 6-formilindol [3,2-b] carbazol (FICZ), formado a partir de la fotooxidación del Trp, es un potente activador de AhR (Park et al. 2015). La degradación de este mismo aminoácido por la **vía de las kinureninas** para la producción del cofactor enzimático NAD (adenina dinucleótido nicotinamida) también da lugar a varios agonistas de AhR como la L-kinurenina o el ácido kinurénico (Isabel Cuartero et al. 2016).

En los últimos años, una amplia cantidad de estudios han focalizado su atención en la ruta de las kinureninas y en su implicación en distintos contextos patológicos como el ictus isquémico cerebral (Cuartero et al. 2014). También se han visto

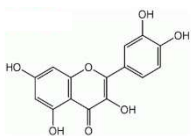
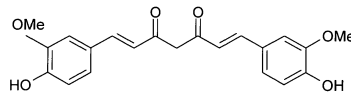
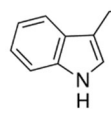
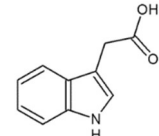
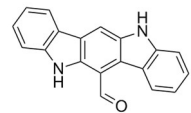
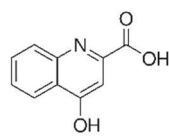
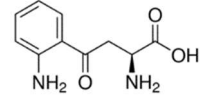
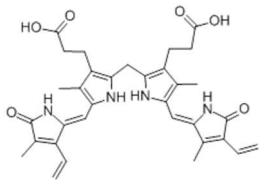
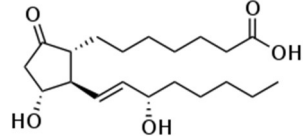
Procedencia	Clase		Actividad	Estructura
Ligandos procedentes de la dieta	Flavonoides		Antagonista/ Antagonista	<p>Quercetina</p> 
	Curcumina		Antagonista/ Antagonista	
	Derivados del Trp		Agonista	<p>Indol-3-Carbinol</p> 
Ligandos endógenos	Derivados del Trp	Ruta de los indoles	Agonista	<p>Ácido indoacético</p> 
		Fotoderivados del Trp	Agonista	<p>6-Formylindol [3,2-b] carbazol</p> 
		Ruta de las kinureninas	Agonista	<p>L-kinurenina</p>  <p>Ácido quinurénico</p> 
	Derivados del grupo hemo		Agonista	<p>Bilirrubina</p> 
	Derivados del ácido araquidónico		Agonista	<p>Prostaglandinas</p> 

Tabla 1.6. Principales ligandos naturales de AhR

INTRODUCCIÓN

alteraciones de la ruta en enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple (Rothhammer et al. 2016), y trastornos neurodegenerativos, como el Parkinson, el Huntington y el Alzheimer (Jauch et al. 1995; Lim et al. 2017; Gulaj et al. 2010). En el caso del Alzheimer, dos estudios independientes han demostrado que los pacientes tienen alterados los niveles plasmáticos de varios metabolitos de la kinurenina (Gulaj et al. 2010; Giil et al. 2017).

1.12. Funciones fisiológicas de AhR

La existencia de ligandos endógenos de AhR y su alto grado de conservación entre especies indica que este receptor debe ejercer funciones fisiológicas importantes, más allá del metabolismo de xenobióticos.

El análisis de los cambios en la expresión génica tras la activación de AhR por dioxina ha revelado cambios en genes implicados en proliferación, diferenciación, migración y adhesión celular, en la respuesta a estrés oxidativo, así como en la modulación del metabolismo de esteroides, ácido retinoico y lípidos (Hayes et al. 2007).

1.12.1. Expresión constitutiva de AhR

Un aspecto importante a la hora de determinar las funciones fisiológicas de una proteína es conocer su patrón de expresión en los diferentes tejidos y a lo largo de las diferentes etapas del organismo.

1.12.1.2. Expresión constitutiva de AhR en el desarrollo embrionario

Durante el desarrollo embrionario, la expresión de los principales constituyentes de la señalización de AhR presenta un patrón espaciotemporal muy concreto (Furness and Whelan 2009), lo que sugiere que su activación responde a estímulos específicos altamente regulados durante las distintas fases del proceso. En el embrión de ratón, AhR y ARNT empiezan a detectarse entre los estadios E9-E11 en el corazón y en el neuroepitelio (Abbott, Birnbaum, and Perdew 1995). Entre E13 y E15, AhR empieza a expresarse también en la mucosa del intestino en desarrollo, en el parénquima pulmonar, en los riñones y en el hígado (Jain et al. 1998). Respecto al CYP1A1, se ha detectado la expresión del gen en rombencéfalo, mesencéfalo, corazón y riñones durante los estadios E8-E14, y en hígado, piel y músculo a partir de E13 (Campbell et al. 2005). En general, el patrón de expresión de AhR durante el desarrollo en ratón es similar al de humano, en donde además se

detecta una marcada expresión de CYP1A1 en hígado, pulmones y glándula adrenal (Omiecinski, Redlich, and Costa 1990).

1.12.1.2. Expresión constitutiva de AhR en el adulto

En el adulto joven, AhR se expresa constitutivamente en casi todos los tejidos, aunque sus niveles en muchos de ellos son relativamente bajos. El órgano que mayor expresión presenta son los pulmones (Yamamoto et al. 2004).

A pesar de que empieza a haber evidencias que apuntan a un papel de AhR en el envejecimiento, existen pocos datos sobre las variaciones en la expresión de AhR a lo largo de la edad. Los estudios realizados hasta el momento parecen indicar que los cambios son tejido-dependientes. En rata se ha observado un descenso en los niveles del receptor en hígado, pulmones y próstata (Harper, Riddick, and Okey 2006). En humano, sólo hay datos en el útero, donde no se han detectado cambios (Khorram, Garthwaite, and Golos 2002), y en el epitelio pigmentario de la retina, en el que los niveles de AhR descienden en el envejecimiento (Hu et al. 2013).

1.12.2. Alteraciones fenotípicas en animales nulos para AhR

Seguramente, las evidencias más claras de la implicación de AhR en procesos fisiológicos se han obtenido con la generación de ratones transgénicos que carecen del receptor. Tres laboratorios diferentes generaron, de manera independiente, ratones nulos para AhR (AhR^{-/-}) (Gonzalez et al. 1995; Mimura et al. 1997; Schmidt et al. 1996). Los tres modelos presentan características comunes importantes como la ausencia de toxicidad mediada por TCDD, retardo en el crecimiento, disminución del tamaño del hígado, problemas de fertilidad, anomalías en el sistema inmune, fibrosis portal y defectos cardiovasculares. Sin embargo, difieren en ciertos aspectos como el tipo de alteración del sistema inmune o la letalidad postnatal (**Tabla 1.7**) (Esser 2009; Lahvis and Bradfield 1998).

1.12.3. Papel de AhR en el desarrollo

En base a las observaciones en las pautas de expresión de AhR durante el desarrollo embrionario, junto con las evidencias de la implicación del receptor en proliferación, diferenciación y apoptosis celular, es fácil pensar que AhR podría ejercer un papel relevante en la embriogénesis (Kawajiri and Fujii-Kuriyama 2007). Varios estudios sobre la exposición a TCDD durante la gestación y la lactancia han revelado anomalías postnatales. Los datos, que han sido recabados en distintas especies animales, incluyen hidronefrosis (Abbott, Birnbaum, and Pratt 1987),

INTRODUCCIÓN

alteraciones en el desarrollo del timo (Blaylock et al. 1992) y problemas en la anatomía y función del aparato reproductor (Gray and Ostby 1995).

	B6.129 AhR^{Δ1/Δ1F}	B6.129 AhR^{Δ1/Δ1G}	B6.129 AhR^{Δ2/Δ2}
Características generales	Sí	Sí	Sí
Resistencia a TCDD			
Falta de capacidad para inducir Cyp1A1	Sí	Sí	Sí
Letalidad postnatal	Sí	Sí	No
Crecimiento retardado	Sí	Sí	Sí
Patología hepática	Sí	Sí	Sí
Fallo en el cierre del ductus venoso	No determinado	Sí	Sí
Fertilidad	Reducida	Reducida	Reducida
Defectos cardiovasculares	No determinado	Sí	Sí
Características inmunológicas			
Tamaño anormalmente grande del bazo		Sí	No
Poblaciones celulares de timo y bazo	No determinado	Normales	Normales
Tamaño reducido de las vainas linfoides periarteriales		No	Sí

Tabla 1.7. Características fenotípicas observadas en los ratones nulos para AhR (Adaptación de la revisión de Esser et al., 2009).

Probablemente el sistema más regulado por AhR durante la embriogénesis sea el sistema nervioso central. En invertebrados, más concretamente en *C. elegans*, AhR-1 participa en la diferenciación de las neuronas GABAérgicas y en procesos de migración neuronal durante el desarrollo (Qin and Powell-Coffman 2004). En mamíferos, la expresión génica mediada por AhR es necesaria para el desarrollo normal del telencéfalo (Gohlke et al. 2009). Por otro lado, estudios epidemiológicos realizados en humanos muestran que la activación de AhR por xenobióticos induce

cambios en la capacidad de aprendizaje y en el comportamiento social (Patandin et al. 1999).

1.12.4. Papel de AhR en el adulto

Como ya se ha comentado, el uso de ratones nulos para AhR en la investigación ha permitido empezar a dilucidar cuáles son las funciones fisiológicas del receptor. Hasta el momento este receptor se ha relacionado con la señalización endocrina y la reproducción (Huang et al. 2016; Pocar et al. 2005), la adipogénesis (Shin et al. 2007) y la angiogénesis y el desarrollo vascular (Terashima et al. 2013), entre otros procesos. En el contexto de esta tesis doctoral es importante destacar su papel en el sistema inmune y en el sistema nervioso central.

1.12.4.1. Papel de AhR en el sistema inmune

La exposición prolongada a TCDD en animales de laboratorio causa una fuerte inmunosupresión que cursa con una involución del timo y cambios drásticos en la diferenciación de las células del sistema inmune y en la secreción de citoquinas (Esser, Rannug, and Stockinger 2009).

En la inmunidad adaptativa, la activación de AhR interfiere en el balance de linfocitos Th1 y Th2, promoviendo la polarización a Th1 y provocando cambios en los niveles de citoquinas circulantes (Negishi et al. 2005). Además, existe también una relación entre la señalización de AhR y la diferenciación de los linfocitos T a dos subpoblaciones distintas: las células Treg y las Th17 (Hao and Whitelaw 2013).

AhR también participa en la inmunidad innata. Tras la estimulación de las células inmunes con lipopolisacárido (LPS), los niveles de expresión del receptor aumentan en células dendríticas y macrófagos. En este último tipo celular, AhR también interviene en la polarización M1/M2 (Climaco-Arvizu et al. 2016).

En el contexto de la autoinmunidad, la activación de AhR en la encefalitis autoinmune experimental (EAE, modelo animal de esclerosis múltiple), uveoretinitis autoinmune experimental y en un modelo experimental de la enfermedad de Crohn, disminuye la inflamación y la respuesta autoinmune influyendo en la diferenciación de los linfocitos T a las distintas subpoblaciones (Quintana et al. 2008; Zhang et al. 2010; Benson and Shepherd 2010). En el caso de la encefalitis autoinmune experimental, se ha demostrado que el AhR astrocitario es también

INTRODUCCIÓN

fundamental para el control de la inflamación en este contexto patológico (Rothhammer et al. 2016).

1.12.4.2. Papel de AhR en el sistema nervioso

En mamíferos, la expresión de AhR en el cerebro adulto se detecta principalmente en neuronas, astrocitos y células del endotelio (Filbrandt et al. 2004; Lin et al. 2009).

AhR tiene un importante papel en la neurogénesis adulta y en la plasticidad sináptica. Se ha demostrado recientemente que los ratones nulos para AhR presentan una neurogénesis adulta hipocampal aberrante. Los neuroblastos que se forman lo hacen con una morfología anormal y con un comportamiento sináptico inmaduro. Todo esto va acompañado de un déficit en la memoria dependiente de hipocampo (De la Parra et al. *En prensa*).

AhR media también procesos de toxicidad y apoptosis en varios tipos neuronales (Wójtowicz et al. 2017). La dioxina y otros agonistas del receptor producen una fuerte excitotoxicidad, caracterizada por una entrada masiva de calcio al citoplasma neuronal en la que están implicados los receptores NMDA (Lin et al. 2008). De hecho, AhR participa en la respuesta dual de supervivencia y muerte neuronal mediada por dichos receptores, puesto que interviene en su regulación transcripcional (Lin et al. 2009). Este proceso ha sido estudiado en la isquemia cerebral, contexto en el cual se ha demostrado que se produce un aumento de los niveles de L-kinurena, produciendo la activación y traslocación al núcleo de AhR y contribuyendo al daño cerebral (Cuartero et al. 2014).

1.12.5. Papel de AhR en el envejecimiento

El primer estudio que relacionó AhR con el envejecimiento se realizó en animales nulos para el receptor de la cepa B6.129 AhR^{Δ1/Δ1G} y donde se utilizaron como controles animales heterocigotos, en los cuales AhR está presente sólo en uno de los alelos (Fernandez-Salguero et al. 1997). Los animales, tanto machos como hembras, se evaluaron desde los 6 hasta los 13 meses y a lo largo del estudio el porcentaje de supervivencia fue del 77%. Todos ellos presentaron algún tipo de lesión asociada a la edad y que, por lo tanto, no aparecía en los animales jóvenes (**Tabla 1.8**). Si bien las lesiones aparecían en distintos tejidos, muchas de ellas presentaban características comunes como hiperplasia, hipertrofia y fibrosis.

Recientemente, se ha descrito que la falta de receptor en los ratones lleva a un agotamiento prematuro de las células madre hematopoyéticas, asociado a un descenso en la supervivencia (Singh et al. 2013).

En los últimos años, se han publicado varios estudios que apoyan la implicación de AhR en varias patologías asociadas a la edad, como la degeneración macular asociada a la edad (AMD), que es la principal causa de pérdida de visión en mayores de 60 años. En las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), que sufren un proceso de neurodegeneración en esta enfermedad, se ha descrito que la expresión de AhR desciende con la edad (Hu et al. 2013). Además, los ratones nulos para el receptor desarrollan una patología similar a la AMD, con pérdida de la capacidad visual, depósitos de lipofucsina y pérdida de las uniones estrechas del RPE y atrofia progresiva coroidea. También se ha visto una relación entre AhR y la función vascular con la edad. La activación de AhR en células endoteliales *ex vivo* de humano produce una reducción de la capacidad migratoria de las mismas (Eckers et al. 2016). Por otro lado, el benzo[a]pireno, agonista de AhR, promueve la formación de placas ateroscleróticas y la inflamación asociada a éstas (Curfs et al. 2005).

	Condición/ Lesión	Casos/Total	Porcentaje
<i>Pérdida extrema de peso (moribundo)</i>		12/52	23
<i>Muerte</i>		12/52	23
<i>Corazón</i>	Hipertrofia	52/52	100
	Fibrosis e inflamación local	13/52	25
	Vasos hipertróficos	4/52	8
<i>Útero</i>	Lesiones vasculares	12/17	70
<i>Tracto gastrointestinal</i>	Estenosis pilórica	10/14	41
	Prolapso rectal	25/52	48
<i>Hígado</i>	Hipertrofia de la vena porta	42/52	81
	Tumores	4/14	28
<i>Bazo</i>	Reducción de células T y B	52/52	100
<i>Piel</i>	Lesiones dérmicas	28/52	53

Tabla 1.8. Características fenotípicas observadas en los ratones nulos para AhR durante el envejecimiento. (Tabla adaptada de Fernández-Salguero et al., 1997).

1.12.6. Papel de AhR en el envejecimiento cerebral

Hasta la fecha, no existen estudios que evalúen el papel de AhR en el envejecimiento del cerebro. Sin embargo, han empezado a surgir evidencias de que

INTRODUCCIÓN

la exposición a xenobióticos contribuye al envejecimiento cerebral y a la aparición de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson.

Dadas las evidencias de su implicación en distintas enfermedades cuyo principal factor de riesgo es la edad, en esta tesis doctoral hemos querido investigar el posible papel que AhR pudiera tener en el envejecimiento cerebral.



2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

El receptor de hidrocarburos aromáticos participa en el envejecimiento fisiológico por su papel en el control de la inflamación, así como por su papel detoxificador tanto a nivel sistémico como a nivel del sistema nervioso central. Los cambios en su señalización durante dicho proceso pueden acelerar la aparición de rasgos asociados al envejecimiento fisiológico y/o provocar su conversión patológica.

2.2. Objetivos

Los objetivos planteados para demostrar la hipótesis fueron los siguientes:

2.2.1. Regulación de AhR por la edad

Dentro de este objetivo se incluyen los siguientes subobjetivos:

2.2.1.1. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR en cerebro

- Efecto de la edad en la expresión de AhR en cerebro
- Efecto de la edad en la expresión de ARNT en corteza e hipocampo
- Efecto de la edad en la función de AhR en cerebro
- Efecto de la edad en los niveles de Cyp1B1 en corteza e hipocampo

2.2.1.2. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR a nivel periférico

- Efecto de la edad en la expresión y función de AhR a nivel periférico: hígado
- Efecto de la edad en los niveles circulantes de ligandos de AhR

2.2.2. Papel de AhR en el envejecimiento fisiológico

Dentro de este objetivo se incluyen los siguientes subobjetivos:

2.2.2.1. Perfil temporal de indicadores generales de envejecimiento en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}

2.2.2.2. Perfil temporal de indicadores específicos de envejecimiento cerebral en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}

- Evaluación de los cambios volumétricos en cerebro de ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-} envejecidos
- Perfil temporal de déficits neurológicos asociados a la edad en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.2.2.3. Perfil temporal del fenómeno de inflammaging en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}

- Perfil temporal de los niveles de citoquinas circulantes en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}
- Perfil temporal de los niveles de citoquinas en cerebro en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}
- Evaluación de la reactividad glial en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-} envejecidos


2.2.2.4. Efecto de la activación crónica de AhR en el envejecimiento

- Efecto de la activación crónica de AhR en el desarrollo de déficits neurológicos asociados a la edad
- Efecto de la activación crónica de AhR en los niveles circulantes de citoquinas en el envejecimiento

2.2.3. Papel de AhR en un modelo patológico de envejecimiento: enfermedad de Alzheimer

Dentro de este objetivo se incluyen los siguientes subobjetivos:

- Efecto de la activación crónica de AhR en el desarrollo de déficits cognitivos en ratones APP^{NL-F}
- Efecto de la activación crónica de AhR en el desarrollo de placas amiloides en ratones APP^{NL-F}

A microscopic image of a neural network, showing a dense network of dark, branching structures (neurons and their processes) against a light, textured background. The text "3. Materiales y Métodos" is overlaid in orange.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

Para nuestro estudio se utilizaron los siguientes compuestos agonistas de AhR

- 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (Sigma)
- 2,2',4,4',6-Pentaclorobifenilo (LGC Standard)
- Benzo[a]pireno (Sigma)
- 6-formilindol[3,2-b]carbazol (Enzo Life Sciences)

3.2. Métodos

3.2.1. Normativa y animales de experimentación

Todos los procedimientos experimentales con animales se rigieron por las guías de experimentación animal del Comité de la Universidad Complutense de Madrid (directivas de la UE 86/609/CEE y 2003/65/CE, y española RD53/2013). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura y humedad, con acceso libre a comida y agua, y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

En esta tesis doctoral se utilizaron ratones C57/BL6 (Harlan Laboratories Inc.). Esta cepa de ratón presenta el alelo de tipo AhR^b (Chang et al. 1993) que codifica para una proteína de 95 kD y que tiene una afinidad de 15 a 20 veces mayor que la proteína de 104 kD codificada por el alelo de tipo AhR^d, presente en otras cepas de ratón como la DBA/2.

Además, también se usaron dos líneas transgénicas de ratón. Por un lado, se utilizaron ratones transgénicos deficientes (AhR^{-/-}) para el receptor AhR y sus correspondientes controles (Taconic). Estos ratones AhR^{-/-} presentan una mutación en el exón 3 del gen, que conduce a la codificación de una proteína no funcional.

La segunda línea transgénica utilizada fue la APP^{NL-F} con fondo genético C57/BL6 (cedidos por Takaomi Saido). Estos ratones tienen insertado (ratones *knock-in*) el gen humano de la proteína precursora amiloidea (APP por sus siglas en inglés) bajo un promotor endógeno. Este gen insertado tiene dos mutaciones

MATERIALES Y MÉTODOS

patógenas: la sueca "NF" y la ibérica "L". La mutación sueca (APP KM670/671NL) se encuentra en el exón 16 y es en realidad una doble mutación en la que se sustituye una lisina por una asparagina y una metionina por una leucina (Mullan et al. 1992). Esta sustitución afecta a la proteólisis de la APP produciendo un aumento de los niveles de β -amiloide, sin afectar la ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. La mutación ibérica (APP I716F) se ubica en el exón 17 y consiste en la sustitución de una isoleucina por una fenilalanina (Guerreiro et al. 2010). El cambio de aminoácidos afecta a la especificidad del sitio de proteólisis de la γ -secretasa que conduce a un aumento del cociente $A\beta_{42}/A\beta_{40}$.

3.2.2. Tratamientos de los animales

Para la activación aguda de AhR, se administró a los ratones una inyección intraperitoneal del agonista 6-formilindol[3,2-b]carbazol (FICZ) a una única dosis de 120 ng/kg. A los animales control, se les inyectó el mismo volumen de vehículo, el dimetilsulfóxido (DMSO). Los animales se sacrificaron 12 horas después de la inyección y se recogieron muestras de hígado, cerebro y plasma.

Para la activación crónica de AhR de 5 semanas a través de la dieta se utilizaron los siguientes agonistas de AhR:

- 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) a una concentración de 50 pg/kg de pienso.
- 2,2',4,4',6-pentaclorobifenilo (PCB) a una concentración de 1,2 μ g/kg de pienso.
- Benzo[a]pireno (B(a)P) a una concentración de 100 ng/kg de pienso.

Para la activación crónica de AhR de 16 semanas AhR a través de la dieta se utilizaron los siguientes agonistas de AhR:

- TCDD a una concentración de 25 pg/kg de pienso.
- PCB a una concentración de 1 μ g/kg de pienso.
- B(a)P a una concentración de 30 ng/kg de pienso.

Estos compuestos se disolvieron en aceite de maíz (Sigma) y éste se mezcló con pellets triturados de una dieta estándar para ratón (Teklad global 18% protein rodent diets, Envigo) a razón de 200 ml de aceite por 1 kg de comida.

3.2.3. Test comportamentales

3.2.3.1. *Motor swimming test*

El *motor swimming test* es un método que se utiliza para medir la velocidad de nado en el ratón por lo que es útil para evaluar la función motora en este animal. El ensayo se realizó según lo descrito previamente (Carter et al. 1999a) con alguna modificación. Para llevarlo a cabo, se utilizó un tanque de metacrilato, relleno de agua y con las siguientes medidas: 30 cm de alto, 100 de largo y 8 cm de ancho. Este tanque está provisto, en uno de los extremos, de una plataforma negra de escape visible de 8 cm x 8 cm, situada a 20 cm de altura (**Figura 3.1**). En uno de los lados se marcó sobre el metacrilato una línea vertical a 70 cm de la plataforma que sirvió para indicar la línea de inicio.

Para realizar el test, el tanque se llenó de agua hasta los 19 cm de altura. En el primer entrenamiento, se introdujo a los ratones en el agua a unos 15 cm de la plataforma y se les guio hasta alcanzarla. En los siguientes entrenamientos, se iban colocando a los ratones cada vez a una mayor distancia de la plataforma hasta que aprendieron a recorrer el tanque desde la línea de inicio directamente hacia la plataforma. Al finalizar los entrenamientos, se dejó descansar a los ratones durante 30 minutos. Tras este tiempo, se realizó el ensayo, que se grabó con una videocámara para el posterior análisis del tiempo de latencia en alcanzar la plataforma.

3.2.3.2. *El test de la huella*

El test de la huella o *footprint* es un método comúnmente utilizado en roedores para la evaluación de alteraciones motoras en la enfermedad de Huntington (Carter et al. 1999a) y, más recientemente, en el ictus (Hernandez-Jimenez et al. 2017).. El ensayo se realizó en un pasillo de madera de 10 cm de alto, 50 cm de largo y 10 cm de ancho (**Figura 3.1**). Sobre el suelo del pasillo se colocó un papel de filtro. Las patas de los ratones se pintaron con pintura no tóxica con dos colores diferentes

MATERIALES Y MÉTODOS

(uno para las patas traseras y otro para las delanteras) y se colocaron al inicio del pasillo, que recorrieron hasta el final, dejando sus huellas pintadas sobre el papel. Todos los animales se sometieron a tres entrenamientos antes de realizar el ensayo. Una vez finalizado, se midió la distancia entre las patas delanteras y las traseras de las pisadas.

3.2.3.3. Test del laberinto en Y

En el laberinto en forma de Y se realizaron dos paradigmas diferentes: el test de

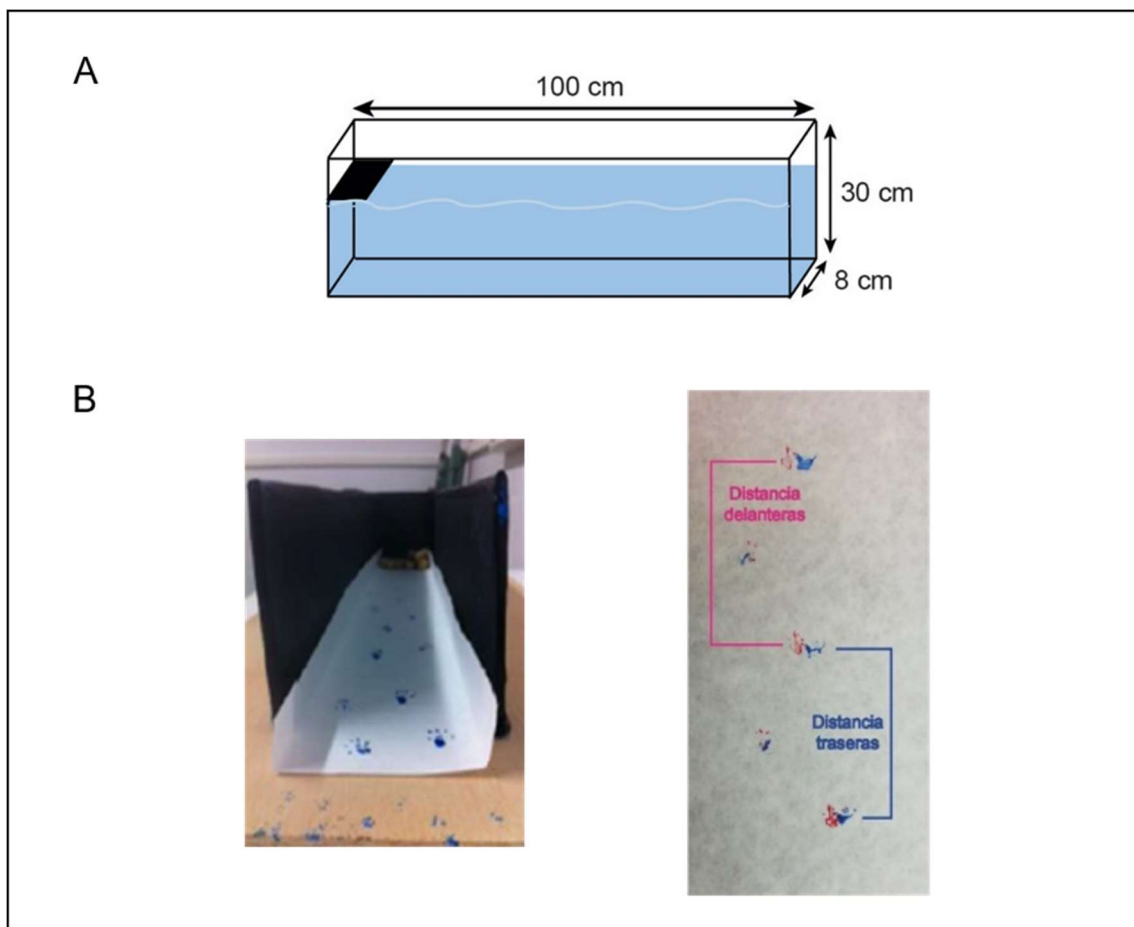


Figura 3.1. Esquemas representativos de los test motores utilizados. Test del test de natación motor (A) y test de la huella (B).

alternancia espontánea y el test del brazo cerrado. Esta tarea se basa en la tendencia natural de los roedores de explorar nuevos ambientes (Wietrzych et al, 2005). Este laberinto consiste en tres brazos de 35x7x5 cm separados 120° grados entre sí (Figura 3.2). El entorno del laberinto dispone de claves visuales para facilitar la ubicación espacial del animal y que éste pueda discriminar entre los brazos. Entre

cada ensayo se limpiaron los brazos del laberinto para eliminar residuos y claves olfativas. El recorrido realizado por el ratón fue registrado con una cámara colocada sobre el laberinto. Las entradas en cada brazo y el tiempo que el animal pasó en ellos se cuantificaron manualmente. Los animales que realizaron menos de 8 entradas en los brazos del laberinto en todo el tiempo de evaluación no se consideraron en el análisis. Las dos pruebas se realizaron en tres días consecutivos.

El primer día, se evaluó la alternancia espontánea. El ratón se colocó en el centro del laberinto, pudiendo explorar de forma libre los tres brazos durante un tiempo de 7 minutos. Posteriormente se evaluó el patrón de entradas del animal en los tres brazos, contabilizando como alternancia tres entradas consecutivas a los tres brazos del laberinto (ABC, BCA...). El porcentaje de alternancia espontánea fue calculado como la ratio entre el número total de alternancias y el máximo posible de alternancias (número total de entradas a los brazos menos 2) multiplicado por 100. Este paradigma refleja la memoria de trabajo espacial, ya que el roedor tiende de forma innata a alternar las visitas entre los tres brazos y para que esta alternancia sea eficiente el animal necesita usar su memoria de trabajo y mantener un registro de los brazos visitados recientemente. Si la memoria de trabajo espacial falla, el animal no recuerda el último brazo en el que estuvo y la alternancia espontánea disminuye (Wietrych et al. 2005).

El test del brazo cerrado en el laberinto en Y se realizó en los dos días posteriores. En la primera sesión (sesión de entrenamiento), el ratón se colocó en el centro del laberinto, pudiendo explorar solamente dos brazos durante 7 minutos, puesto que el tercero se mantuvo cerrado. Al día siguiente, en la segunda sesión (sesión de evaluación), se volvió a colocar al ratón en el laberinto; esta vez con todos los brazos abiertos. La sesión de evaluación se grabó a través de una videocámara para su posterior análisis. Este análisis se basó en el tiempo que el ratón estuvo explorando el brazo que el día anterior había estado cerrado y evalúa la capacidad del ratón de distinguir y recordar dicho brazo. El intervalo entre la codificación de la información (sesión de entrenamiento) y el recuerdo (sesión de evaluación del comportamiento exploratorio) fue de 24 horas, por lo que se consideró como

MATERIALES Y MÉTODOS

memoria a largo plazo. Debido a tendencia innata de los roedores de explorar ambientes novedosos frente a los familiares, aquellos animales con la memoria espacial intacta pasarán más tiempo en el brazo cerrado que en el resto de brazos (Dinel et al. 2014). Entre cada ensayo se limpió el recinto del ensayo y los objetos para eliminar residuos y claves olfativas.

3.2.3.4. Test del reconocimiento de objeto nuevo

El test de reconocimiento de objeto nuevo consistió en una primera fase de habituación, una sesión de entrenamiento y la prueba de reconocimiento. Durante la fase de habituación, cada animal se colocó media hora durante dos días consecutivos en la caja experimental (65x65x45 cm) sin ningún objeto. Las fases de entrenamiento y reconocimiento se realizaron en los dos días posteriores. En la fase de entrenamiento se colocaron dos objetos idénticos separados en la caja y se permitió que los ratones los exploraran durante 5 minutos. Al día siguiente, en la fase de reconocimiento, uno de los dos objetos se cambió por otro con una apariencia totalmente distinta. De nuevo se permitió que los ratones los exploraran durante 5 minutos. Durante esta última fase se analizó el tiempo de exploración de cada objeto, manteniendo como criterio que el ratón toque, olfatee o mire directamente al objeto a menos de un cm de distancia del mismo. El comportamiento del animal fue registrado con una videocámara colocada sobre caja y el tiempo de exploración se cuantificó manualmente. Entre cada ensayo se limpió el recinto del ensayo y los objetos para eliminar residuos y claves olfativas.

Los resultados se expresaron a través de dos parámetros: el índice de reconocimiento (tiempo de exploración del objeto nuevo entre el tiempo de exploración del objeto familiar) y el índice de discriminación (tiempo de exploración del objeto nuevo entre la suma del tiempo total de exploración de ambos objetos). Estos índices reflejan la capacidad para discriminar entre el objeto familiar y el objeto nuevo. La exploración preferencial del objeto nuevo respecto al objeto familiar proporciona una medida de la memoria espacial. El intervalo entre la adquisición de la información y el recuerdo fue de 24 horas, por lo que se consideró como memoria a largo plazo (Vogel-Ciernia and Wood).

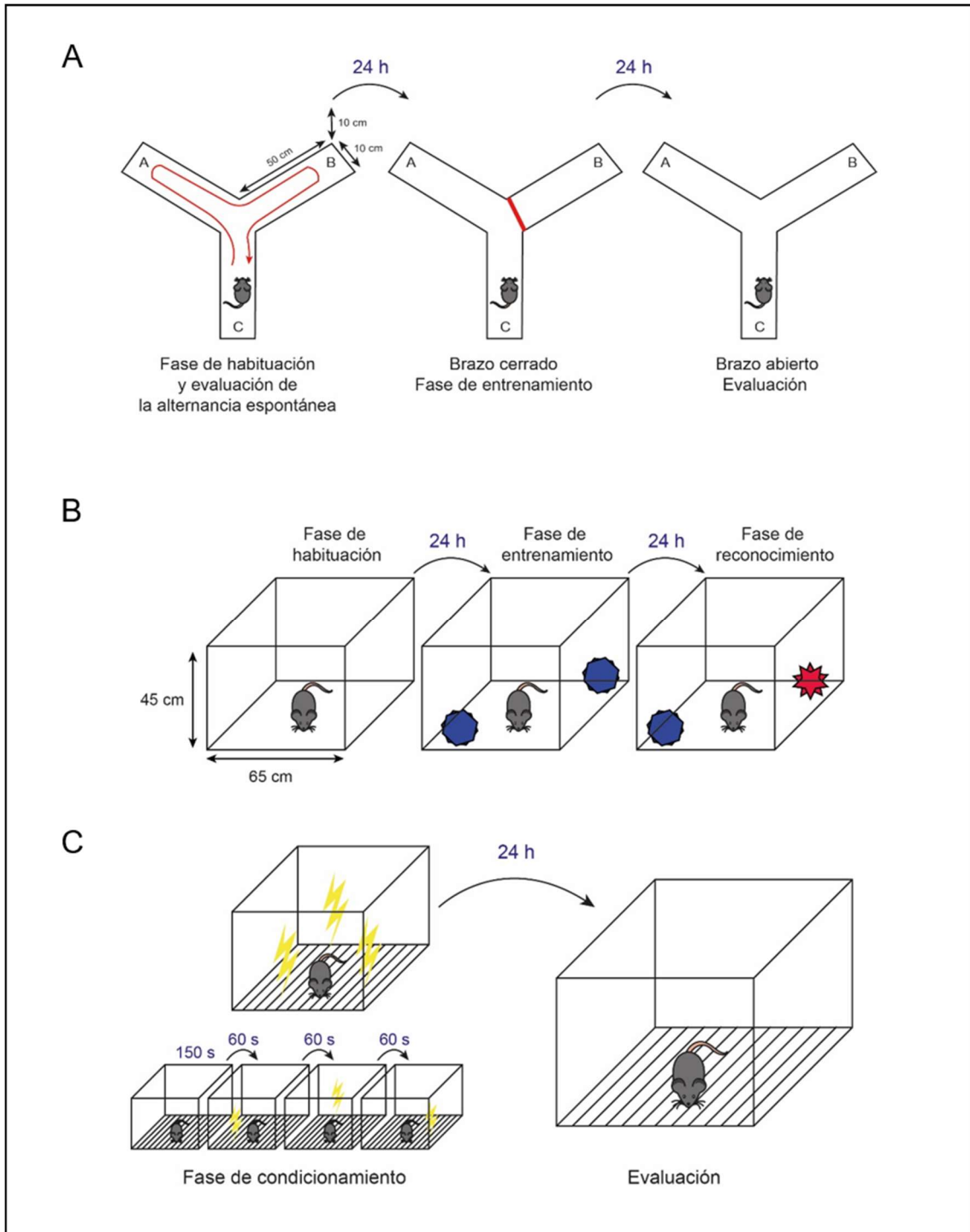


Figura 3.2. Esquemas representativos de los test cognitivos utilizados. Test del laberinto en Y (**A**), test del reconocimiento de objeto nuevo (**B**) y test del miedo condicionado por contexto (**C**).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.3.4. Test del condicionamiento al miedo contextual

El test del condicionamiento al miedo contextual se basa en la generación de un recuerdo a través de un estímulo aversivo. El test se realizó en una caja de 31x24x21 cm con un suelo de rejillas a través de las cuales puede propagarse un estímulo eléctrico de un voltaje y duración previamente programados. En una primera sesión, se colocó al animal en la caja y se le dejó familiarizarse con el contexto durante 150 segundos. Tras este tiempo, el ratón recibió tres choques eléctricos de 0.6 mA x 0.5 segundos de duración y con 1 minuto de separación entre ellos. Un minuto después del último choque eléctrico, se sacó al ratón de la caja. Entre cada ensayo se limpió el recinto del ensayo y los objetos para eliminar residuos y claves olfativas.

Al día siguiente, se volvió a situar al ratón en la misma caja y se grabó su comportamiento a través de una videocámara para la posterior cuantificación del tiempo de *freezing* de los animales (inmovilidad total del animal, que hace únicamente los movimientos necesarios para respirar). El comportamiento de *freezing* es una respuesta de miedo habitual en los ratones. El tiempo de *freezing* se considera, por lo tanto, proporcional al recuerdo que el animal guarda del contexto.

3.2.4. Procesamiento de muestras

3.2.4.1. Extracción de ARN mensajero

Para la extracción del ARNm de tejidos se utilizó el método en un paso, que se basa en la separación de los distintos componentes celulares por su solubilidad en soluciones acuosas u orgánicas (Chomczynski and Sacchi 1987). La homogenización se realizó mecánicamente mediante el uso de 1 ml de Trizol® (Invitrogen). Una vez homogenizado, se añadió el mismo volumen de cloroformo, mezclándolo por agitación, y las muestras se centrifugaron obteniéndose dos fases: una orgánica, donde se encuentran la mayoría de componentes celulares, y una fase acuosa, donde se encuentra el ARN. Tras descartar la fase orgánica, se precipitó el ARN con isopropanol (Sigma) durante toda la noche a -20° C. Una vez precipitado, se lavó con etanol al 75% y se resuspendió con agua libre de RNasa (Invitrogen). La

concentración de ARN se midió mediante espectrofotometría (espectrofotómetro Nanodrop ND-1000) y su pureza se expresó como el cociente entre los valores de absorbancia a 260 nm y a 280 nm (1.8-2.0). Las muestras se almacenaron a -80° C hasta su utilización.

3.2.4.2. Homogeneización de proteínas

Para la obtención de proteínas de los diferentes tejidos, éstos se homogeneizaron a 4°C mediante ultrasonidos en un volumen de 300 µL de una solución de homogeneización. La solución de homogeneización es una solución tamponada cuya composición es la siguiente: cloruro sódico (150 mM), los inhibidores de proteasas *Nonidet P40* (0,5%; Roche), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1 mM) y *completeTM protease inhibitor cocktail* (utilizado según indicaciones del fabricante; Roche), los inhibidores de fosfatasas *PhosphoStop* (utilizado según indicaciones del fabricante; Roche) y fluoruro de sodio (50 mM), y el agente reductor ditiotreitól (1 mM) en Tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Una vez homogeneizado el tejido, las muestras se centrifugaron a 13000 x g durante 15 minutos a 4°C y se recogieron los sobrenadantes en los cuales se encuentran las proteínas solubilizadas. Para determinar la concentración de proteína de los homogeneizados se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

3.2.4.3. Obtención de sangre por punción cardíaca para plasma sanguíneo

La extracción de sangre se realizó mediante punción cardíaca en el ventrículo derecho mediante el uso de una jeringuilla de 25G pre-tratada con citrato de sodio al 3,8%. Para la obtención de plasma sanguíneo se extrajeron entre 700 y 900 µL de sangre que se transfirieron a un tubo con citrato de sodio (10% del volumen final) y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Una vez finalizada la centrifugación, se recogió la fase superior, carente de células y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.4.4. Preparación del tejido para los estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Los animales se sacrificaron mediante sobredosis de isoflurano y se perfundieron con una solución de lavado a través del ventrículo izquierdo (tampón fosfato 0,1 M, pH 7.4), seguido de una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M. Se extrajo el cerebro y se sumergió en la misma solución fijadora durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, el tejido se mantuvo durante 48 horas en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1 M a 4°C con el fin de deshidratarlo para proteger su integridad al congelarlo. Finalmente, se congeló mediante un proceso de congelación rápido "snap frozen" en isopentano (Sigma Aldrich) a -35/-40°C, y los cerebros se almacenaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

3.2.4.5. Obtención de secciones de cerebro

Los cortes de cerebro utilizados para las tinciones inmunohistoquímicas y los experimentos de inmunofluorescencia se obtuvieron mediante microtomo. Los cerebros se cortaron desde bregma +2,20 hasta bregma -3,10 en secciones de 30 µm, en series de 10, siendo la separación entre dos cortes consecutivos de una misma serie de 300 µm. Todas las tinciones y los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron por series.

3.2.5. Técnicas experimentales

3.2.5.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot

Para determinar los niveles de expresión de AhR, ARNT, AhRR y Cyp1B1 las muestras se diluyeron en tampón de carga (Laemmli + β-mercaptoetanol) para que hubiese un total de 30 µg de proteína en un volumen final de 20 µL. Las proteínas de cada muestra se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y se separaron mediante electroforesis en gel al 7% P/V de poliacrilamida-SDS A 150 mV. Tras la separación de las proteínas, se realizó la transferencia de las mismas a membranas de PVDF (Amersham Bioscience). Una vez transferidas a las membranas, éstas se bloquearon con leche desnatada al 5% en TBST (0,05 % Tween 20 en TBS) durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se incubaron con el anticuerpo

primario correspondiente a 4°C durante 24 horas en agitación. Al finalizar la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios acoplados a peróxidasa de rábano conjugada a IgG (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas de proteína se detectaron añadiendo el reactivo quimioluminiscente basado en el luminol *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad). Para el revelado de las membranas se utilizó un equipo de imagen *Odyssey* (Li-Cor). El análisis densitométrico de las bandas se realizó mediante el software *ImageJ*.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Casa comercial
Anti AhR	Conejo	1:500	Enzo Life Sciences
Anti ARNT	Conejo	1:500	Enzo Life Sciences
Anti Cyp1B1	Conejo	1:2000	Abcam
Anti AhRR	Ratón	1:1000	Thermo scientific
Anti Actina	Ratón	1:2000	Sigma

Tabla 3.1. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas mediante la técnica de western blot.

3.2.5.2. Real Time- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Partiendo de 1µg de ARNm, se sintetizó ADN complementario (ADNc) de cada muestra por transcripción reversa mediante el kit *Transcriptor Universal cDNA* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADNc se determinó mediante espectrofotometría y su pureza se expresó como el cociente entre los valores de absorbancia a 260 nm y a 280 nm y el cociente entre los valores 260nm y 230nm (1.8-2.0). Las muestras se guardaron a -20°C hasta su utilización. El estudio de expresión de ARNm se hizo por triplicado en un termociclador Bio-Rad iQ5 utilizando el kit *SYBR Green Master Mix* (Roche) partiendo de 700ng de ADNc. Todos los genes fueron sometidos a una desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguida de 50 ciclos de 95°C 10s, 60°C 30s y 72°C 40s. Además, se realizaron 81 ciclos de 55°C 10s para obtener la curva de melting con el fin de confirmar la

MATERIALES Y MÉTODOS

formación de un único producto de PCR. La especificidad de los *primers* utilizados para los diferentes genes se confirmó utilizando la herramienta Primer-BLAST. Para el análisis de los datos se empleó el software iQ5 (Bio-Rad). La cuantificación se llevó a cabo utilizando los valores del ciclo umbral (Ct), que es el número de ciclos requeridos para que la fluorescencia exceda el ruido de fondo, que es una línea umbral que establece el propio programa. Los valores de Ct obtenidos para cada gen se normalizaron por el Ct del gen de referencia (actina) utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = 2^{-(Ct \text{ gen} - Ct \text{ referencia})}$$

AhR (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-CGCCTCCGGGACGCAGGTGG -3' R: 5'-AAAGAAGCTCTTGGCCCTCAG -3'
Cyp1A1 (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-GGTTAACCATGACCGGGA ACT-3' R: 5'-TGCCCAAACCAAAGAGAGTGA-3'
Cyp1B1 (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-TTCCTAGAGCTGCTCAGCCACAAT-3' R: 5'-GAACGAAGTTGCTGAAGTTGCGGT-3'
Actina (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAGAA-3' R: 5'-TGTGGTGCCAGATCTTCTCCATGT-3'

Tabla 3.2. Secuencias de primers utilizados para la determinación de los niveles de ARNm por RT-PCR.

3.2.5.3. Cytometric Bead Array (CBA)

Con el objetivo de determinar los niveles de expresión proteica de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , IL-17A, IL-10 y TNF se utilizó el kit de citometría *BD Cytometric Bead Array* (BD Biosciences). Este ensayo permite discernir diferentes proteínas gracias a una unión específica a anticuerpos conjugados a microesferas de poliestireno de diferente tamaño y fluorescencia. Primero, los anticuerpos de cada proteína se conjugaron a las microesferas correspondientes según las instrucciones del fabricante. A continuación, cada estándar o muestra se dejó incubando durante una hora a temperatura ambiente con 50 μ L de la mezcla de microesferas en tubos de 75 mm. Posteriormente, se añadieron a cada tubo 50 μ L del reactivo de detección –una mezcla de anticuerpos conjugados a ficoeritrina (PE)- y se dejaron en incubación durante una hora a temperatura ambiente. Tras

lavar las muestras y la curva estándar, los tubos se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se añadieron 300 μ L de solución de lavado. Mediante un citómetro de flujo *FACSCalibur*[®] (Becton Dickinson S.A.), se realizó un análisis de dos colores. Los datos se adquirieron con el software *BD Cellquest*[™] *PRO*. Se definió una ventana de adquisición de FSC vs. SSC con el fin de excluir las partículas diferentes a las microesferas. Los datos se mostraron como diagramas de puntos de dos colores (FL-2 vs. FL-4) para así distribuir las 8 intensidades de fluorescencia de micropartículas en FL-4 a lo largo del eje Y. La curva estándar de cada citoquina se dibujó usando un modelo de ajuste logístico de 4 parámetros (concentración del calibrador de proteína vs. intensidad de fluorescencia media –MFI– en FL-2). La concentración de cada citoquina de las muestras se determinó de acuerdo a su curva estándar. A los valores por debajo del valor mínimo de la curva estándar se les asignó una concentración de 0 pg/mL.

3.2.5.4. Tinción de Nissl

Las secciones de cerebro se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar, se hidrataron en agua destilada y se tiñeron con una solución al 0,5% de acetato de violeta de cresilo (Sigma Aldrich). Una vez teñidos, y con el objetivo de deshidratarlos, los cortes se sometieron a una gradación creciente de alcoholes (75%, 90% y 100% de etanol), posteriormente se sumergieron en xileno (Sigma Aldrich) y, por último, se montaron con el medio de montaje DPX (Sigma Aldrich).

3.2.5.5. Inmunofluorescencia

Tras varios lavados con PBS 1X, los cortes se bloquearon durante 2 horas en PBS 1X con 0.25% de tritón X-100 y 5% de suero (solución de bloqueo) con el objetivo de permeabilizarlos y bloquear las uniones inespecíficas. Seguidamente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario, diluido en solución de bloqueo, durante una noche a 4°C y en agitación. Tras varios lavados en PBS 1X, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente. En el caso de requerir una amplificación de la señal se utilizó el sistema biotina-estreptavidina. Una vez finalizadas las incubaciones, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados con medio de montaje para fluorescencia *Aqua-Poly/Mount* (Polysciences, INC.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Anticuerpo terciario	Suero de bloqueo
Anti AhR de conejo (Enzo life Sciences) 1:250	Anti IgG de conejo biotinilado (cabra) (Vector lab.) 1:250	Alexa 488 estreptavidina (Thermo) 1:500	Suero de cabra
Anti NeuN de ratón (Chemicon) 1:200	Anti IgG de ratón Cy3 (burro) (Thermo) 1:300	---	Suero de burro
Anti GFAP de gallina (Thermo) 1:500	Anti IgG de gallina Cy3 (cabra) (Thermo) 1:300	Alexa 555 estreptavidina (Thermo) 1:500	Suero de cabra
Anti IBA1 de conejo (Wako) 1:500	Anti IgG de conejo biotinilado (cabra) (Vector lab.) 1:250	---	Suero de cabra
Anti CD31 de rata (BD biosciences) 1:300	Anti IgG de rata biotinilado (cabra) (Vector lab.) 1:250	Alexa 555 estreptavidina (Thermo) 1:500	Suero de cabra
Anti beta amiloide de ratón (Biolegend) 1:250	Anti IgG de ratón Alexa 488 (burro) (Thermo) 1:300		Suero de burro

Tabla 3.3. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas e identificación de células en tejido mediante inmunofluorescencia.

3.2.5.6. Detección de ligandos de AhR en plasma sanguíneo

Para medir los niveles de ligando de AhR en plasma se utilizó un ensayo basado en la enzima luciferasa. Este ensayo consiste en la co-transfección de dos construcciones de ADN. La primera de las construcciones expresa la luciferasa de luciérnaga bajo un promotor mínimo que contiene varios elementos XRE (xenobiotic responsive elements; expresión inducible por activación de AhR. La segunda construcción, que sirve como control de la transfección, expresa la luciferasa de renilla bajo el promotor CMG.

Para este experimento se utilizó la línea celular HepG2, que deriva de hepatocarcinoma humano. Las células se crecieron en forma de monocapa en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (Gibco) (medio completo). Las células se incubaron en una atmósfera húmeda a 37°C y al 5% CO₂, renovando el medio cada 48 horas. Además, una vez alcanzada la máxima confluencia, se realizaba un pase de las células mediante tripsinización.

El día previo a la transfección, se sembraron 800.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. El día de la transfección, cuando las células habían alcanzado un 80%

de confluencia aproximadamente, se transfectaron con el reactivo *SuperFect®* (Qiagen), según las indicaciones del fabricante. Brevemente, el ADN se disolvió a una concentración de 1,7 µg/µL en medio DMEM con un 20% vol/vol del reactivo *SuperFect®* y esta solución se dejó incubando durante 10 minutos. Tras la incubación, la solución se disolvió al 10% en medio completo. Después, se añadieron 600 µL de la mezcla a cada pocillo, previamente lavados con PBS, y la placa se mantuvo en condiciones de incubación durante 3 horas. Al terminar la incubación, se aspiró el medio y, tras un lavado con PBS, las células se incubaron en tripsina al 0,05% (p/V)-EDTA 0,5 mM (Gibco) hasta que se despegaron de la placa. Para inactivar la tripsina se añadieron 3 volúmenes de medio completo y las suspensiones celulares se recogieron en tubos de polipropileno que se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en 1 mL de medio completo. El número de células se contó mediante una cámara de Neubauer. En placas de 24 pocillos, se sembraron 80.000 células/pocillo, que se mantuvieron en condiciones de incubación durante 6 horas. Tras este tiempo, se aspiró el medio de los pocillos y se añadieron las diferentes condiciones utilizadas en el experimento por triplicado. La actividad luciferasa se midió 24 horas post-transfección en un luminómetro. Utilizando el sistema *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se aspiró el medio de cada pocillo y se añadieron 80 µL del tampón de lisis *Passive Lysis Buffer* en cada uno de ellos, dejándolo durante 15 minutos en agitación. Se recogió el volumen completo del tampón de lisis y se transfirió a microtubos de polipropileno. Para la medida de la actividad luciferasa de luciérnaga en el luminómetro se mezclaron 20 µL de extracto celular con 50 µL del reactivo *LAR II*. Tras esta primera lectura, se añadieron 50 µL del reactivo *Stop&Glo* que detiene la reacción de la luciferasa y contiene el sustrato para la reacción de la luciferasa de renilla y se volvió a medir la actividad luciferasa. Para representar los valores obtenidos se calculó la actividad luciferasa relativa luciérnaga/renilla y se expresaron como porcentaje de inducción respecto al control negativo.

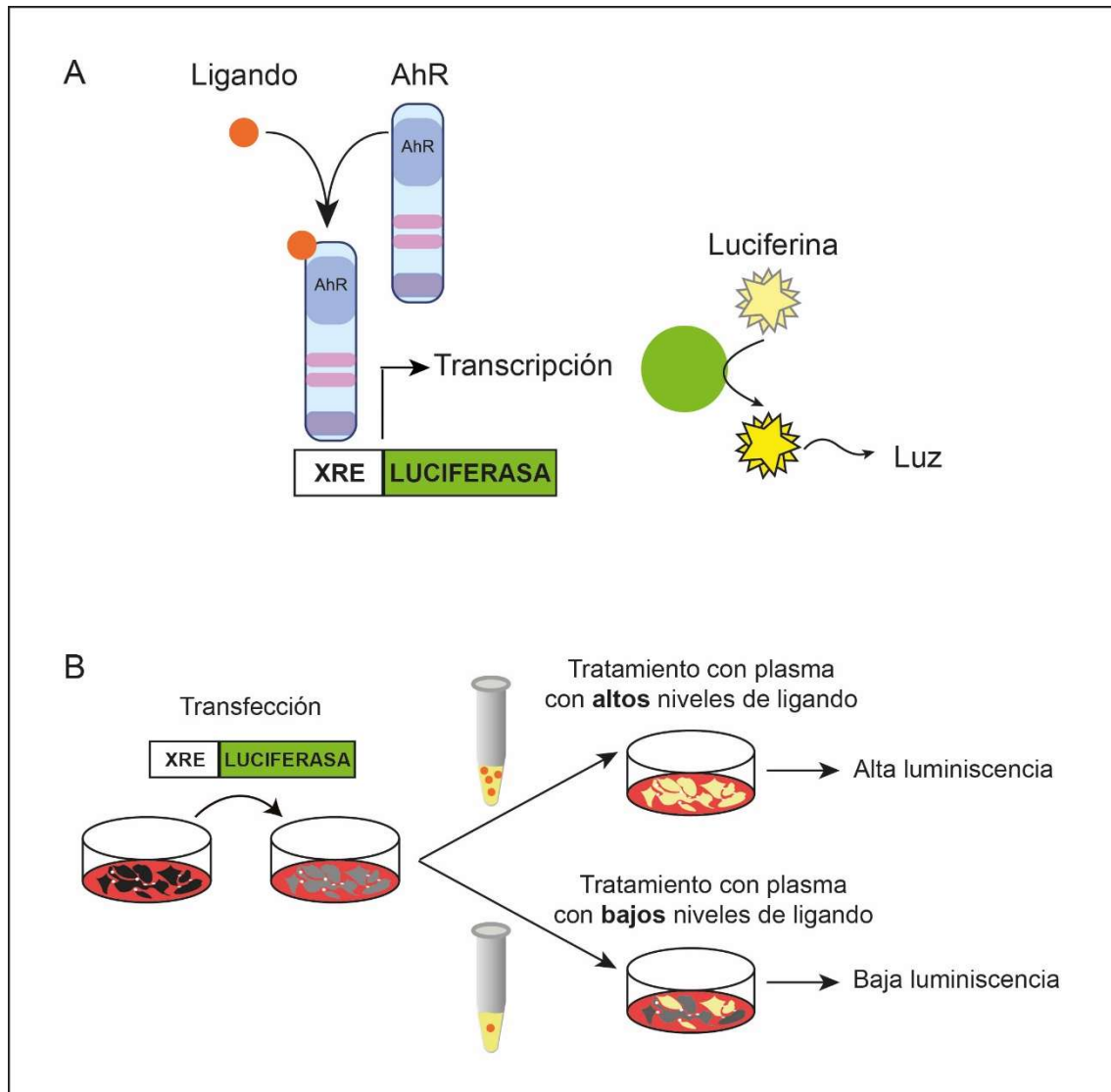


Figura 3.3. Detección de la actividad luciferasa en plasma. **A:** Esquema representativo del mecanismo de la luciferasa. La construcción de ADN contiene el gen de la luciferasa bajo el promotor XRE. Cuando el ligando activa AhR, éste se une a la secuencia XRE e inicia la transcripción de la enzima. Al añadir luciferina, esta molécula es oxidada por la luciferasa en una reacción que emite luz. **B:** esquema representativo del experimento. En un primer paso, se transfectan las células HEPG2 con la construcción de ADN. Una vez realizada la transfección, las células se tratan con el plasma del animal. Si el plasma tiene una alta concentración de ligandos, habrá una mayor activación de AhR, una mayor transcripción de luciferasa y, por lo tanto, al añadir la luciferina, se emitirá una mayor cantidad de luz.

Las condiciones fueron las siguientes:

- Control negativo: medio completo (DMEM + 10% de suero fetal bovino)
- Control positivo: TCDD a 100 nM en medio completo.
- Estudios en ratón:

- Condición joven: DMEM + 10% de plasma de ratón de 2 meses de edad.
- Condición envejecido: DMEM + 10% de plasma de ratón de 24 meses de edad.
- Estudios en humano
 - Condición joven: DMEM + 10% de plasma de voluntarios de entre 18 y 30 años.
 - Condición envejecido: DMEM + 10% de plasma de voluntarios mayores de 65 años.

3.2.5.7. Preparación de las muestras para la detección de triptófano, L-kinurenina y ácido kinurénico

La detección de triptófano y de sus metabolitos L-kinurenina y ácido kinurénico se realizó por espectroscopía de masas gracias a una colaboración con los profesores Luis Chicharro y Fernando Bandrés de la Universidad Complutense de Madrid. Para ello, se cogieron 20 μL de plasma de ratón a los que se añadieron tres partes de acetonitrilo (ACN). Las proteínas se precipitaron por centrifugación y se recogieron 20 μL del sobrenadante. Con el fin de derivatizar la muestra se añadieron 10 μL de carbonato sódico a una concentración de 100 mM y 10 μL de cloruro de benzoílo al 2% en ACN. Para parar la reacción se añadieron 50 μL de agua destilada y se procedió a desecar las muestras a 40°C bajo una corriente de nitrógeno. Las muestras se reconstituyeron en formiato de amonio a una concentración de 10 mM y ACN en una relación 1:1 para su posterior análisis mediante espectroscopía de masas.

3.2.6. Análisis de imágenes y cuantificación densitométrica

3.2.6.1. Estudio de la expresión de AhR

La visualización y la toma de microfotografías de la expresión de AhR, así como los estudios de colocalización con diferentes marcadores celulares, se realizó

MATERIALES Y MÉTODOS

mediante un microscopio confocal Zeiss LSM710 y el software ZEN 2009 (Carl Zeiss Microimaging GmbH).

3.2.6.2. Análisis de astrocitos y microglía en hipocampo

Para llevar a cabo la cuantificación tanto de astrocitos como de microglía se tomaron microfotografías mediante un microscopio confocal Zeiss a un objetivo de 63x (134 μm x 134 μm). En total se tomaron 18 fotografías por animal, distribuidas en 3 secciones coronales de hipocampo (desde bregma -1 a -3). Se contaron como células positivas aquellas que tenían doble marcaje con el marcador nuclear TOPRO-3 y con GFAP, en el caso de los astrocitos, y con IBA-1, en el caso de la microglía. El análisis densitométrico de estas mismas fotografías se realizó mediante el software ImageJ tal y como se ha descrito previamente (Bravo-Ferrer et al. 2017).

3.2.6.3. Contaje de placas de β -amiloide

Para el análisis de las placas de β -amiloide en hipocampo se tomaron microfotografías mediante un microscopio confocal Zeiss a un objetivo de 20x (450 μm x 450 μm). De cada animal se analizaron 7 secciones coronales de cerebro desde bregma -1 a -3, en cada una de las cuales se hizo un mapeo completo de uno de los dos hipocampos. El procesamiento de imágenes se realizó con el software ImageJ. En cada una de ellas se cuantificó el área total de marcaje positivo y el número de placas presentes, así como su tamaño medio.

3.2.7. Imágenes de resonancia magnética

Los estudios de imagen de resonancia magnética (IRM) se realizaron en el CAI de RMN y RSE de la UCM.

3.2.7.1. Evaluación de los volúmenes de cerebro, corteza, ventrículos e hipocampo

Los estudios de imagen de resonancia magnética para la evaluación volumétrica de las estructuras cerebrales se realizaron utilizando el equipo de IRM de sobremesa ICON-1T (Icon (1T-MRI); Bruker BioSpin GmbH). El sistema consiste

en un imán permanente de 1 Tesla con una bobina de gradientes que proporciona un gradiente máximo de 450 mT/m. Además, tanto el sistema de monitorización de las constantes vitales como la bobina de radiofrecuencia empleada (bobina solenoidal de cabeza de ratón de 2,3 cm de diámetro interno) están integrados en la cama-soporte del equipo lo que permite el posicionamiento preciso del animal en la bobina, pudiendo controlar tanto la anestesia (ritmo respiratorio) como la temperatura corporal.

El estudio mediante IRM se centró en la evaluación del volumen de las distintas estructuras cerebrales mediante la obtención de imágenes potenciadas en T2 (T2WI, T2-weighted imaging). Se adquirieron imágenes T2WI tridimensionales utilizando una secuencia eco de espín rápido (FSE, fast spin echo), con un tiempo de repetición (TR) = 2500 ms, longitud del tren de eco = 12, intervalo inter-eco = 19 ms (resultando un tiempo de eco efectivo (TEEFECTIVO) = 95 ms), número de promedios = 1, campo de visión (FOV, field of view) = $18 \times 18 \times 14 \text{ mm}^3$. El tamaño de la matriz adquirida fue de $120 \times 120 \times 128$ (resolución $0.150 \times 0.150 \times 0.500 \text{ mm}^3$) y el tiempo total de adquisición de ~ 8 minutos. Los datos de IRM se procesaron empleando el software libre ImageJ.

3.2.7.2. Resonancia magnética con tensor de difusión (Diffusion tensor imaging; DTI)

Los experimentos de DTI se llevaron a cabo en el equipo de IRM Bruker Biospec BMT 47/40 (Bruker Biospin). Este equipo posee un campo magnético de 4.7 Teslas y está equipado con un sistema de gradientes de campo magnético de 6 cm de diámetro interno capaz de alcanzar un gradiente de 450 mT/m. Para la realización de los experimentos se eliminó todo el exceso de paraformaldehído de la muestra y se introdujo en Fluorinert FC 40 (Sigma Aldrich) dentro de un soporte adecuado. La muestra se introdujo en una antena de radiofrecuencia de volumen de 3 cm de diámetro interno. Para la realización de los experimentos de DTI se empleó una secuencia de eco de espín (TR/TE= 3500/30 ms) y se adquirieron 2 imágenes sin potenciación de difusión y 12 direcciones de difusión diferentes con un factor b de 1000 s/mm^2 . Para el cálculo de los mapas de la anisotropía fraccional se empleó el programa ParaVision 6.0.1 (Bruker Biospin) empleando la siguiente definición:

MATERIALES Y MÉTODOS

$$FA = \frac{\sqrt{3((\lambda_1 - \langle \lambda \rangle)^2 + (\lambda_2 - \langle \lambda \rangle)^2 + (\lambda_3 - \langle \lambda \rangle)^2)}}{\sqrt{2(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2)}}$$

donde λ_1 , λ_2 , y λ_3 corresponden a los autovalores del tensor D_{ij} definido como

$$A(b) = A(0) \times \exp\left(-\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 b_{ij} D_{ij}\right)$$

donde $A(b)$ es la intensidad de la señal de la imagen potenciada en difusión, $A(0)$ corresponde a la intensidad de la señal en ausencia de la potenciación de difusión y la matriz b_{ij} corresponde al factor b que mide la potenciación de difusión de las imágenes.

Los mapas de FA se procesaron empleando el programa ImageJ.

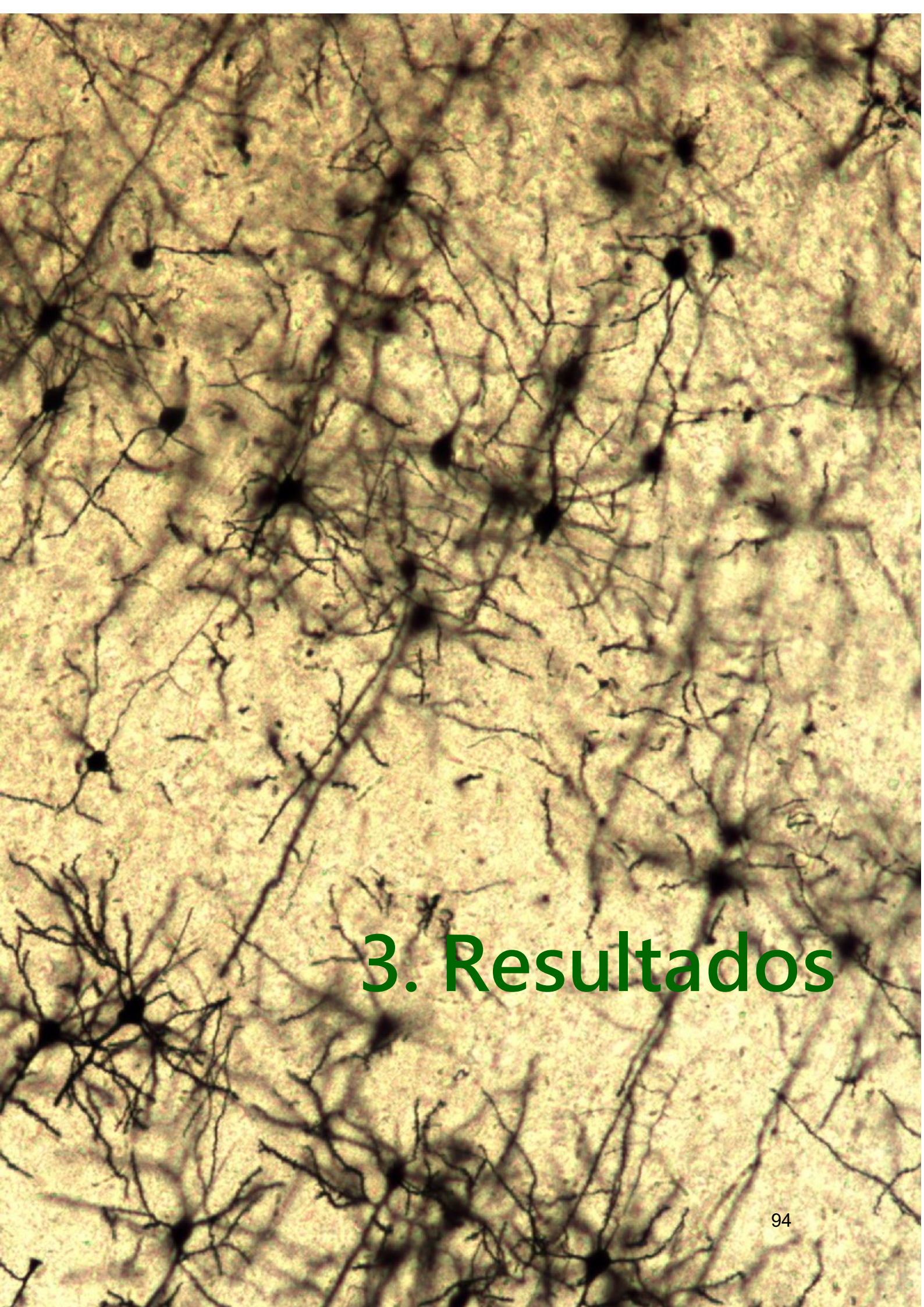
3.2.8. Obtención de muestras de plasma de humano

Las muestras de plasma humano se obtuvieron de donantes sanos que proporcionaron por escrito un consentimiento informado. La sangre de estos donantes procede de los controles de un estudio en marcha aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital 12 de Octubre.

3.2.9. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa *Prism 5.0* (GraphPad Software *INC.*). En todos los casos, de cada grupo comparativo se analizó su distribución mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de los grupos cuya distribución pasara la prueba de normalidad, las comparaciones se realizaron con test paramétricos; en el caso contrario, los test realizados fueron no paramétricos. En las comparaciones de dos grupos se realizó el test de t de Student como test paramétrico y el test de Mann-Whitney como test no paramétrico. Para las comparaciones de 3 o más grupos se utilizó el test de ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc de

Bonferroni para las comparaciones grupo a grupo. En los que se analizaron dos variables, el estudio estadístico se realizó mediante el test de ANOVA de dos vías, seguido también de una prueba post-hoc de Bonferroni para las comparaciones grupo a grupo.



3. Resultados

4.1. Regulación de AhR por la edad

4.1.1. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR en cerebro

4.1.1.1 Efecto de la edad en la expresión de AhR en cerebro

Con el propósito de determinar los posibles cambios asociados a la edad en la señalización por AhR, nuestro primer objetivo consistió en el estudio de la expresión de AhR en el cerebro en ratones jóvenes (2 meses de edad) y ratones envejecidos (24 meses de edad). Nos centramos en tres estructuras que, por su implicación en las capacidades cognitivas y motoras, consideramos de interés en el contexto del envejecimiento: corteza, hipocampo y estriado.

El análisis de la expresión proteica se realizó mediante western blot. La cuantificación densitométrica de la banda de AhR (95 KDa) reveló que, tanto en corteza como en hipocampo, se produce una disminución de la expresión de AhR en los ratones envejecidos respecto a los jóvenes (**Figura 4.1 B y C**). Sin embargo, en el estriado, no se observaron diferencias con la edad (**Figura 4.1 D**).

Para confirmar estos resultados, analizamos la expresión de AhR mediante inmunofluorescencia en secciones coronales de ratón. En la corteza, observamos una menor intensidad de marcaje en los animales envejecidos respecto a los animales jóvenes, principalmente en las capas más profundas (**Figura 4.1 E**). En hipocampo, los ratones de menor edad presentaron un fuerte marcaje para el receptor en el giro dentado. También se observó un claro marcaje en CA3 y algo más puntual en la región de CA1. Por el contrario, en las secciones de hipocampo de los ratones envejecidos apenas se detectó marcaje para AhR (**Figura 4.1 F**).

Con la intención de determinar en qué tipo celular se expresa AhR tanto en los ratones jóvenes como en los envejecidos, se realizaron estudios de colocalización mediante microscopía confocal en corteza y en hipocampo. La inmunofluorescencia para AhR (en rojo) se combinó con distintos marcadores específicos para distintos tipos celulares que incluían NeuN (verde) como marcador de neuronas post-mitóticas, GFAP (azul como marcador de astrocitos, e IBA1 (verde), marcador de microglía).

RESULTADOS

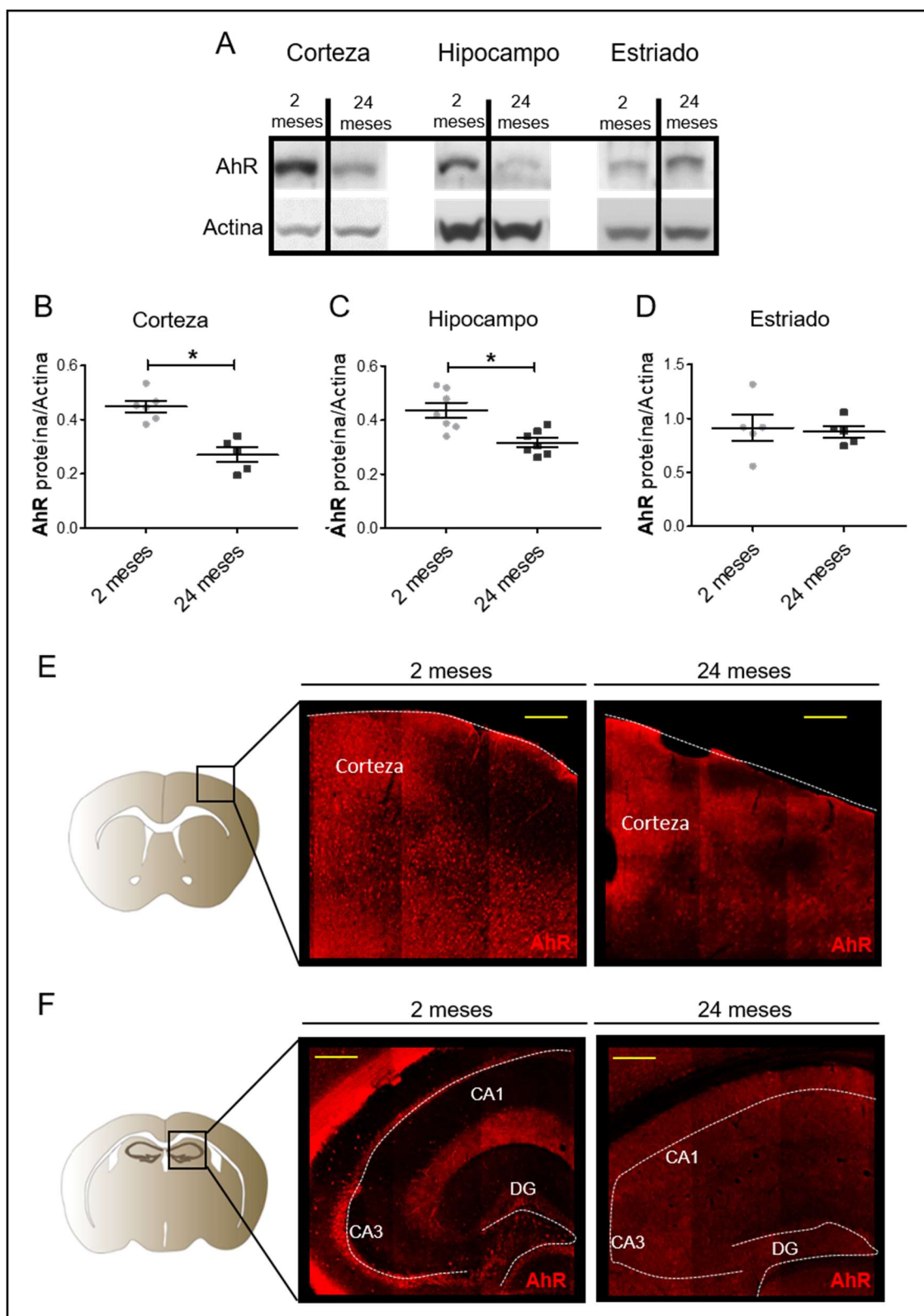


Figura 4.1. Efecto de la edad en la expresión proteica de AhR en cerebro. (A) Panel representativo con los resultados obtenidos en la expresión proteica en corteza, hipocampo y estriado mediante western blot. (B-D) Cuantificación densitométrica de la expresión de AhR normalizado por los niveles de actina de cada muestra. La media se representa en la línea central \pm SEM. Datos analizados mediante t de student ($n=5$ por grupo, $*p<0.05$). (E) Imágenes representativas del marcaje para AhR en la corteza de animales jóvenes (izquierda) y envejecidos (derecha). (F) Imágenes representativas del marcaje para AhR en hipocampo dorsal. Barra de escala de 125 μ m.

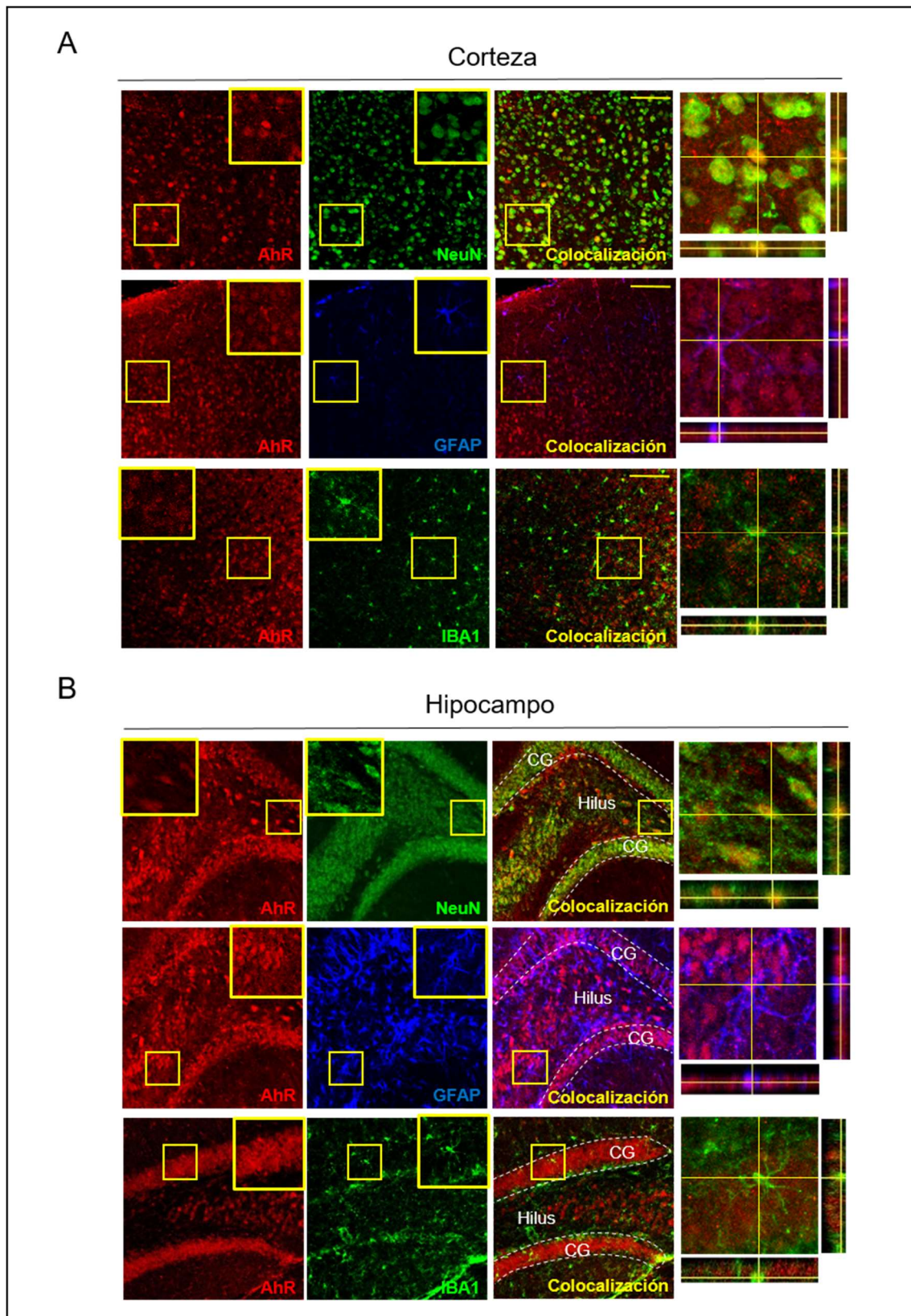


Figura 4.2. Localización celular de AhR en la corteza e hipocampo de animales jóvenes. Doble inmunofluorescencia de AhR (rojo) en combinación con el marcador neuronal NeuN (verde) (panel superior), con el marcador astrocitario GFAP (azul) (panel central) y con el marcador de microglía IBA1 (verde) (panel inferior) en corteza (A) e hipocampo (B). A la izquierda se muestra una ampliación con la proyección ortogonal. Barra de escala de 100 μm. Aumentos: 100x100 μm.

RESULTADOS

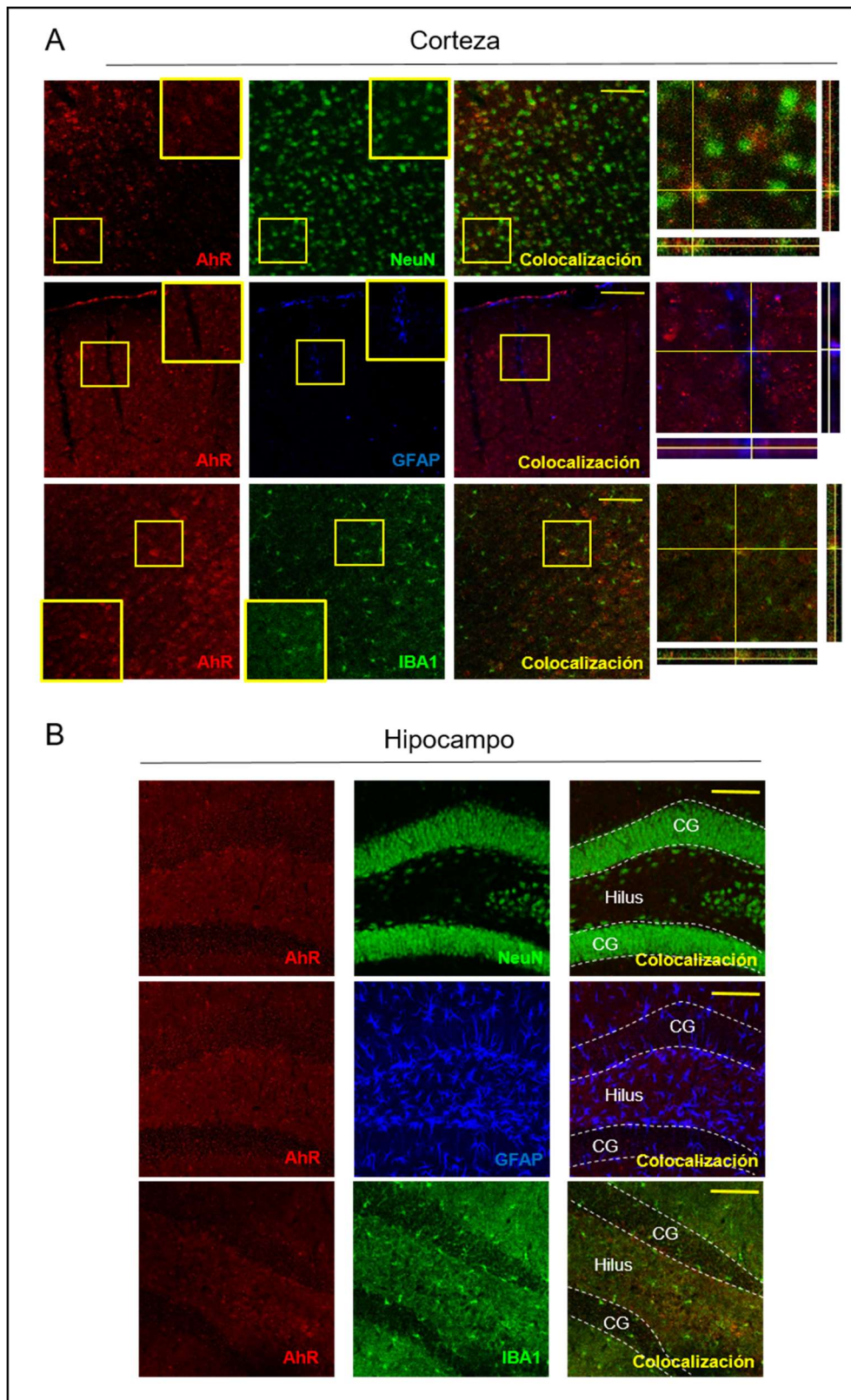


Figura 4.3. Localización celular de AhR en la corteza e hipocampo de animales envejecidos. Doble inmunofluorescencia de AhR (rojo) en combinación con el marcador neuronal NeuN (verde) (panel superior), con el marcador astrocitario GFAP (azul) (panel central) y con el marcador de microglía IBA1 (verde) (panel inferior) en corteza (**A**) e hipocampo (**B**). A la izquierda se muestra una ampliación con la proyección ortogonal. Barra de escala de 100 μ m. Aumentos: 100x100 μ m

En los ratones jóvenes, tanto en hipocampo como en corteza, AhR se localizó principalmente en neuronas (NeuN⁺) (Figuras 4.2). También pudimos detectar alguna colocalización puntual con células GFAP⁺ pero en ningún caso con células IBA1⁺. En la corteza de los animales de 24 meses, la inmunorreactividad para AhR también se localizó en las neuronas (Figura 4.3 A). En este grupo, no llegamos a detectar ninguna colocalización con astrocitos o microglía. En lo que respecta al hipocampo, apenas pudimos detectar marcaje para AhR en los animales envejecidos por lo que no pudimos confirmar colocalización con ningún tipo celular concreto (Figura 4.3B).

4.1.1.2. Efecto de la edad en la expresión de ARNT en corteza e hipocampo

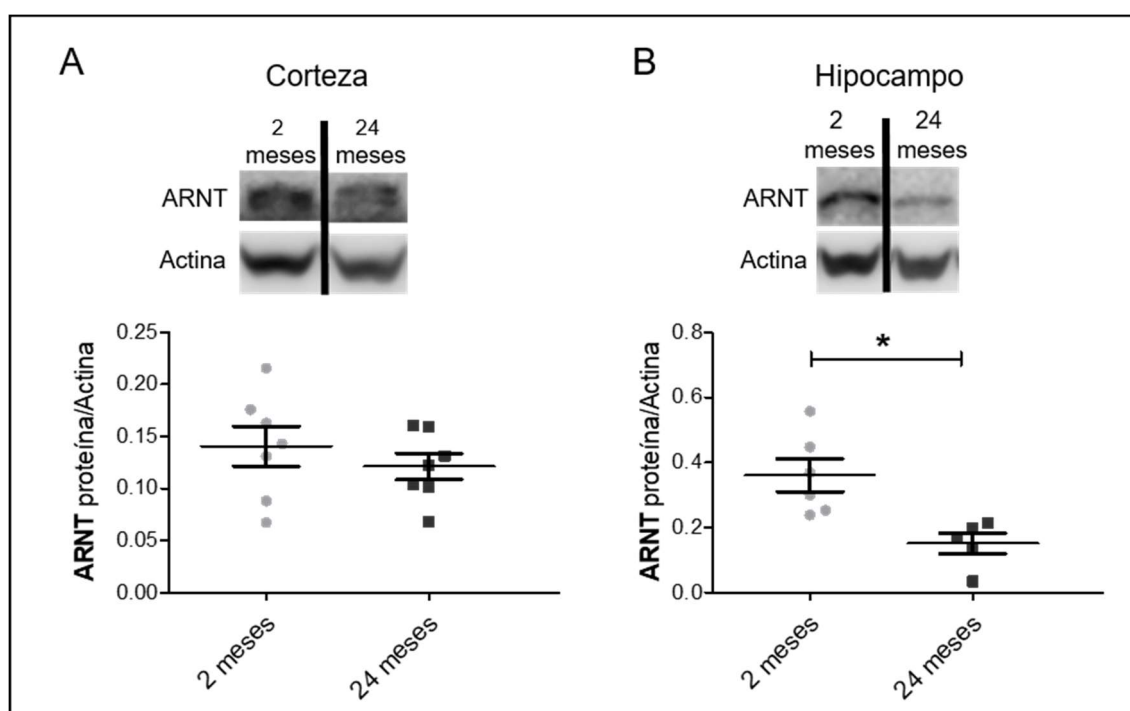


Figura 4.4. Efecto de la edad en la expresión proteica de ARNT en corteza e hipocampo. Cuantificación densitométrica de la expresión proteica de ARNT en corteza (A) e hipocampo (B) en animales de 2 y 24 meses normalizado por los niveles de actina de cada muestra. Los paneles superiores muestran los resultados representativos obtenidos en el western blot. La media se representa en la línea central ± SEM. Datos analizados mediante t de student (n=5-6 por grupo, *p<0.05).

Como se ha explicado en la introducción, AhR necesita dimerizar con ARNT para ejercer su función como factor de transcripción. Por esta razón, quisimos evaluar si los niveles de esta proteína variaban en función de la edad en aquellas estructuras en las que habíamos detectado una disminución del receptor en los animales envejecidos.

RESULTADOS

Mientras que en corteza no detectamos ninguna diferencia entre los ratones jóvenes y los ratones envejecidos (**Figura 4.4 A**), en hipocampo, el análisis densitométrico por western blot reveló que en los animales de 24 meses se produce un descenso de la expresión proteica de ARNT, tal y como ocurría con AhR (**Figura 4.4 B**).

4.1.1.3. Efecto de la edad en la función de AhR en cerebro

Tras los cambios detectados a nivel de expresión, quisimos evaluar el nivel de funcionalidad de AhR como factor de transcripción en el cerebro. Con esta intención, nos planteamos un experimento de activación aguda del receptor en el que se inyectó i.p. a animales de 2 y 24 meses el agonista específico FICZ o el correspondiente vehículo (**Figura 4.5. A**). Doce horas más tarde, los animales fueron sacrificados para la extracción del ARNm total del cerebro completo y los niveles de Cyp1A1 y Cyp1B1, genes diana de AhR, se analizaron mediante RT-PCR. Estos dos genes fueron escogidos por su diferencia en el patrón de expresión: mientras que el primero es más inducible, el segundo se considera más constitutivo (Hakkola et al. 1997).

A nivel basal, para el gen Cyp1A1, no encontramos diferencias de expresión entre los animales jóvenes y los animales envejecidos; sin embargo, los niveles de Cyp1B1 fueron significativamente mayores en los animales de 24 meses respecto a los animales jóvenes (**Figuras 4.5 B**). El tratamiento con FICZ, por su parte, produjo una inducción de 3 órdenes de magnitud en los niveles de Cyp1A1 en ambos grupos, sin diferencias significativas entre ellos (**Figura 4.5 C**). Los niveles de Cyp1B1 también se incrementaron tras la activación aguda de AhR y, si bien el efecto no fue tan fuerte como en el caso anterior, el agonista duplicó los valores de expresión del gen. Al igual que en ausencia de tratamiento, se observó que la expresión de Cyp1B1 era mayor en los animales envejecidos (**Figura 4.5 C**).

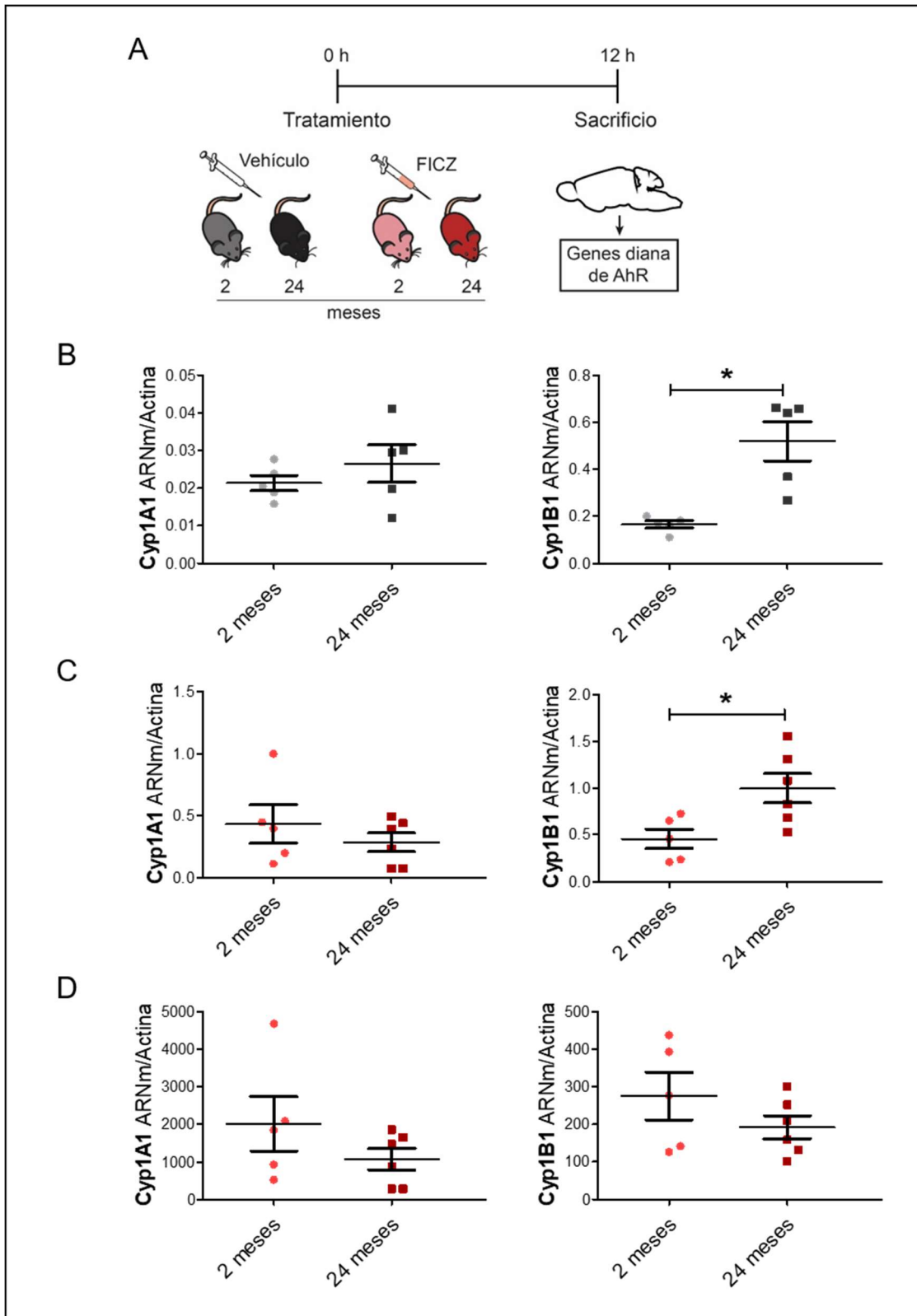


Figura 4.5. Efecto de la edad en la expresión de los genes diana de AhR en cerebro en condiciones basales y tras activación aguda. (A) Representación esquemática del diseño experimental. (B) Análisis de los niveles cerebrales de ARNm de Cyp1A1 y Cyp1B1 en condiciones basales y (C) 12 horas tras la administración de FICZ. (D) Porcentaje de inducción tras activación aguda con FICZ respecto al grupo tratado con vehículo. Datos representados como media \pm SEM. Datos analizados mediante *t* de student ($n=3-5$ por grupo, $*p<0.05$ vs 2 meses).

RESULTADOS

Al representar los datos de los animales tratados con FICZ como porcentaje de inducción respecto al vehículo no se detectaron diferencias entre los animales de menor y de mayor edad en ninguno de los dos genes (**Figura 4.5 D**). Esto último sugiere que, a pesar de la disminución de la expresión de AhR en los animales envejecidos, la respuesta del receptor ante una activación aguda es similar entre los animales de 2 y de 24 meses.

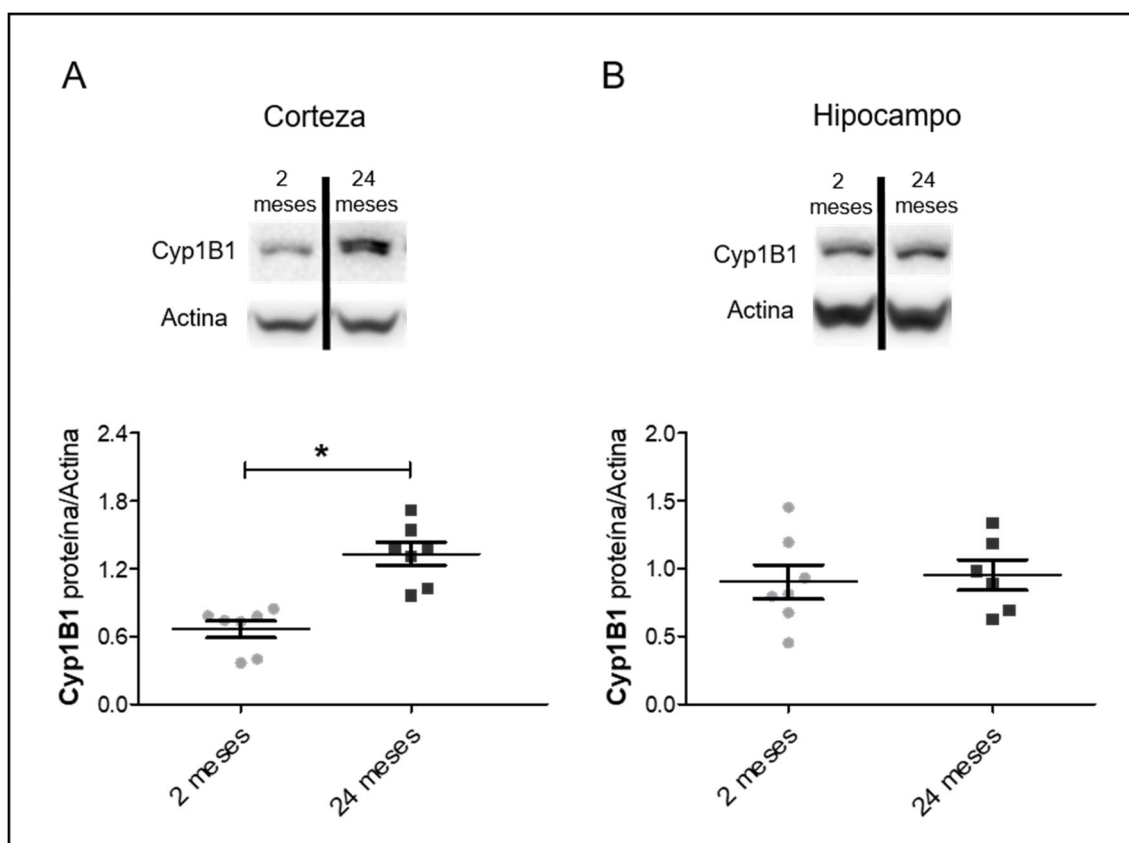


Figura 4.6. Efecto de la edad en la expresión proteica de Cyp1B1 en corteza e hipocampo. Cuantificación densitométrica de la expresión proteica de Cyp1B1 en corteza (A) e hipocampo (B) en animales de 2 y 24 meses normalizado por los niveles de actina de cada muestra. Los paneles superiores muestran los resultados representativos obtenidos en el western blot. La media se representa en la línea central \pm SEM. Datos analizados mediante *t* de student ($n=5-6$ por grupo, $*p<0.05$).

Por lo tanto, los datos mostrados indican que los niveles de expresión de Cyp1B1 son mayores en los ratones de 24 meses respecto a los de 2 meses en el cerebro completo. Dado que las diferencias en la expresión de AhR se habían detectado en corteza e hipocampo, quisimos averiguar si este aumento se mantenía al analizar estas dos regiones por separado. Por esta razón, cuantificamos, mediante western blot, los niveles de proteína de Cyp1B1 tanto en corteza como en hipocampo de animales jóvenes y envejecidos en condiciones basales (**Figura 4.6**). En la corteza

observamos un incremento significativo de los niveles de esta proteína en el grupo de más edad; sin embargo, en el hipocampo no encontramos diferencias entre ambos grupos.

4.1.2. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR a nivel periférico

4.1.2.1. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR a nivel periférico: hígado

Como se ha descrito en la introducción, algunos de los ligandos de AhR pueden ser metabolizados tras la activación de éste con la subsiguiente transcripción de la batería de genes diana que codifican para enzimas metabolizadoras. Dada la importancia del hígado en el metabolismo del organismo, creímos interesante explorar los cambios asociados a la edad en la expresión y función de AhR en este órgano.

Respecto a su expresión, el análisis mediante RT-PCR mostró una tendencia a un aumento de los niveles de ARNm de AhR en los animales envejecidos respecto a los animales jóvenes; no obstante, las diferencias no llegaron al nivel de significación estadística (**Figura 4.7 A**). Sin embargo, a nivel de proteína, sí se observó un aumento significativo en la expresión de AhR en los animales de 24 meses respecto a los de 2 (**Figura 4.7 B**).

Además del análisis de la expresión de AhR, decidimos determinar los niveles de sus genes diana. Los resultados fueron los mismos que los obtenidos previamente a nivel cerebral: mientras que en los niveles de Cyp1A1 no se detectaron diferencias entre ambos grupos, el análisis de la expresión de Cyp1B1 reveló un aumento significativo de los niveles de ARNm del gen en los animales envejecidos respecto al grupo joven (**Figura 4.7 C**).

RESULTADOS

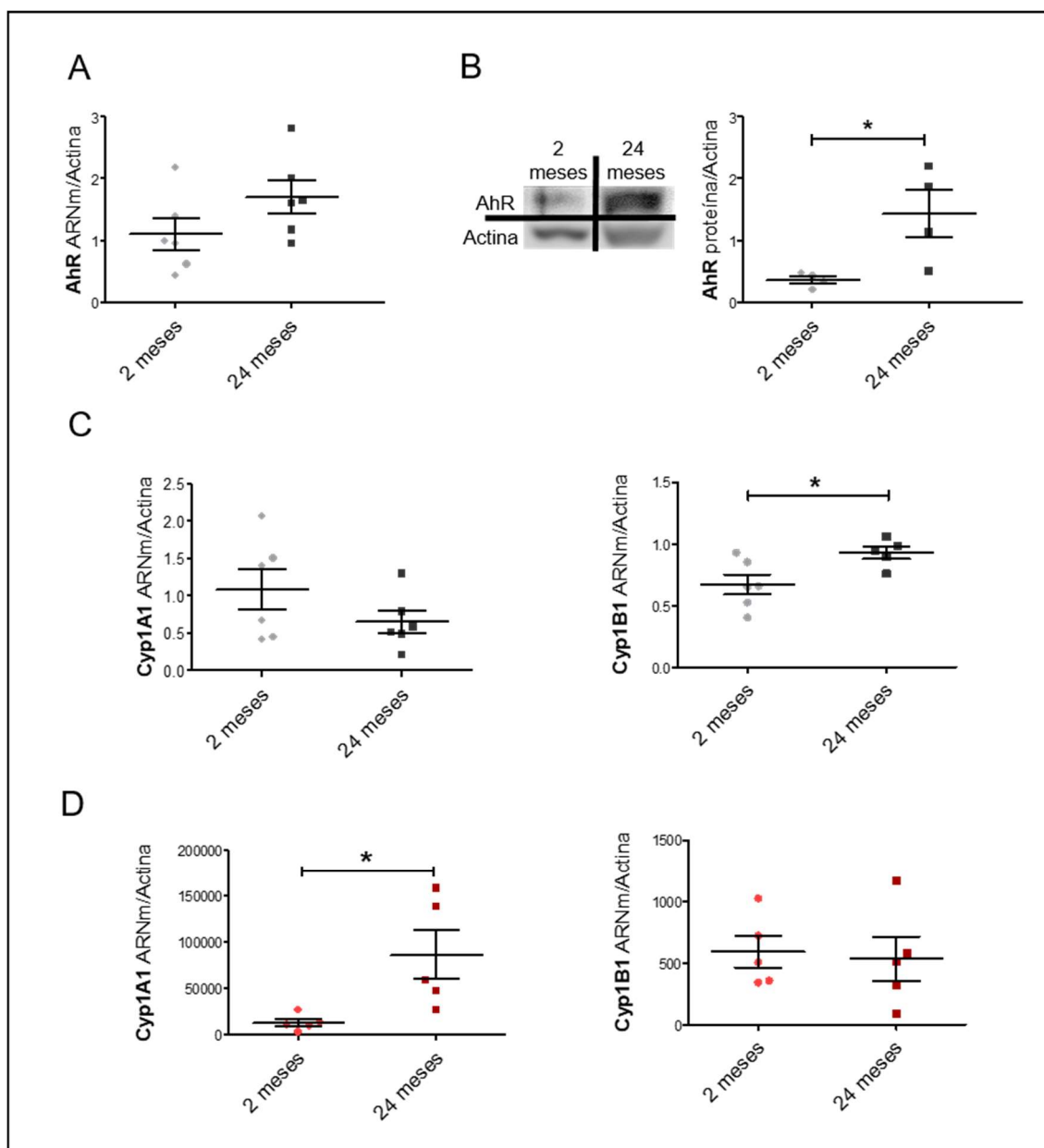


Figura 4.7. Efecto de la edad en la expresión de AhR y de sus genes diana en hígado en condiciones basales y tras activación aguda. (A) Análisis de los niveles de ARNm de AhR en hígado. (B) Análisis de los niveles de proteínas de AhR. El panel superior muestra las imágenes representativas de la inmunodetección de AhR mediante western blot. En la gráfica inferior se representa el análisis densitométrico de AhR normalizado por los niveles de actina de cada muestra. (C) Análisis de los niveles de ARNm de Cyp1A1 y Cyp1B1 en condiciones basales. (D) Porcentaje de inducción de Cyp1A1 y Cyp1B1 tras 12 horas post-tratamiento con FICZ. La media se representa en la línea central \pm SEM. Datos analizados mediante *t* de student ($n=4-6$ por grupo, $*p<0.05$).

Por último, con la intención de evaluar la funcionalidad de AhR a nivel periférico, analizamos los niveles de los genes diana tras un tratamiento agudo con un agonista. Al igual que en cerebro, el experimento consistió en la inyección i.p. del agonista FICZ o de vehículo. El sacrificio de los animales se realizó 12 horas más tarde para la extracción de ARNm del hígado. Para el gen Cyp1A1, observamos

importantes diferencias en el porcentaje de inducción respecto al vehículo: en los animales de 2 meses, los niveles tras el tratamiento se indujeron alrededor de un 12.000%, y, en los animales de 22 meses, lo hicieron un 80.000% (**Figura 4.7 D**). Este aumento en los animales envejecidos del porcentaje de inducción tras el tratamiento con agonista podría sugerir que la mayor expresión proteica de AhR en hígado en este grupo de edad se acompaña de un incremento en la función transcripcional del receptor. Sin embargo, y a pesar de la diferencia encontrada en los niveles basales para Cyp1B1, no obtuvimos ninguna diferencia entre las dos edades en el porcentaje de inducción del gen tras la activación aguda (**Figura 4.7 D**). Además, éste fue mucho menor que el observado en el gen Cyp1A1, siendo, tanto en los animales jóvenes como en envejecidos, en torno a un 500% (**Figura 4.7 D**). Estos datos, junto a los obtenidos en cerebro, corroboran que, en nuestro modelo, la inducibilidad del gen Cyp1A1 por la activación aguda de AhR es mayor que la del gen Cyp1B1.

Por otro lado, tanto a nivel periférico como a nivel del SNC, en ausencia de un estímulo agonista, la edad parece influir más en la expresión del Cyp1B1 que en los del Cyp1A1. Una razón que podría explicar estos cambios en los niveles basales de Cyp1B1 sería que con la edad se produjeran diferencias en los niveles de ligando de AhR y esto nos condujo a nuestro siguiente objetivo: el análisis de los niveles plasmáticos de agonistas del receptor.

4.1.2.2. Efecto de la edad en los niveles circulantes de ligandos de AhR

Para determinar posibles cambios en los niveles circulantes de ligandos de AhR asociados a la edad, se llevó a cabo un ensayo de actividad luciferasa acoplada a un promotor XRE (Roh et al. 2015). EL ensayo consistió en la transfección de células HepG2 con una construcción de ADN que codifica para la enzima luciferasa y que se encuentra bajo el promotor que contiene varios XRE, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. Las células fueron después tratadas con plasma procedente de animales jóvenes y animales envejecidos para el posterior análisis de

RESULTADOS

la actividad luciferasa inducida por éstos (Figura 4.8 A). Como se observa en la Figura 4.8 B, el tratamiento de las células transfectadas con el plasma de animales de 24 meses indujo un aumento de la actividad luciferasa en comparación a las células tratadas con plasma de animales 2 meses. Estos datos indican que la presencia de agonistas de AhR circulantes es mayor en los animales envejecidos que en los jóvenes.

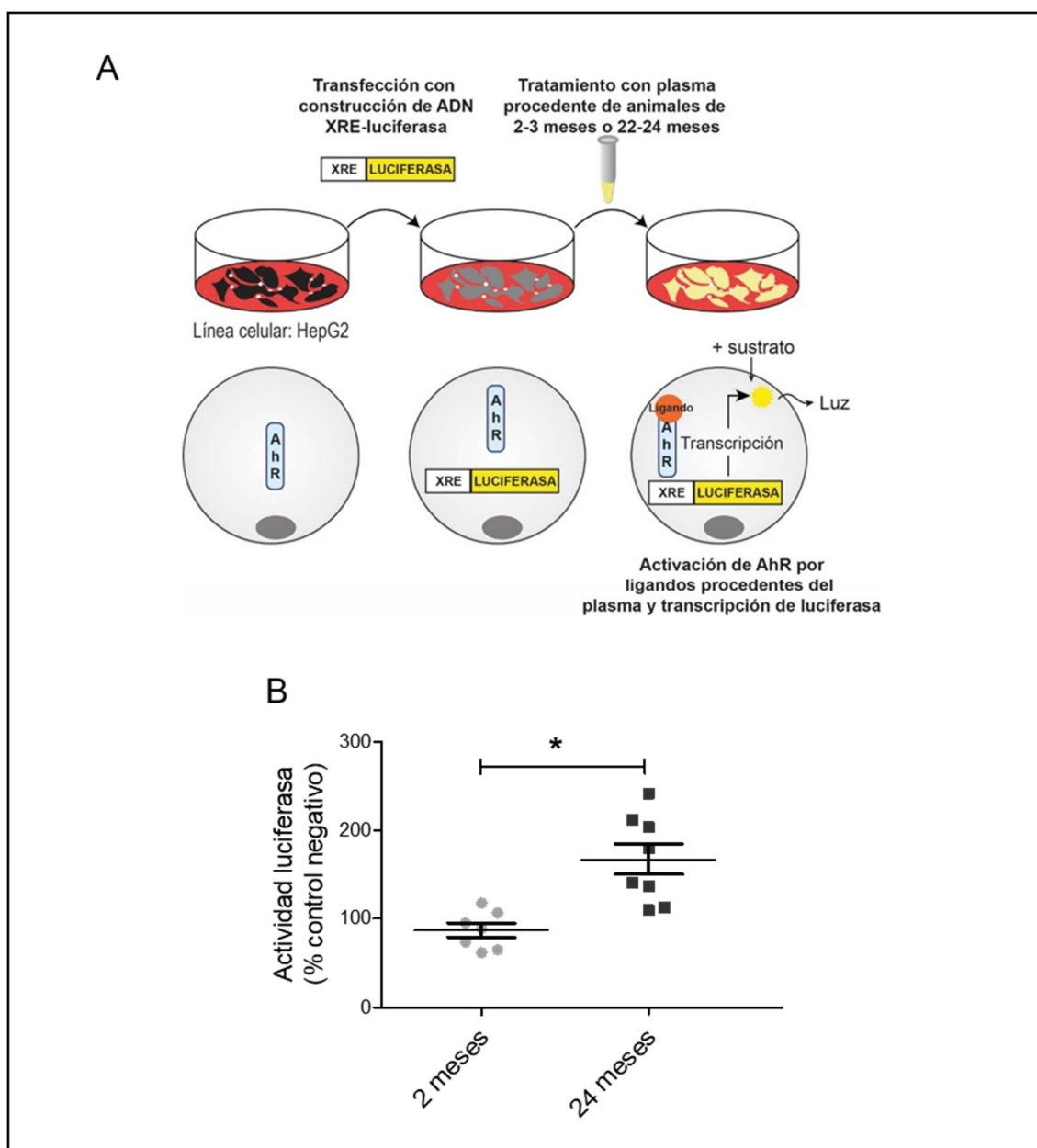


Figura 4.8. Efecto de la edad en los niveles plasmáticos de ligandos de AhR. La actividad agonista de AhR del plasma de los animales se determinó mediante un ensayo de luciferasa según el esquema representado en la figura A. (B) Análisis de los valores de actividad agonista del plasma. Los valores corresponden a la media de los duplicados de cada medida y están representados como % del control negativo. La media se representa en la línea central \pm SEM. Datos analizados mediante *t* de student ($n=7-8$ por grupo, $*p<0.05$ vs 2 meses).

A continuación, decidimos analizar la relación entre los niveles de Cyp1B1 con la capacidad agonista de AhR en plasma, observando una correlación lineal positiva entre los niveles de expresión del gen en hígado y la actividad luciferasa (Figura 4.9 C). Esta correlación apoya la implicación de la elevación de ligandos circulantes en el aumento de la expresión de Cyp1B1. Por el contrario, para los niveles de AhR y de Cyp1A1 en hígado no detectamos ningún tipo de correlación lineal con la actividad luciferasa en plasma (Figura 4.9 A y B).

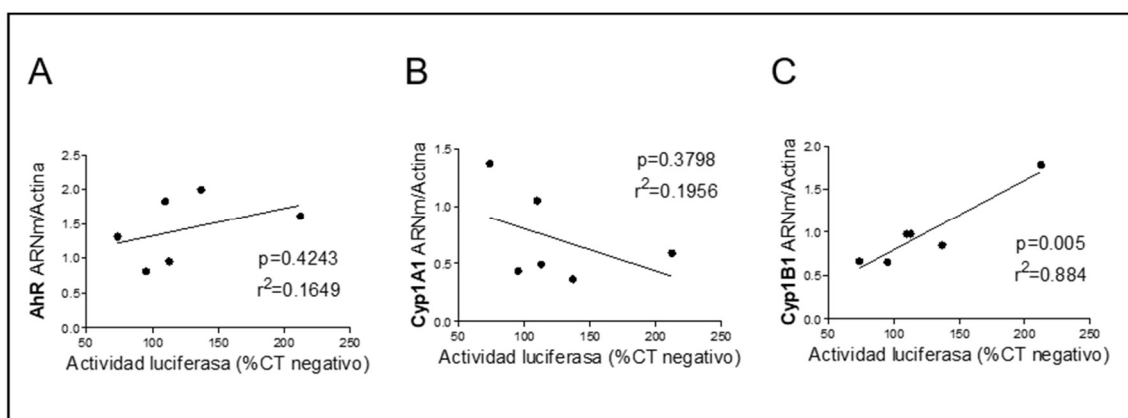


Figura 4.9. Relación entre los niveles de AhR y de sus genes diana en hígado con la actividad agonista del plasma. Análisis de la correlación entre la actividad luciferasa en plasma y el gen AhR (A), el gen Cyp1A1 (B) y el gen Cyp1B1 (C) en hígado. Datos analizados mediante *r* de Pearson (*n*=6).

Tras el aumento observado en la actividad agonista de AhR en plasma en los animales envejecidos y, dada la importancia de la ruta de las kinureninas como fuente de ligandos endógenos de AhR (Denison and Nagy 2003), decidimos explorar de forma preliminar posibles cambios asociados al envejecimiento en varios productos de esta vía. Gracias a una colaboración con los profesores Luis Chicharro y Fernando Bandrés determinamos mediante espectroscopía de masas en el plasma de los animales la relación metabólica de varios mediadores de esta ruta: la L-kinurenina (L-Kyn), procedente del triptófano (trp), y del ácido quinurénico (KYNA), derivado a su vez de la L-Kyn (Figura 4.10). Como se mencionó en la introducción, tanto la L-Kyn como el KYNA, pueden actuar como agonistas de AhR.

Aunque los datos son todavía preliminares debido al pequeño tamaño muestral, se observó un aumento significativo en la ratio L-Kyn/ Trp en los ratones envejecidos respecto a los jóvenes, lo que sugiere que con la edad se produce una

RESULTADOS

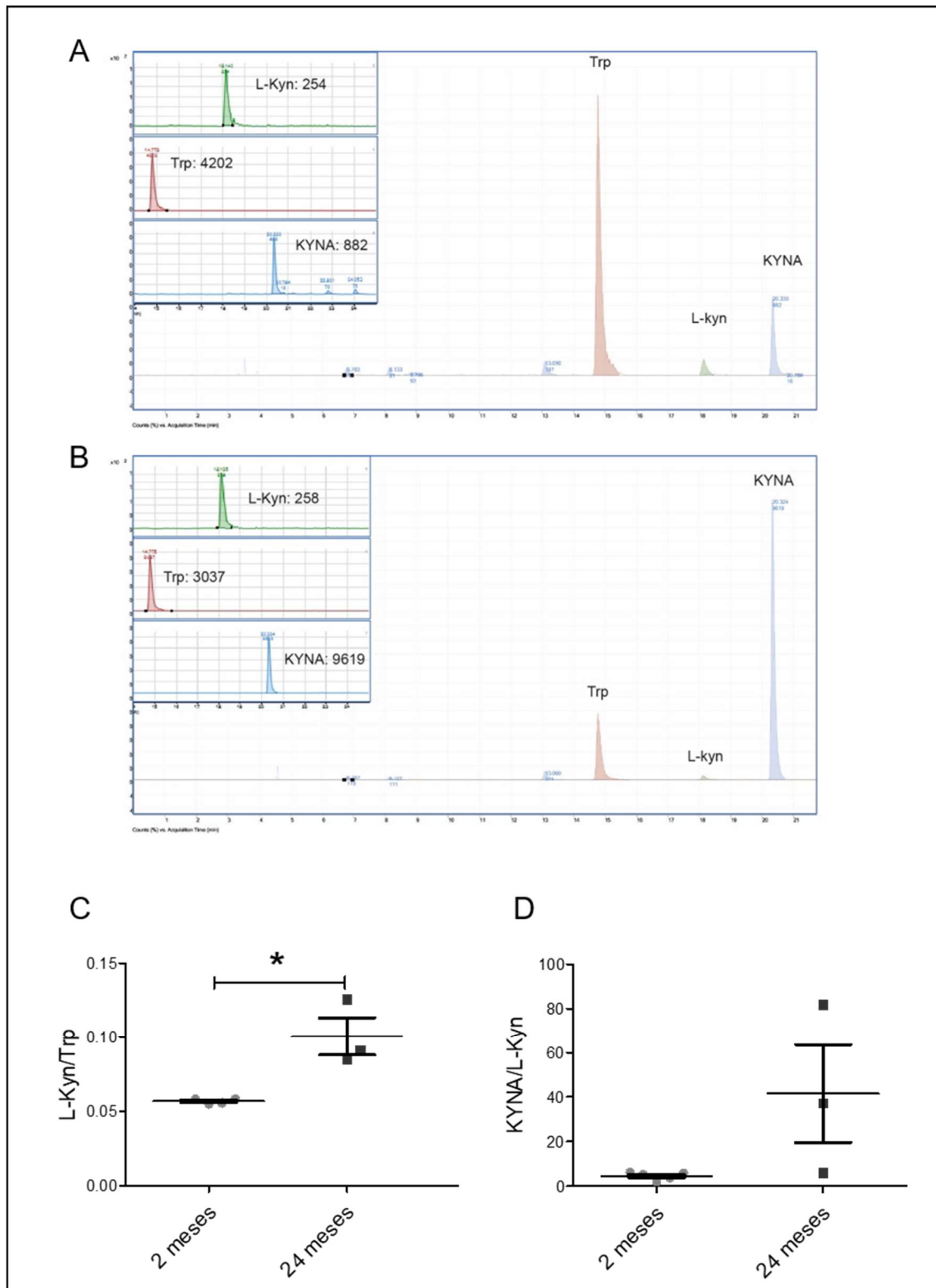


Figura 4.10. Niveles plasmáticos de Trp, L-Kyn y KYNA. Imágenes representativas del espectro de masas de L-Trp, L-Kyn y KYNA en el plasma de un ratón 2 meses de edad (A) y de 24 meses (B). Análisis de las ratios de L-Kyn/ Trp (C) y KYNA/L-Kyn (D). La media se representa en la línea central \pm SEM. Datos analizados mediante *t* de student ($n=3-4$ por grupo, $*p<0.05$ vs joven).

mayor degradación del Trp hacia L-Kyn (**Figura 4.10 C**). La ratio KYNA/ L-Kyn, por su parte, no reveló diferencias significativas en función de la edad, aunque parece existir una tendencia al alza en los animales de mayor edad (**Figura 4.10 D**). Estos resultados sugieren que en el envejecimiento se produce un incremento del metabolismo del Trp por la ruta de las kinureninas que podría estar contribuyendo al aumento de la capacidad agonista de AhR del plasma de los animales envejecidos.

4.1.2.2. Efecto de la edad en los niveles circulantes de ligandos de AhR en muestras de plasma humano

Tras comprobar que en ratones la edad produce un aumento en los niveles circulantes de agonistas de AhR, en colaboración con el Instituto de Investigación 12 de Octubre, hemos empezado a recoger muestras de plasma de voluntarios mayores (por encima de 65 años) sin ninguna patología identificada, así como de controles jóvenes (por debajo de 30 años) con el objetivo de determinar si en la edad afecta de la misma forma a los niveles plasmáticos de ligando de AhR en humanos. Dado que el tabaco es una fuente conocida de agonistas del receptor, todas las muestras proceden de personas no fumadoras.

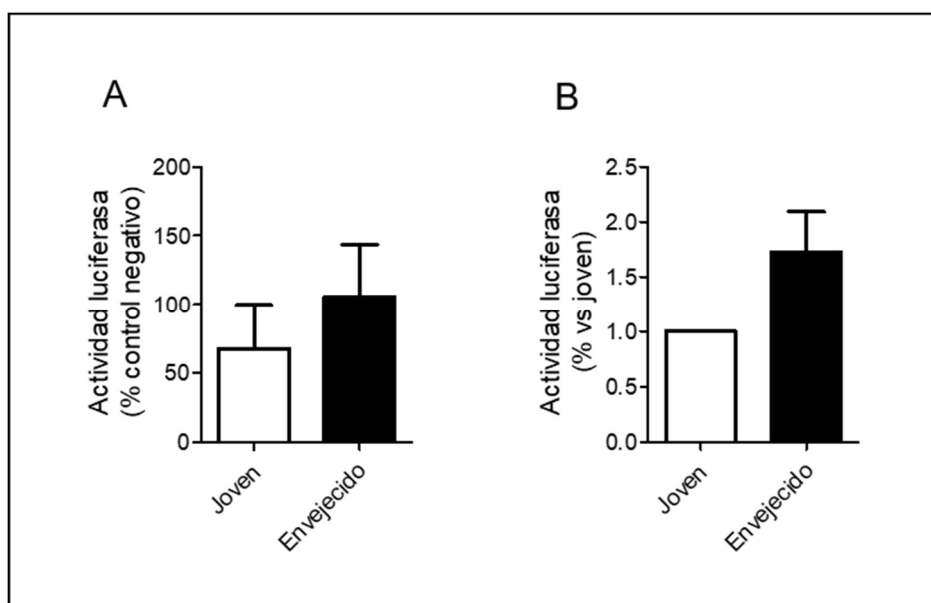


Figura 4.11. Efecto de la edad en los niveles plasmáticos de ligandos de AhR en humanos. La actividad agonista de AhR del plasma de muestras humanas se determinó mediante un ensayo de luciferasa. (A) Datos de los tres ensayos independientes realizados con el plasma de muestras humanas de voluntarios de entre 24 y 28 años de edad (grupo joven) y de entre 72 y 84 años de edad (grupo envejecido). (B) Datos representados como porcentaje respecto al valor del joven de cada ensayo.

RESULTADOS

Hasta el momento hemos realizado tres ensayos (Figura 4.11 A). Aunque los resultados son todavía preliminares, en los tres casos hemos podido comprobar que la actividad luciferasa del plasma procedente de voluntarios jóvenes es menor que en el plasma de voluntarios mayores, que presentaban una elevación respecto al plasma de los jóvenes de entre 1.2 y 2.4 veces (Figura 4.11 B).

4.2. Papel de AhR en el envejecimiento fisiológico

4.2.1. Perfil temporal de indicadores generales de envejecimiento en ratones

AhR^{+/+} y AhR^{-/-}

Una vez establecido que los niveles de AhR, así como de sus ligandos, varían a lo largo de la edad, decidimos utilizar ratones nulos para AhR con la idea de examinar las posibles consecuencias de la ausencia del receptor en el envejecimiento. En este sentido, nuestro primer paso fue caracterizar el perfil temporal de la aparición de rasgos generales característicos del envejecimiento.

	AhR ^{+/+}			AhR ^{-/-}		
	2 meses	12 meses	16 meses	2 meses	12 meses	16 meses
CIFOSIS	0/15 (0%)	0/16 (0%)	5/28 (17,9%)	0/15 (0%)	5/15 (33,3%)	7/21 (33,3%)
POLAPSO RECTAL	0/15 (0%)	0/16 (0%)	0/28 (0%)	0/15 (0%)	6/15 (40%)	3/21 (14,3%)
HIPERTROFIA CARDÍACA	0/15 (0%)	0/16 (0%)	0/28 (0%)	0/15 (0%)	9/15 (60%)	9/21 (42,9%)
FIBROSIS HEPÁTICA	0/15 (0%)	0/16 (0%)	2/28 (7,2%)	0/15 (0%)	8/15 (53,3%)	14/21 (66,7%)
ESPLENOMEGALIA	0/15 (0%)	0/16 (0%)	3/28 (10,7%)	3/15 (13,3%)	11/15 (73,3%)	12/21 (57,1%)
TUMORES MACROSCÓPICOS	0/15 (0%)	0/16 (0%)	0/28 (0%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	3/21 (23,8%)
MUERTES ESPONTÁNEAS	0/81 (0%)	0/66 (0%)	2/50 (4%)	0/51 (0%)	4/36 (11,1%)	5/21 (23,8%)

Tabla 4.1. Curso temporal de la aparición de características fenotípicas asociadas al envejecimiento en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}.

Entre las características fenotípicas más visibles del envejecimiento están la cifosis, una curvatura anormal de la columna vertebral, y el prolapso rectal, un

abultamiento del colon distal fuera del recto. A nivel de los órganos internos, el corazón, el bazo y el hígado adquieren, a lo largo de la edad, características apreciables a simple vista: el corazón y el bazo presentan un aumento considerable de su tamaño y el hígado adquiere una textura fibrosa (Jurk et al. 2014). Además, el desarrollo de tumores es otro rasgo frecuente del envejecimiento (Köks et al. 2016). A lo largo de nuestro estudio, pudimos observar que en los ratones $AhR^{-/-}$, todos estos rasgos aparecían antes y tenían una mayor incidencia (**Tabla 4.1**).

Por último, el índice de supervivencia de los animales carentes del receptor fue menor, como se ve reflejado en el número de muertes espontáneas en el curso de los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral (**Tabla 4.1**). Por esta razón, la edad máxima analizada en los animales $AhR^{-/-}$ fue de 16 meses.

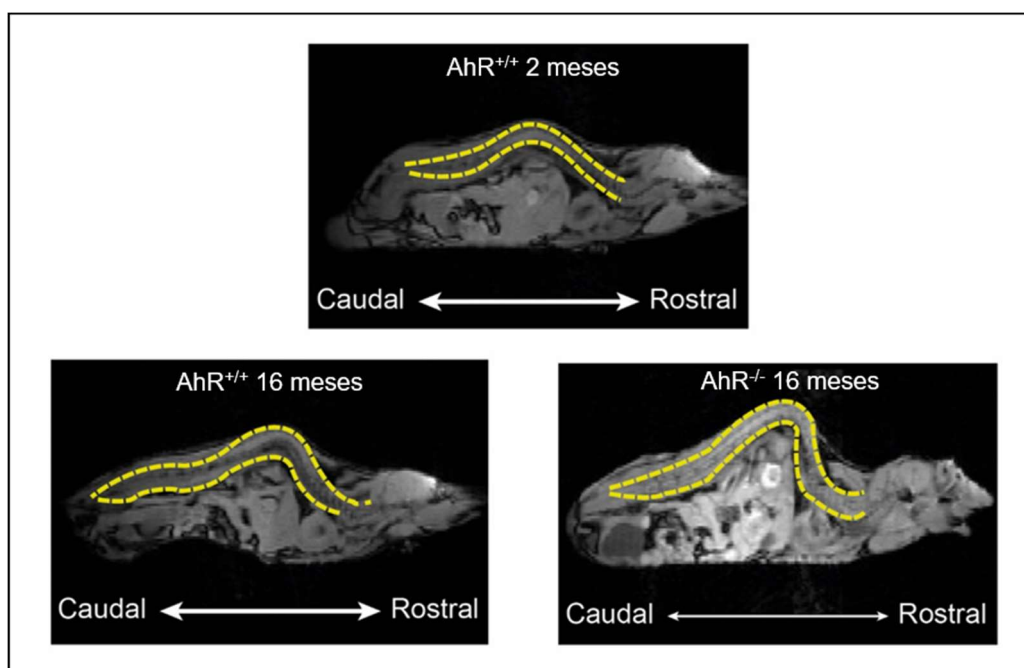


Figura 4.12. Imágenes de resonancia magnética de columna vertebral de ratón. Imágenes representativas de la columna vertebral de ratón joven (panel superior), de ratón envejecido (panel inferior izquierdo) y de ratón envejecido $AhR^{-/-}$ (panel superior derecho).

La aparición temprana de todos estos rasgos fenotípicos en los ratones $AhR^{-/-}$ y su mayor mortalidad, junto con los cambios descritos previamente en la expresión de AhR en varias estructuras cerebrales, nos condujo a plantear nuestro siguiente objetivo, que fue el de examinar si la ausencia del receptor producía también una aceleración de los rasgos principales del envejecimiento cerebral.

RESULTADOS

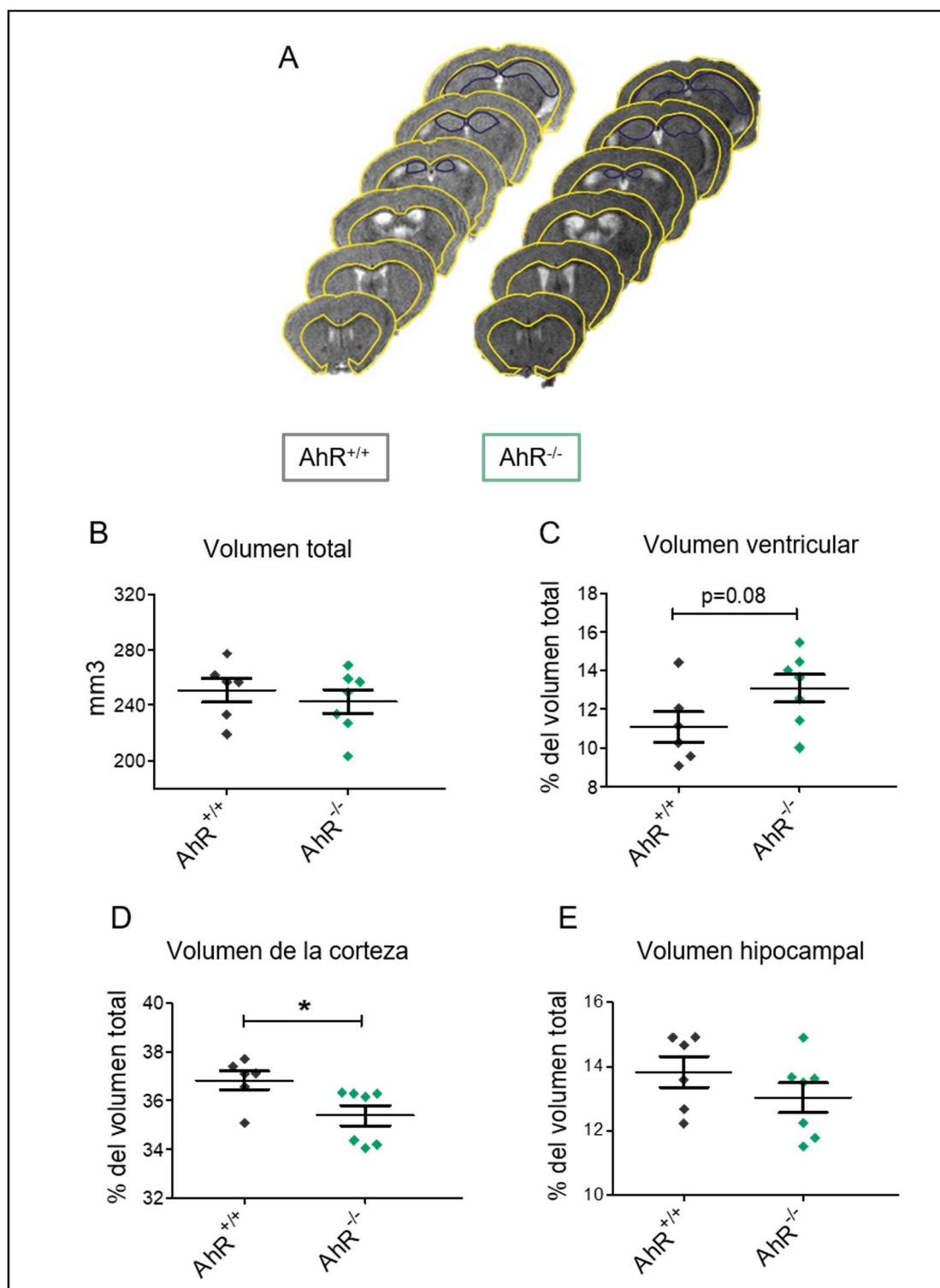


Figura 4.13. Efecto de la delección de AhR en el volumen cerebral en animales envejecidos. (A) Imágenes representativas de resonancia magnética de 6 secciones coronales de cerebro de animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} de 16 meses de edad. Cuantificación del análisis del volumen total de cerebro (B), de los ventrículos (C), de la corteza (D) y del hipocampo (E) en animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-}. La media se representa en la línea central \pm SEM. Datos analizados mediante t de student (n=6-7 por grupo, *p<0.05).

4.2.2. Perfil temporal de indicadores específicos de envejecimiento cerebral en ratones $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$

4.2.2.1. Evaluación de los cambios volumétricos en cerebro de ratones $AhR^{-/-}$ y $AhR^{+/+}$ envejecidos

A través de imágenes de resonancia magnética potenciadas en T2 determinamos el volumen total del cerebro, el volumen ventricular, el volumen cortical y el volumen hipocampal en animales envejecidos (16 meses) tanto $AhR^{+/+}$ como $AhR^{-/-}$. Si bien a nivel total no detectamos diferencias entre ambos grupos (Figura 4.13 B), en los ventrículos encontramos una marcada tendencia a un aumento del volumen en los ratones $AhR^{-/-}$ en comparación con los $AhR^{+/+}$ (Figura 4.13 C). Los animales $AhR^{-/-}$ presentaban, además, un menor volumen de corteza cerebral (Figura 4.13 D). Sin embargo, a nivel del hipocampo no se produjo ningún cambio volumétrico dependiente del genotipo (Figura 4.13 E).

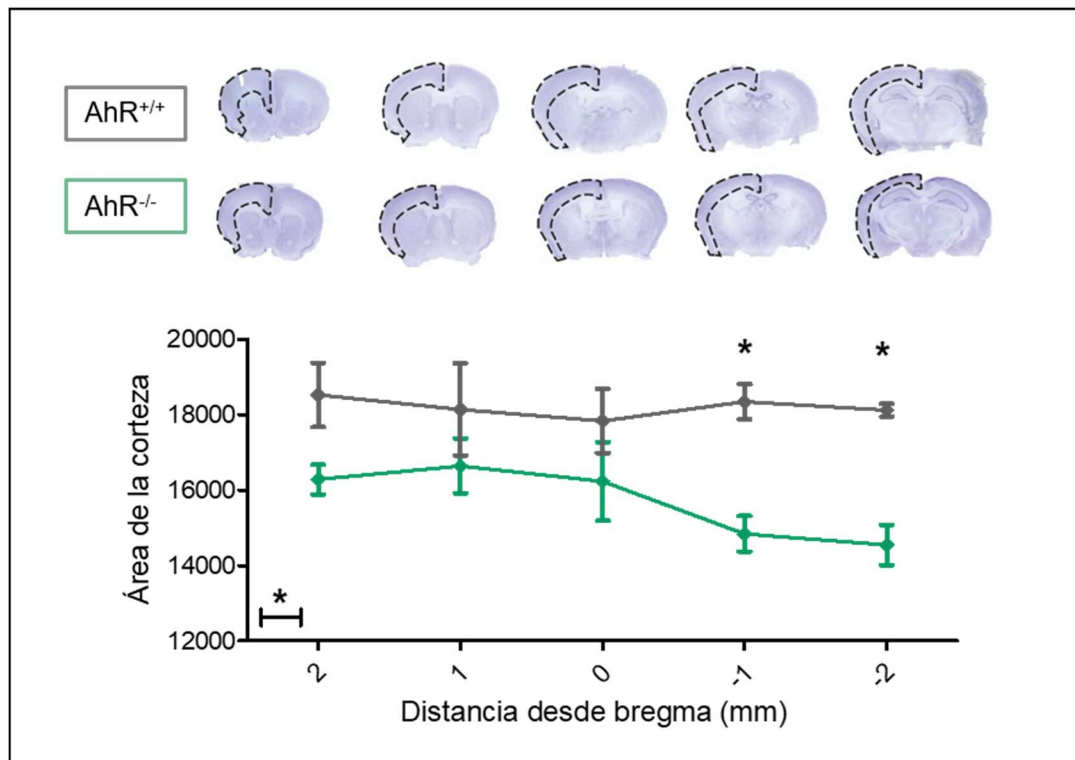


Figura 4.14. Efecto de la delección génica de AhR en el área de la corteza cerebral en animales envejecidos. Cuantificación del área cortical en secciones de cerebro con la tinción de Nissl a lo largo del eje rostro-caudal en animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ de 16 meses. En el panel superior se muestran imágenes representativas de cada sección. $\bar{x} \pm SEM$. Datos representados como media \pm SEM. Datos analizados mediante ANOVA de dos factores ($n=4$ por grupo, $*p<0.05$).

RESULTADOS

Para confirmar los datos a nivel cortical, se cuantificó el área de la corteza en secciones de cerebro de animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ mediante tinción de Nissl. Para detectar en qué parte del eje rostro-caudal se producían las mayores diferencias, se cuantificaron 5 secciones por cerebro (bregma +2, +1, 0, -1 y -2), confirmándose la disminución y detectándose además una mayor disminución en el área de corteza en los animales $AhR^{-/-}$ en las secciones más caudales (**Figura 4.14**).

4.2.2.2. Evaluación de la integridad de la sustancia blanca en ratones $AhR^{-/-}$ y $AhR^{-/-}$ envejecidos

Para determinar la integridad de la sustancia blanca realizamos estudios de DTI por resonancia magnética en cerebros *ex vivo*. Analizamos mediante esta técnica la fracción anisotrópica (FA), parámetro que proporciona un mapa 2D en escala de grises con intensidades comprendidas entre los valores 0 y 1. Estos valores describen el grado de anisotropía de un proceso de difusión, siendo próximos a 0 cuando la difusión es isotrópica y acercándose a 1 cuando es anisotrópica (Assaf and Pasternak 2008).

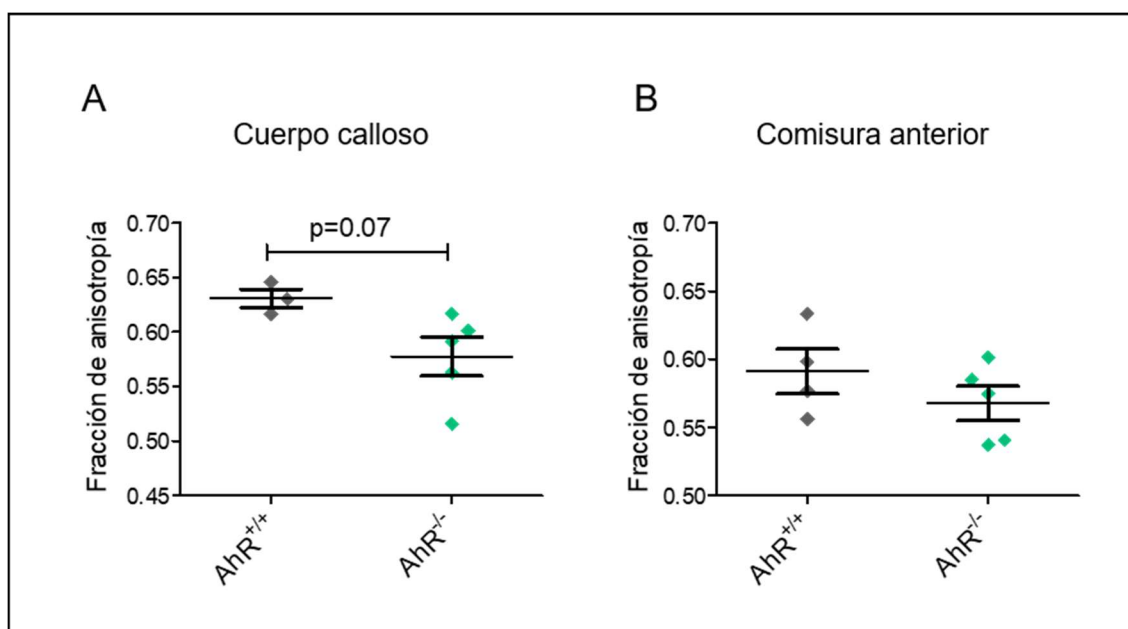


Figura 4.15. Efecto de la delección de AhR en la integridad de la sustancia blanca en animales envejecidos. Cuantificación del análisis de la fracción de anisotropía en el cuerpo calloso (A) y en la comisura anterior (B) en animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ de 16 meses de edad. La media se representa en la línea central \pm SEM. Datos analizados mediante t de student ($n=3-5$ por grupo).

A través de estos mapas obtuvimos los valores de la FA de los dos principales tractos de fibras que conectan los dos hemisferios cerebrales: el cuerpo calloso y la comisura anterior. Aunque no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos, en el cuerpo calloso observamos una fuerte tendencia en los ratones $AhR^{-/-}$ a un descenso de los valores en relación con sus controles $AhR^{+/+}$ (**Figura 4.15**), lo que sugiere que la falta de AhR conduce a alteraciones en este haz de fibras en los animales envejecidos.

4.2.2.3. Perfil temporal de déficits neurológicos asociados a la edad en ratones $AhR^{-/-}$ y $AhR^{-/-}$

Evaluación de los déficits asociados a la edad mediante test comportamentales

Tras apreciar la aparición temprana de varios indicadores de envejecimiento en los animales $AhR^{-/-}$, nos propusimos determinar si en estos ratones se producía un deterioro prematuro de las capacidades cognitivas y motoras. Para ello, realizamos primero una batería de test comportamentales para evaluar cuáles de ellos eran sensibles al deterioro asociado al envejecimiento.

Como primera aproximación a la evaluación motora, realizamos el test de la huella, que permite estudiar la forma de caminar de los animales (Hernandez-Jimenez et al. 2017). En este test, se pintan las patas de los animales para que dejen su huella en un papel, lo cual permite realizar un posterior análisis de sus pisadas. En nuestro caso, los parámetros que evaluamos fueron: la distancia entre las pisadas traseras y la distancia entre las pisadas delanteras. En el análisis de la distancia entre las pisadas de las patas delanteras detectamos una disminución de la misma en los animales envejecidos respecto a los animales jóvenes (**Figura 4.16 B**). Respecto a la distancia entre las pisadas de las patas traseras, aunque los datos no llegaron al nivel de significación ($p=0.06$), observamos una clara tendencia a la misma disminución (**Figura 4.16 C**). Estos datos demuestran que, en los animales de mayor edad, la distancia entre las pisadas es más corta, lo que indica que el test de la huella es sensible al deterioro motor producido por la edad.

Además del análisis del patrón de marcha de los animales, también evaluamos la capacidad motora en una prueba de esfuerzo físico. Con este objetivo, realizamos

RESULTADOS

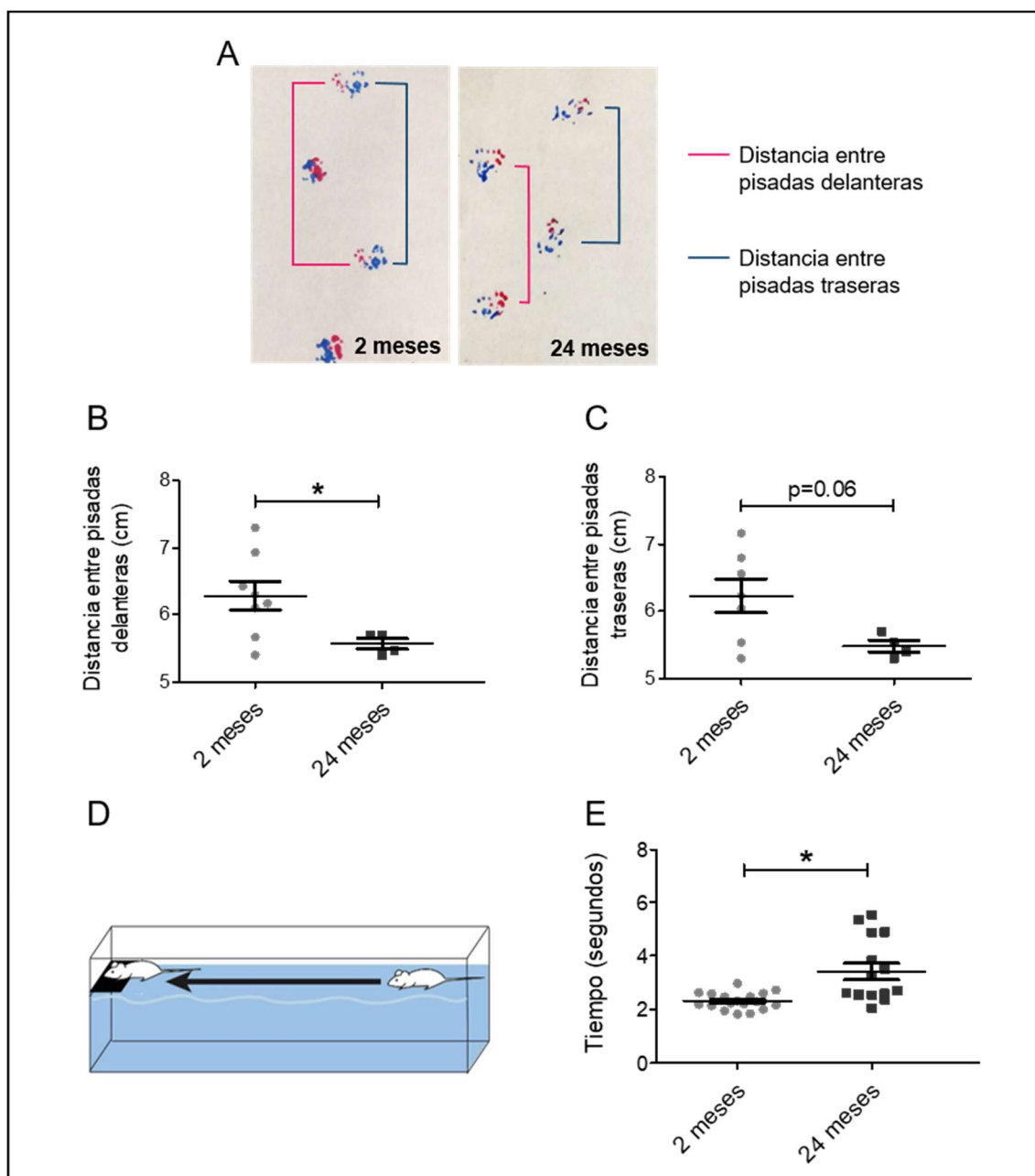


Figura 4.16. Evaluación de la sensibilidad de varios test comportamentales a los déficits motores asociados a la edad. El patrón de la marcha se analizó mediante el test de la huella (A-C) y la velocidad de nado mediante el test motor de la natación (D y E). (A) Imágenes representativas del patrón de la marcha de un ratón de 2 meses (izquierda) y uno de 24 meses (derecha). (B) Análisis de la distancia entre las pisadas de las patas delanteras ($n=5-9$ por grupo, $*p<0.05$). (C) Análisis de la distancia entre las pisadas de las patas traseras ($n=5-9$ por grupo, $*p<0.05$). (D) Representación esquemática del test motor de la natación (E) Cuantificación del tiempo empleado para realizar el recorrido en el test motor de natación ($n=18-23$ por grupo, $*p<0.05$). La media se representa en la línea central \pm error estándar (SEM). Datos analizados mediante t de student.

el test motor de la natación en el que se mide la velocidad de nado del ratón (Carter et al. 1999b). Este test consiste en un tanque de agua con una plataforma de escape visible en uno de los extremos. Situando al animal en el extremo opuesto, se evalúa el tiempo que el ratón emplea en llegar hasta la plataforma (ver apartado de

Materiales y Métodos). Los ratones envejecidos tardaban más tiempo en realizar el recorrido que los animales jóvenes, por lo que concluimos que este test era válido para detectar el deterioro motor asociado al envejecimiento (**Figura 4.16 D**).

Respecto a las capacidades cognitivas, nos propusimos evaluar la memoria de trabajo y la memoria espacial a corto plazo. Para evaluar la primera realizamos el test de alternancia espontánea en el laberinto en Y (Ver apartado de materiales y métodos). El porcentaje de alternancia espontánea del ratón se calcula en base al patrón de entrada a los distintos brazos del laberinto y refleja la memoria de trabajo espacial, puesto que el roedor tiende, de forma innata, a alternar las visitas entre los tres brazos lo que requiere mantener el registro de los brazos visitados recientemente (Miedel et al. 2017). Una mayor alternancia (expresada en porcentaje respecto al número de visitas totales a los brazos) indica un mejor rendimiento en el test. El número de entradas totales a los distintos brazos fue similar en ambos grupos, lo cual refleja que el comportamiento exploratorio en este test no varía a lo largo de la edad (**Figura 4.17 B**). Sin embargo, el porcentaje de alternancia espontánea, en los ratones de 24 meses fue significativamente menor que en los ratones de 2 meses (**Figura 4.17 C**), lo que indica que los animales envejecidos tienen una afectación de la memoria de trabajo que puede ser percibida a través de este test.

Por último, para valorar la memoria a episódica escogimos el test de reconocimiento de objeto nuevo (Antunes and Biala 2012). Este test consiste en evaluar la capacidad del animal de distinguir un objeto nuevo de otro con el que se le había familiarizado previamente (24h antes) a través de dos medidas: el índice de reconocimiento y el índice de discriminación. El primero representa el tiempo que pasa el animal explorando el objeto nuevo relativo al tiempo que explora el objeto familiar. El índice de discriminación es el tiempo que el animal explora el objeto nuevo respecto al tiempo total de exploración. En ninguno de los dos índices detectamos diferencias entre los animales jóvenes y los envejecidos, lo que parece indicar que la capacidad de retención a las 24h no está alterada en los animales de mayor edad (**Figura 4.17 D-F**).

RESULTADOS

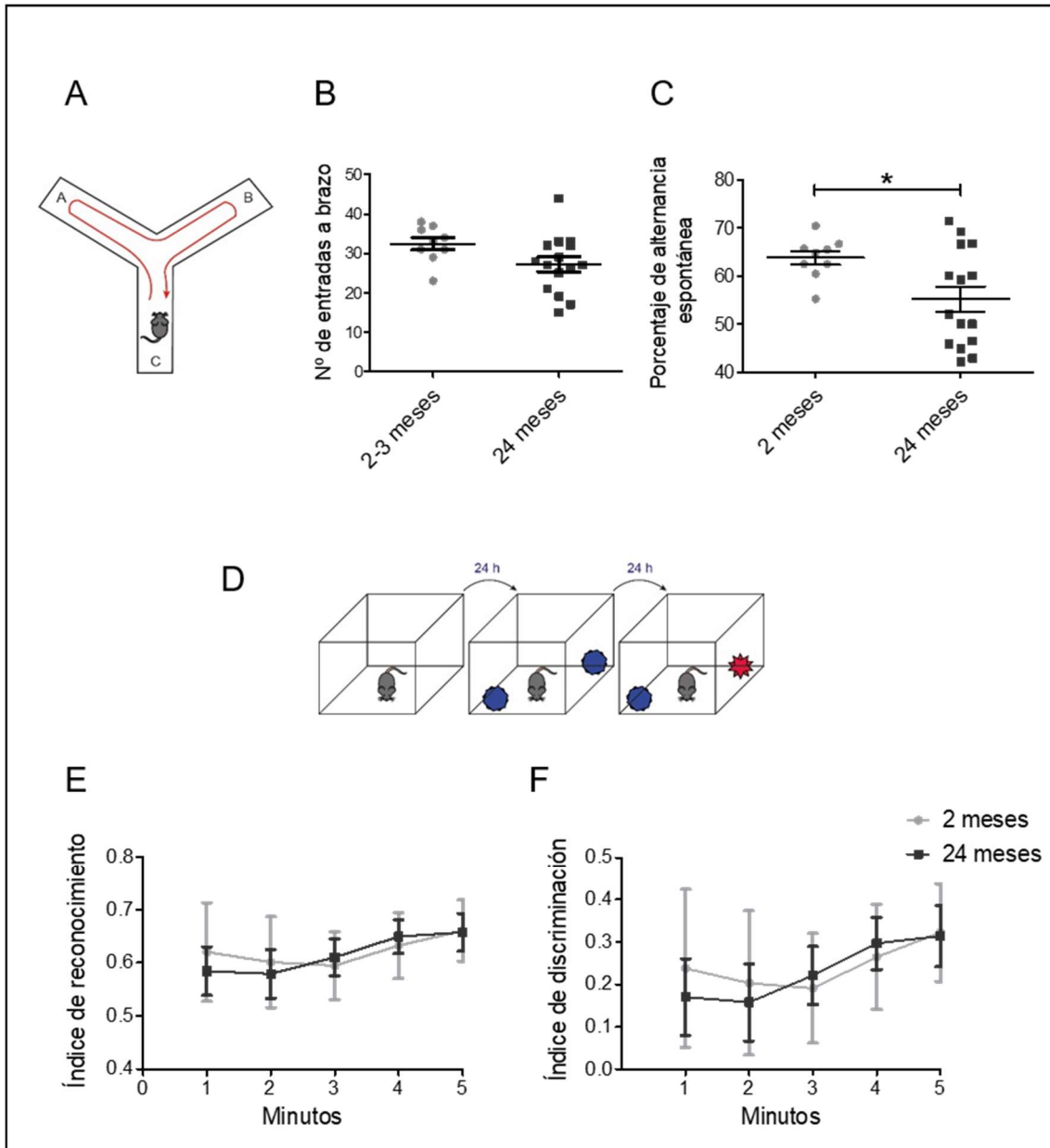


Figura 4.17. Evaluación de la sensibilidad de varios test comportamentales a los déficits cognitivos asociados a la edad. La memoria de trabajo se evaluó mediante el test de la alternancia espontánea en el laberinto en Y (A-C). La memoria episódica se evaluó mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo (D-F). (A) Esquema representativo del test de alternancia espontánea (B) Número de entradas totales a los brazos del laberinto en Y durante los 7 minutos de duración del test. (C) Porcentaje de alternancia espontánea en el laberinto en Y a tiempo final del test (7 minutos). (D) Esquema representativo del test de reconocimiento de objeto nuevo (E) Índice de reconocimiento del objeto nuevo. (F) Índice de discriminación entre objeto nuevo y objeto conocido. La media se representa en la línea central \pm error estándar (SEM). Datos analizados mediante ANOVA de dos factores ($n=9-23$ por grupo, $*p<0.05$ vs $AhR^{+/+}$, $\#p<0,05$ vs 12 meses).

Perfil temporal de déficits motores asociados a la edad en ratones $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$

RESULTADOS

Una vez establecido que tanto el test de la huella como el test motor de natación eran sensibles al declive motor que se produce en el envejecimiento, nos propusimos determinar si en los ratones $AhR^{-/-}$ este declive aparecía a una edad más temprana, como ocurría en los indicadores generales de envejecimiento. Con

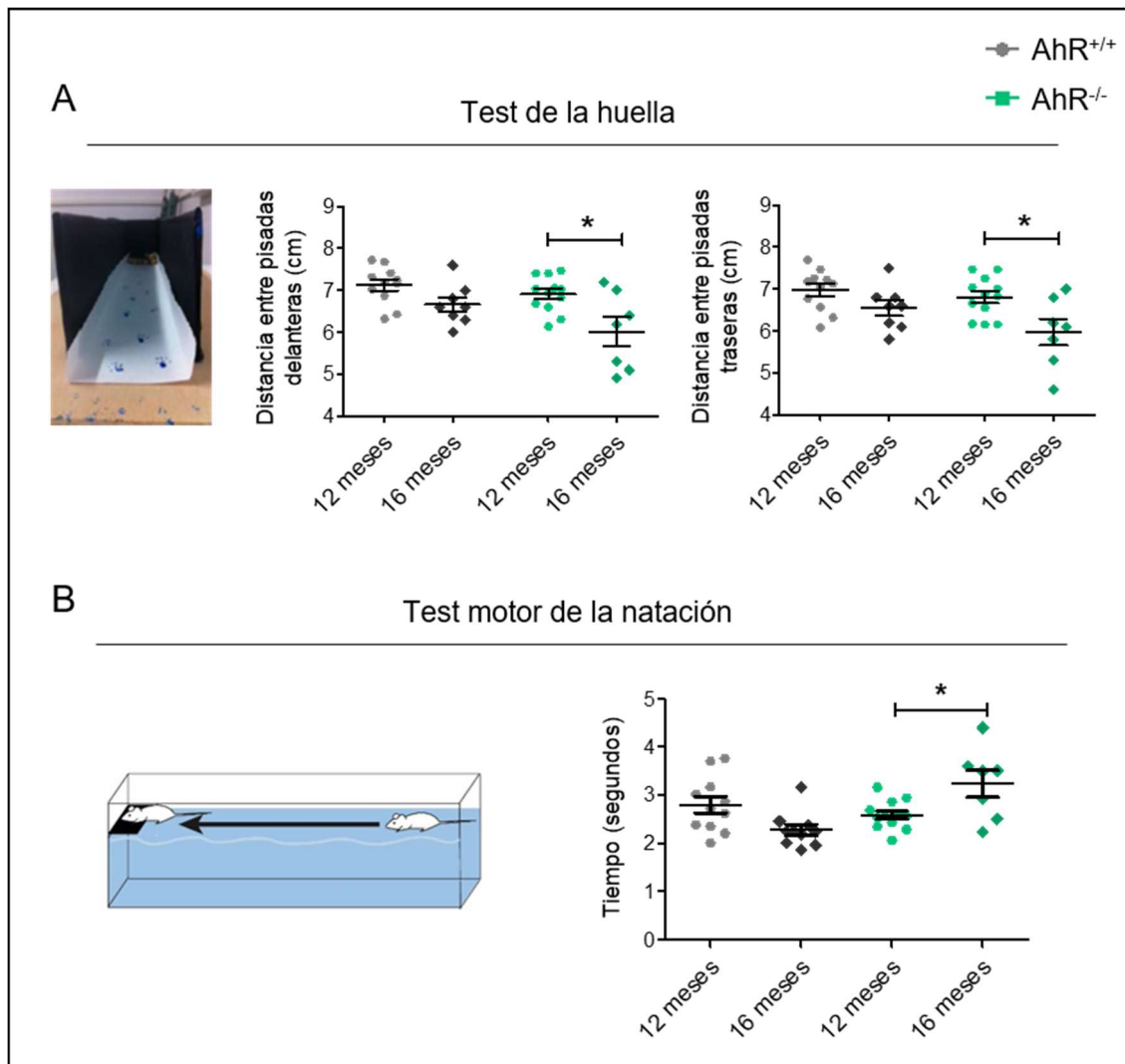


Figura 4.18. Efecto de la edad en la capacidad motora en animales $AhR^{+/+}$ y animales $AhR^{-/-}$. El patrón de la marcha se analizó mediante el test de la huella (A) y la velocidad de nado mediante el test motor de la natación (B). (A) Análisis de la distancia entre las pisadas de las patas delanteras (derecha) y traseras (izquierda). (B) Tiempo utilizado para realizar el recorrido en el test motor de natación. La media se representa en la línea central \pm error estándar (SEM). Datos analizados mediante ANOVA de dos factores ($n=7-12$ por grupo, $*p<0.05$ vs $AhR^{+/+}$, $\#p<0,05$ vs 12 meses).

este fin, decidimos evaluar ratones de 12 meses y de 16 meses tanto $AhR^{+/+}$ como $AhR^{-/-}$.

En el test de la huella, tanto en la distancia entre las pisadas delanteras como en las traseras no observamos ninguna diferencia entre los ratones $AhR^{+/+}$ de 12 y

RESULTADOS

de 16 meses. Sin embargo, en los ratones $AhR^{-/-}$ sí detectamos una disminución en ambas distancias a los 16 meses respecto a los animales de 12 meses (**Figura 4.18 A**).

En el test motor de natación, en los ratones $AhR^{+/+}$, tampoco obtuvimos diferencias asociadas a la edad en el tiempo empleado en alcanzar la plataforma. No obstante, en los ratones $AhR^{-/-}$, al igual que en el test anterior, se observaron diferencias entre las dos edades, siendo el tiempo empleado por los animales de 16 meses mayor que el que tardaron los ratones de 12 meses (**Figura 4.18 B**).

Estos datos sugieren que la deficiencia de AhR conduce a una aceleración de los déficits motores asociados al envejecimiento.

Perfil temporal de déficits cognitivos asociados a la edad en ratones $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$

En lo que concierne a la función cognitiva, decidimos evaluar la memoria de trabajo a través del test de alternancia espontánea en el laberinto en Y, puesto que era en este test en el que habíamos detectado un déficit asociado al envejecimiento. Al igual que en los test motores, en los ratones $AhR^{+/+}$ no observamos un efecto

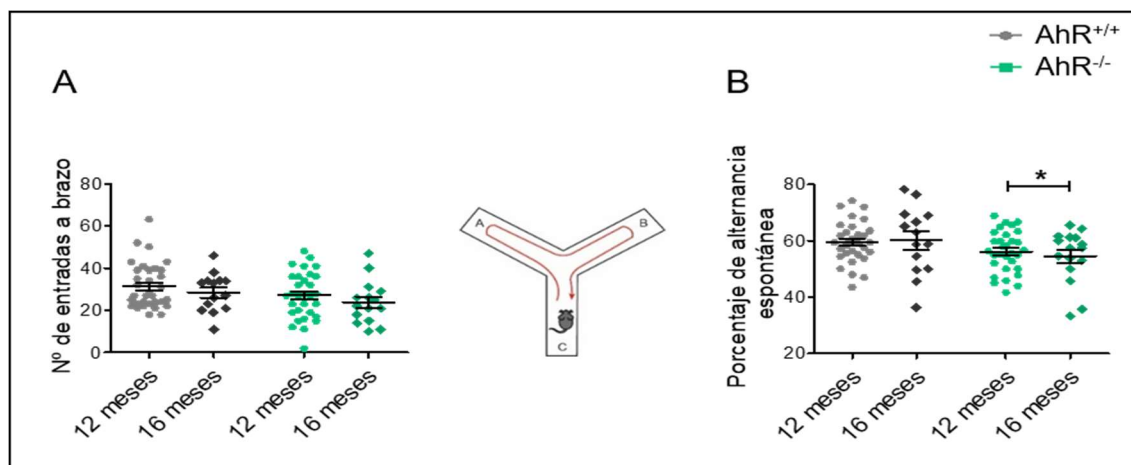


Figura 4.19. Efecto de la delección génica de AhR en la función cognitiva en animales envejecidos. La memoria de trabajo se evaluó mediante el test de la alternancia espontánea en el laberinto en Y en animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ de 12 y 16 meses. **A:** número de entradas a brazo totales durante los 7 minutos de duración del test. **B:** porcentaje de alternancia espontánea a tiempo final del test (7 minutos). La media se representa en la línea central \pm error estándar (SEM). Datos analizados mediante ANOVA de dos factores ($n=14-33$ por grupo, $*p<0.05$ vs $AhR^{+/+}$, $\#p<0,05$ vs 12 meses).

dependiente de la edad en el porcentaje de alternancia espontánea, que sí detectamos en los ratones $AhR^{-/-}$, reflejado en una reducción del porcentaje en los

ratones de 16 meses respecto a los de 12 meses (**Figura 4.19 B**). El número de entradas totales a los distintos brazos fue similar en todos los grupos.

Estos resultados parecen indicar que en los ratones carentes de AhR, el declive, tanto cognitivo como motor, asociado a la edad, aparece a una edad más temprana que en los ratones de fenotipo salvaje, lo que sugiere que AhR juega un papel en el envejecimiento.

2.2.3. Perfil temporal del fenómeno de *inflammaging* en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}

4.2.3.1. Perfil temporal de los niveles de citoquinas circulantes en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}

Dadas las crecientes evidencias de la implicación de AhR en los procesos inflamatorios (Busbee et al. 2013), quisimos determinar si la pérdida de función del receptor podía tener consecuencias en los niveles de citoquinas plasmáticas a lo largo de la edad. Al igual que con los test comportamentales, decidimos realizar una primera aproximación para averiguar en qué medida varían las citoquinas con la edad y cuáles de ellas lo hacen en nuestro modelo. Las citoquinas de las que se determinaron, mediante la técnica de CBA, las concentraciones circulantes fueron las siguientes: TNF- α , IL-6, IL-4, IFN- γ , IL-17a, IL-2 e IL-10 (**Figura 4.20**).

En todas las citoquinas proinflamatorias estudiadas (TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17a e IL-2) detectamos un efecto de la edad, siendo los niveles de las mismas más elevados en los animales de 22-24 meses que en los animales de 2 meses. Las mayores diferencias las encontramos en el TNF- α y en la IL-6. Respecto a las citoquinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10), sólo encontramos un aumento significativo de los niveles en los ratones de 24 meses en la IL-4.

Esta elevación observada en las citoquinas proinflamatorias circulantes concuerda con lo descrito anteriormente en la bibliografía que se ha denominado fenómeno de *inflammaging* (Franceschi and Campisi 2014).

Tras esta primera aproximación para conocer como varían las citoquinas en el envejecimiento en animales de fenotipo salvaje, pasamos a estudiar las

RESULTADOS

concentraciones de estos mismos mediadores inflamatorios en los ratones $AhR^{-/-}$ (Figura 4.21).

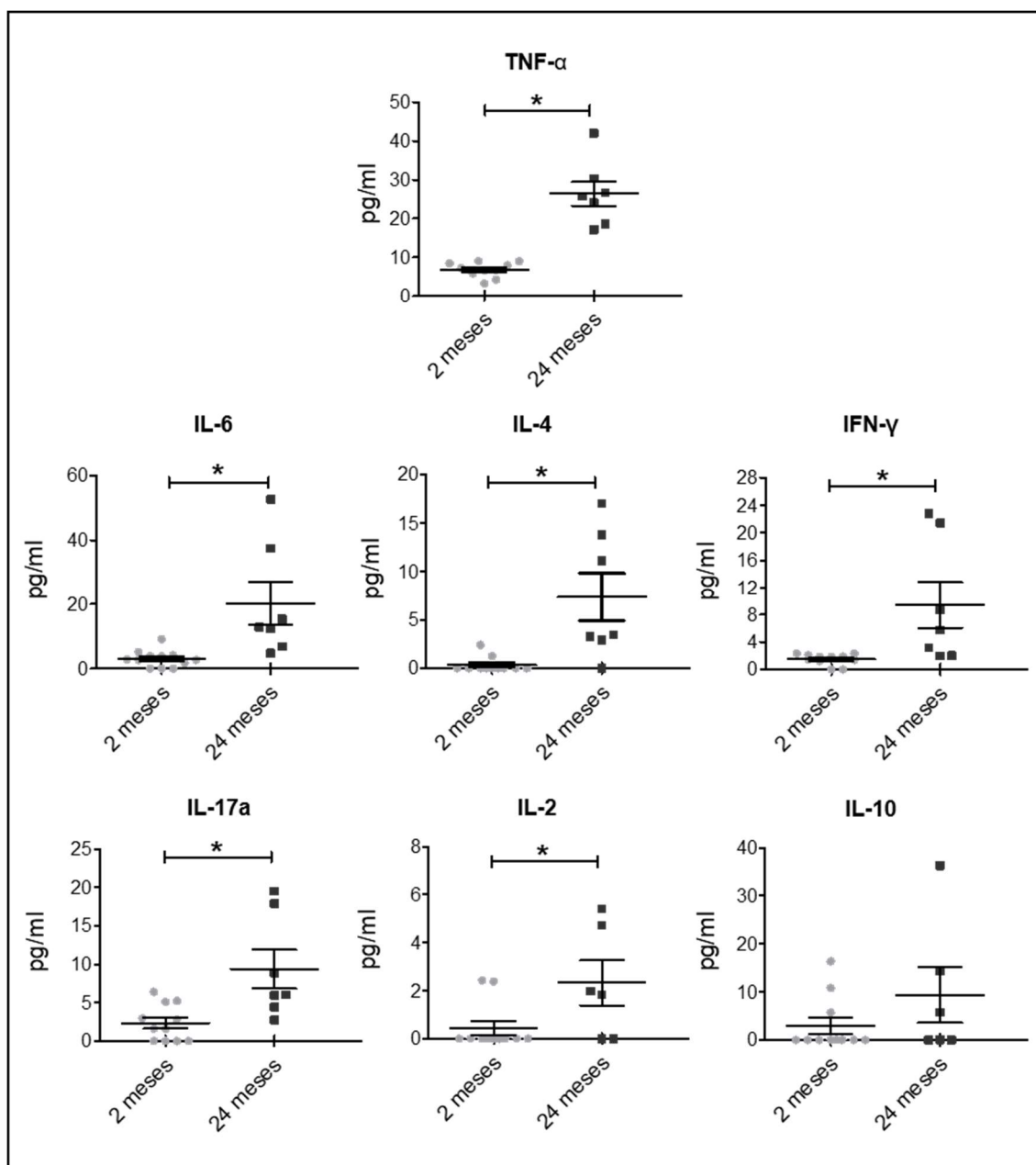


Figura 4.20. Efecto de la edad en los niveles plasmáticos de citoquinas en animales $AhR^{+/+}$ y animales $AhR^{-/-}$. Las concentraciones proteicas de TNF- α , IL-6, IL-4, IFN- γ , IL-17a, IL-2 e IL-10 en plasma de animales jóvenes y de animales envejecidos se determinaron mediante CBA. La media se representa en la línea central \pm error estándar (SEM). Datos analizados mediante t de student ($n=7-11$ por grupo, $*p<0.05$ vs 2 meses).

Al igual que sucedía en el caso anterior, los niveles más altos los detectamos en la IL-6 y en el TNF- α . Al analizar los datos obtenidos, en ambas citoquinas encontramos un efecto del genotipo en las concentraciones, que mostraron niveles más altos en los ratones $AhR^{-/-}$. En el análisis posterior entre grupos, las diferencias

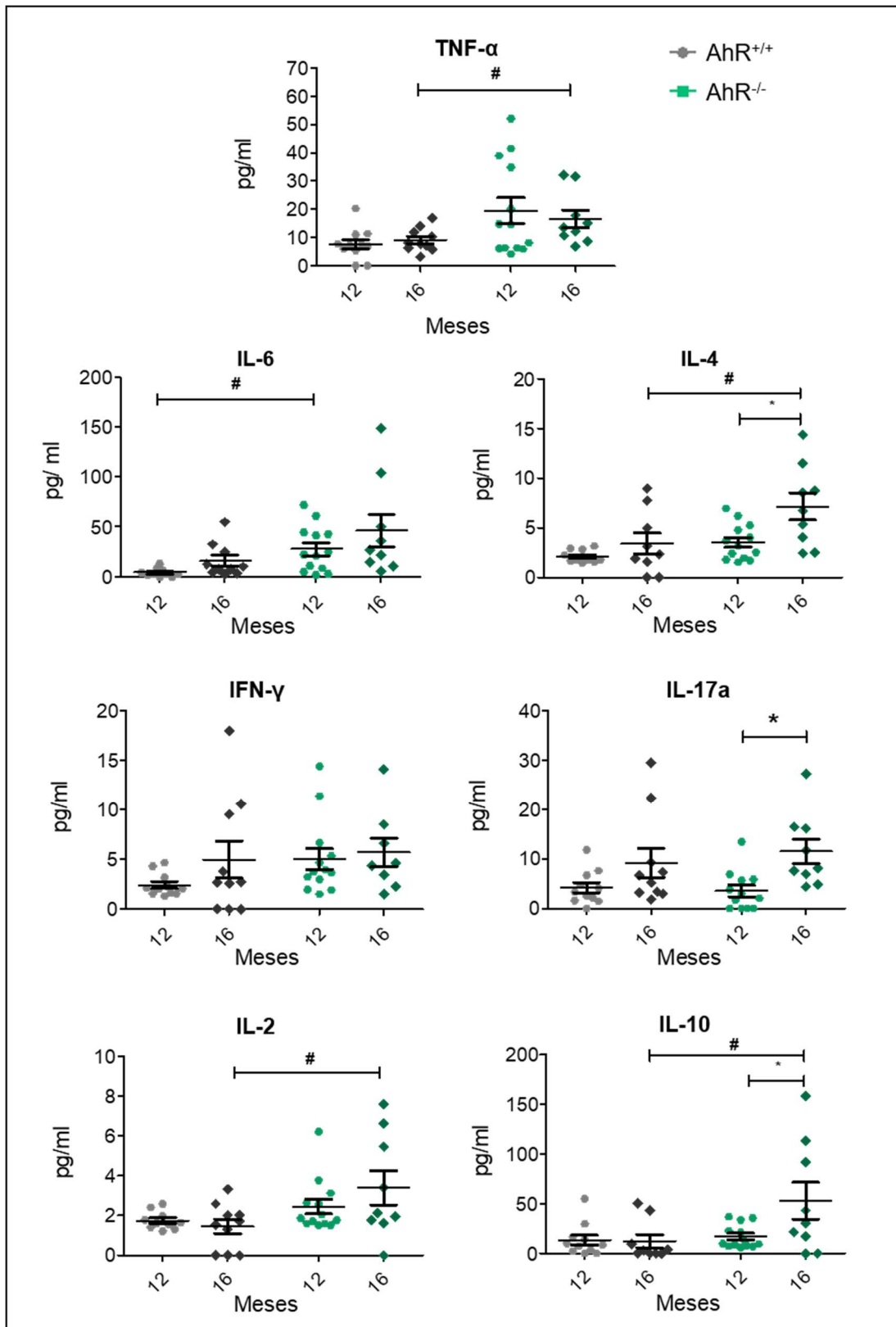


Figura 4.21. Efecto de la edad en los niveles plasmáticos de citoquinas en animales *AhR*^{+/+} y animales *AhR*^{-/-}. Las concentraciones proteicas de TNF- α , IL-6, IL-4, IFN- γ , IL-17a, IL-2 e IL-10 en plasma de animales *AhR*^{+/+} y *AhR*^{-/-} de 12 y 16 meses de edad se determinaron mediante CBA. La media se representa en la línea central \pm error estándar (SEM). Datos analizados mediante ANOVA de dos factores ($n=11-14$ por grupo, * $p<0.05$ vs *AhR*^{+/+}, # $p<0,05$ vs 12 meses).

RESULTADOS

observadas difirieron entre las dos citoquinas: mientras que en el TNF- α el aumento se detectó en los ratones AhR^{-/-} de 16 meses respecto a su grupo control, en la IL-6 fue entre los grupos de 12 meses donde se detectó un mayor efecto del genotipo.

En lo que respecta a la IL-4, al igual que en la IL-10, se observó un efecto tanto del genotipo como de la edad. La falta de AhR se asoció a un aumento en las concentraciones plasmáticas de ambas citoquinas en los ratones de 16 meses. Además, en los ratones AhR^{-/-}, se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos de edad, siendo los niveles de IL-4 y de IL-10 mayores en los ratones de 16 meses.

Para la IL-17a, la edad produjo un aumento de los niveles únicamente en los ratones AhR^{-/-}. Para la IL-2, al igual que lo observado en los niveles de IL-6, la delección génica de AhR produjo un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas a los 16 meses.

Por último, de todas las citoquinas analizadas, el IFN- γ fue el único en el que no se observó efecto alguno en sus niveles circulantes ni de la edad ni del genotipo.

4.2.3.2. Perfil temporal de los niveles de citoquinas cerebrales en ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}

Una vez establecido que en los ratones AhR^{-/-} la elevación en los niveles de citoquinas periféricas asociada a la edad aparecía antes que en los ratones AhR^{+/+}, quisimos averiguar si a nivel del SNC sucedía lo mismo. Para ello, utilizamos la misma técnica que en el experimento anterior pero en extractos de proteína de cerebro completo (**Figura 4.22**).

En IL-6, TNF- α e IL-2 encontramos un efecto de la edad en ambos genotipos, siendo los niveles de todas ellas significativamente más altos en el grupo de 16 meses respecto al de 2 meses. En dos de ellas, IL-10 e IFN- γ , la edad sólo afectó a los animales AhR^{-/-}. En la IL-4, no se detectó ninguna diferencia ni debido a la edad ni debido al genotipo. Por último, los niveles de IL-17a se situaron por debajo del límite de sensibilidad de la técnica.

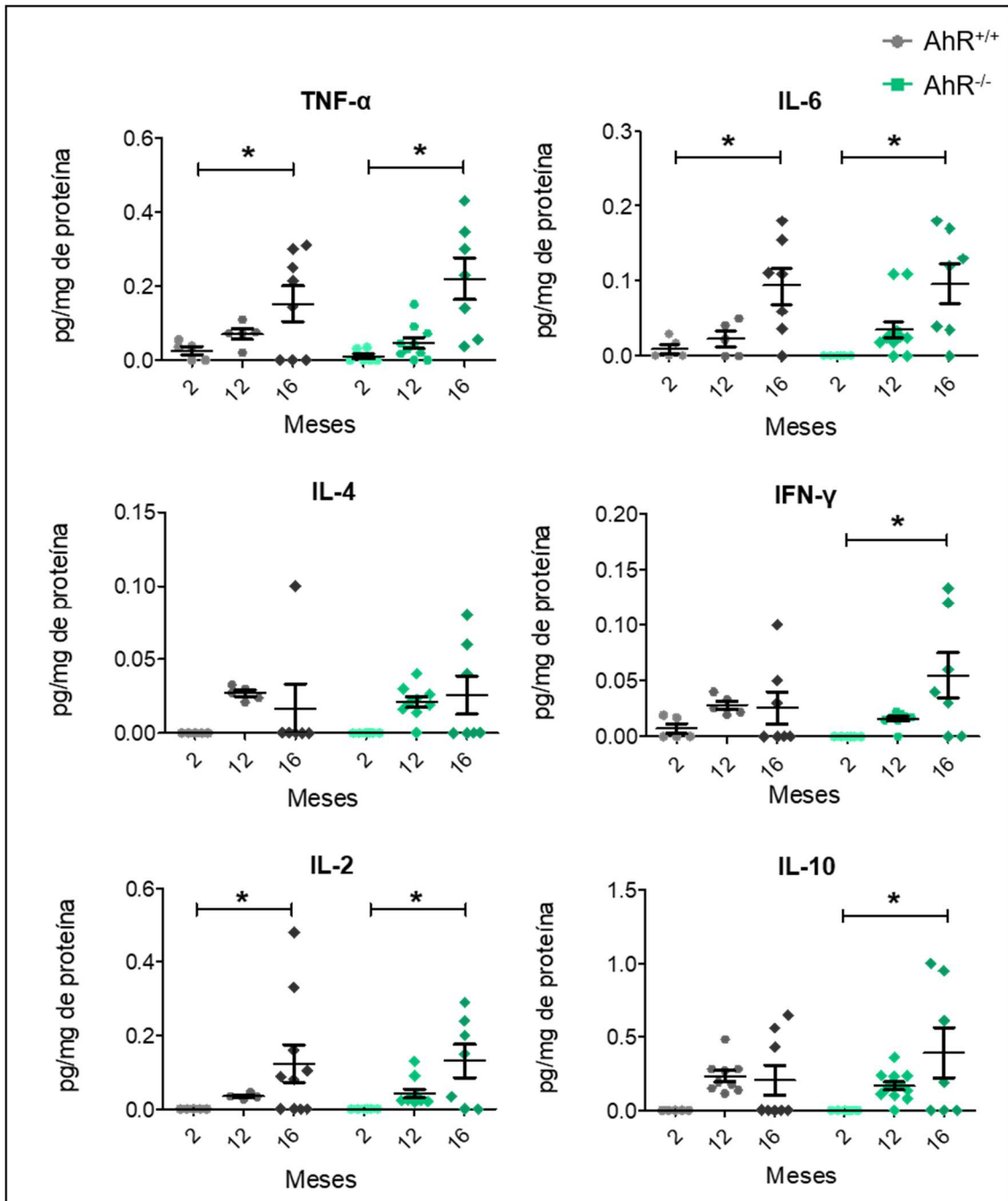


Figura 4.22. Efecto de la edad en los niveles cerebrales de citoquinas en animales AhR^{+/+} y animales AhR^{-/-}. Las concentraciones proteicas de TNF- α , IL-6, IL-4, IFN- γ , IL-2 e IL-10 en cerebro de animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} de 12 y 16 meses de edad se determinaron mediante la técnica de CBA. La media se representa en la línea central \pm error estándar (SEM). Datos analizados mediante ANOVA de dos factores ($n=11-14$ por grupo, * $p<0.05$ vs AhR^{+/+}, # $p<0,05$ vs 12 meses).

Es importante destacar que, en todas las citoquinas evaluadas, las concentraciones rozaban el límite inferior de sensibilidad. Por lo tanto, esta técnica puede no ser la más adecuada para evaluar la neuroinflamación en nuestras condiciones. No obstante, los datos obtenidos indicaban que los niveles de citoquinas empezaban a elevarse a partir de los 16 meses. Por esta razón, quisimos

RESULTADOS

evaluar el estado inflamatorio del cerebro en animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ a esa edad a través de otras aproximaciones.

4.2.3.3. Evaluación de la reactividad glial en ratones $AhR^{-/-}$ y $AhR^{-/-}$ envejecidos

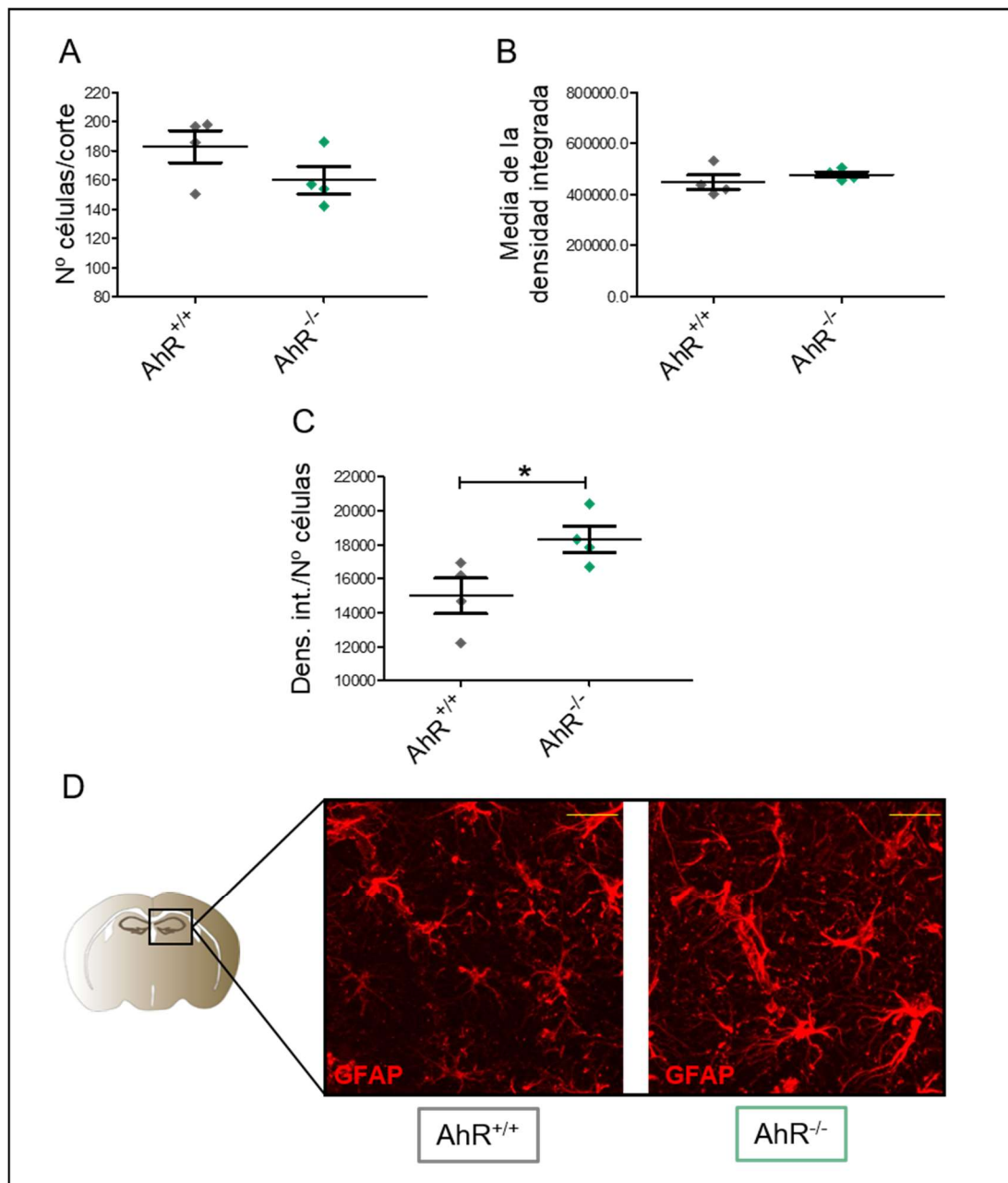


Figura 4.23. Efecto de la delección de AhR en las células astrocitarias de hipocampo en animales envejecidos. (A) Cuantificación del número de células GFAP⁺ en el hipocampo de animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ de 16 meses. (B) Cuantificación de la densidad integrada media en estos mismos animales. (C) Normalización de la densidad integrada por el número de células. (D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para GFAP (rojo) en secciones coronales de hipocampo. La media se representa en la línea central \pm error estándar (SEM). Datos analizados mediante *t* de student ($n=4$ por grupo, $*p<0.05$). Barra de escala de 25 μm .

La inflamación a nivel periférico puede afectar al SNC induciendo una respuesta por parte de los astrocitos y la microglía. Por esta razón, decidimos analizar el estado de estas células gliales en ratones envejecidos $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$. Debido a los resultados obtenidos previamente en el test de la alternancia espontánea en el laberinto en Y, en el que detectamos un déficit asociado a la edad prematuro en los animales $AhR^{-/-}$, para este estudio nos centramos en el hipocampo por su gran importancia en la memoria espacial.

Para llevar a cabo el análisis de la astroglia, tomamos microfotografías en la región hipocampal de secciones coronales de ratón para cuantificar el número de células $GFAP^+$, así como la densidad integrada de marcaje. En ninguno de estos dos parámetros detectamos diferencias significativas entre grupos (**Figura 4.23 A y B**). Sin embargo, al normalizar la densidad integrada de cada microfotografía por el número de células cuantificadas en la misma, observamos que los astrocitos de los ratones $AhR^{-/-}$ de 16 meses mostraban un mayor área e intensidad de marcaje por célula que los ratones $AhR^{+/+}$ de su misma edad (**Figura 4.23 C**).

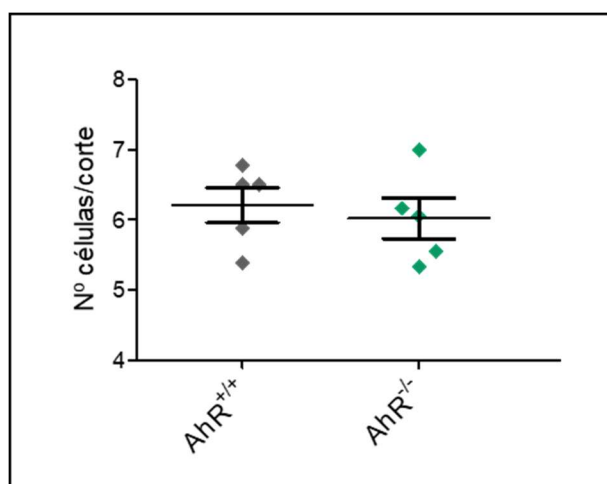


Figura 4.24. Efecto de la delección de AhR en las células microgliales de hipocampo en animales envejecidos. Cuantificación del número de células $IBA1^+$ en el hipocampo de animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ de 16 meses.

El análisis de la microglía lo realizamos también en base al número de células por sección en la región hipocampal. Dicho análisis no reveló ninguna diferencia entre los ratones $AhR^{+/+}$ y los $AhR^{-/-}$ (**Figura 4.24**). La cuantificación densitométrica se está llevando a cabo actualmente; sin embargo, los resultados preliminares

RESULTADOS

parecen indicar que la delección de AhR tampoco produce ningún cambio en el área e intensidad de marcaje de las células IBA1⁺.

El conjunto de datos obtenido sugiere que AhR está implicado en la regulación de la inflamación a lo largo de la edad tanto a nivel periférico como del SNC.

4.2.4. Efecto de la activación crónica de AhR en el envejecimiento

4.2.4.1. Efecto de la activación crónica de AhR en el desarrollo de déficits asociados a la edad

La caracterización del envejecimiento en presencia y ausencia de AhR sugiere una función importante del receptor a lo largo de la edad. A continuación, nos propusimos evaluar el efecto que podría tener una sobreactivación del receptor en animales envejecidos. En la introducción se ha descrito la importancia de la dieta como fuente de ligandos exógenos de AhR. Por esta razón, quisimos evaluar el efecto que podía tener la presencia de xenobióticos agonistas de AhR en la dieta en los animales envejecidos. Con este fin, diseñamos una dieta a la que denominamos "dieta rica en xenobióticos, (DRX). Al pienso molido de los ratones (Teklad global 18% protein rodent diets, Envigo) añadimos los siguientes tres compuestos con capacidad agonista de AhR disueltos en aceite de maíz:

- 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) a una concentración de 50 pg/kg de pienso (equivalente a una ingesta diaria aproximada de 6 pg/kg de m.c.)
- 2,2',4,4',6-Pentaclorobifenilo (PCB) a una concentración de 1,2 µg/kg de pienso (equivalente a una ingesta diaria aproximada de 150 ng/kg de m.c.)
- Benzo[a]pireno (B(a)P) a una concentración de 100 ng/kg de pienso (equivalente a una ingesta diaria aproximada de 0,5 ng/kg de m.c.)

En este punto, es importante hacer alusión a lo descrito en la introducción sobre las recomendaciones de la OMS acerca de la ingesta diaria tolerable de este tipo de compuestos. Según esta organización, la TDI recomendada para dioxinas y PCB es de 1-4 pg WHO-PCDD/F-PCB-TEQ/ kg de m.c. Las concentraciones de TCDD y PCB en la dieta rica en xenobióticos equivalían aproximadamente a 10,5 pg WHO-PCDD/F-PCB-TEQ/ kg de m.c. Respecto al (B(a)P), la OMS no ha establecido una TDI, pero en 2006 el consumo diario medio era de 4 ng/kg de m.c.

Como dieta control usamos el pienso molido al que se añadió el mismo volumen de aceite de maíz que a la dieta rica en xenobióticos.

Los animales empezaron a alimentarse con la dieta control o la dieta rica en xenobióticos con 22 meses de edad durante 6 semanas seguidas. A la sexta semana se les realizaron test comportamentales para evaluar las capacidades cognitivas y motoras.

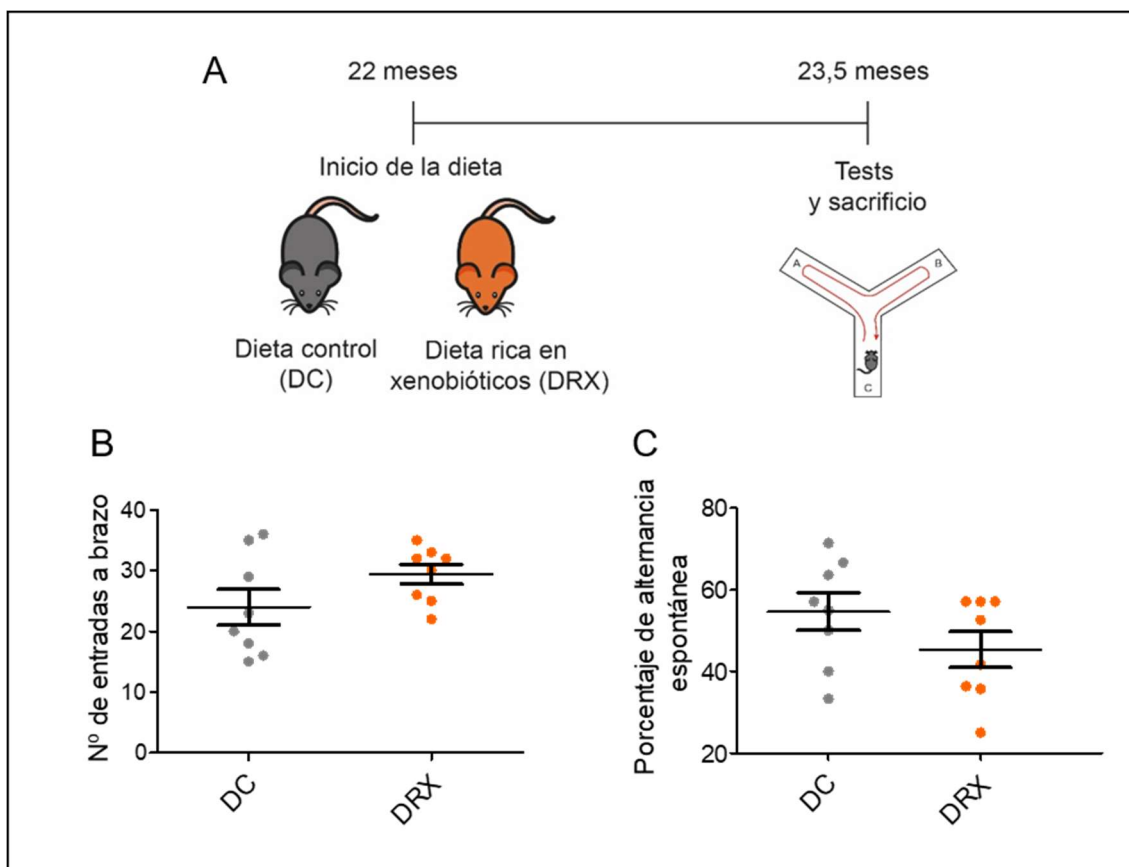


Figura 4.25. Efecto de una dieta rica en xenobióticos en la capacidad cognitiva en animales envejecidos. Evaluación de la memoria de trabajo mediante el porcentaje de alternancia espontánea en el laberinto en Y en de animales de 24 meses alimentados con una dieta rica en xenobióticos (DRX) o una dieta control (DC). (A) Diseño experimental. (B) Análisis del número de entradas a los brazos en el laberinto en Y. (C) Porcentaje de alternancia espontánea a tiempo final del test. La media se representa en la línea central \pm SEM ($n=8$ por grupo). Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías ($n=8$ por grupo, $*p<0.05$).

Para evaluar las primeras, realizamos de nuevo el test de alternancia en el laberinto en Y. El número total de visitas a los brazos fue similar para los animales alimentados con la dieta control y los alimentados con la dieta contaminada, lo que indica que el tipo de dieta no interfiere con la actividad de los ratones (Figura 4.25 A). Tampoco observamos ningún efecto de la dieta en el porcentaje de alternancia

RESULTADOS

espontánea. Para evaluar la capacidad motora realizamos un test motor de natación en el que tampoco observamos diferencias significativas entre los dos grupos en el tiempo que tardaron los animales en realizar el recorrido (**Figura 4.26**).

Con estos datos podemos concluir que la dieta rica en xenobióticos, en estas condiciones, no produce alteraciones funcionales en los ratones envejecidos. Una posible explicación para la falta de efecto es precisamente el hecho de haber utilizado ratones envejecidos, cuyos niveles de agonista circulantes son ya muy elevados, como sabemos por lo resultados previos. Por esta razón, decidimos utilizar esta misma aproximación para activar de forma crónica AhR pero en diferente contexto.

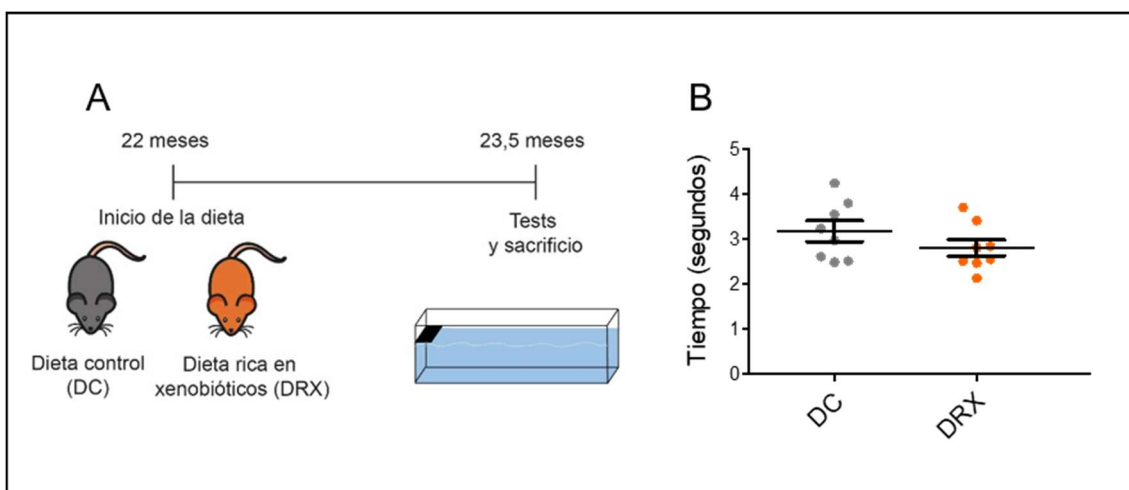


Figura 4.26. Efecto de una dieta rica en xenobióticos en la capacidad motora en animales envejecidos. Evaluación de velocidad de nado en el test motor de natación de animales de 24 meses alimentados con una dieta rica en xenobioticos (DRX) o una dieta control (DC). (A) Diseño experimental. (B) Tiempo empleado en la realización del recorrido. La media se representa en la línea central \pm SEM ($n=8$ por grupo).

4.3. Papel de AhR en un modelo patológico de envejecimiento: enfermedad de Alzheimer

4.3.1. Efecto de la activación crónica de AhR en el desarrollo de déficits cognitivos en ratones APP^{NL-F}

Nuestros resultados previos sugieren que la señalización por AhR sufre cambios asociados a la edad y que su regulación es esencial en el envejecimiento fisiológico.

Nuestro siguiente objetivo fue determinar qué podía ocurrir en un envejecimiento patológico, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer. Para

llevar a cabo este estudio, utilizamos ratones APP^{NL-F}, a los que se les ha insertado el gen humano para APP con dos mutaciones: la sueca "NF" y la ibérica "L" . Estos ratones empiezan a desarrollar placas de β -amiloide a partir de los 9 meses. Al principio estas placas se limitan a regiones concretas de corteza e hipocampo. Con el paso de los meses, las placas se van propagando a otras regiones subcorticales y los ratones empiezan a desarrollar déficits en la memoria de trabajo (Saito et al. 2014). Además, a partir de los 18 meses, se ha descrito que presentan alteraciones en la memoria de trabajo (Saito et al. 2014).

Con el propósito de estudiar el posible efecto que una activación crónica de la señalización por AhR podía ejercer en el desarrollo de la formación de placas amiloides, realizamos el diseño experimental representado en la **figura 4.27 A**. Los ratones APP^{NL-F} se alimentaron, a partir del mes y medio de edad, con una dieta control o una dieta enriquecida en xenobióticos. La composición de esta última dieta se detalla a continuación:

- 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) a una concentración de 25 pg/kg de pienso
- 2,2',4,4',6-Pentaclorobifenilo (PCB) a una concentración de 1 μ g/kg de pienso
- Benzo[a]pireno (B(a)P) a una concentración de 30 ng/kg de pienso

Tras 16 semanas de dieta, a los animales se les realizó una serie de test comportamentales para evaluar la memoria espacial y contextual, así como la memoria de trabajo. Para la valoración de la memoria a espacial, escogimos el test del laberinto en Y que evalúa la capacidad del ratón de distinguir un brazo del laberinto conocido de otro al que se le había impedido la entrada 24 horas antes (ver apartado de Materiales y Métodos). El test del contexto condicionado por miedo también evalúa la memoria espacial, pero se diferencia del anterior por la implicación del sistema límbico. En este test, se intenta que el ratón asocie un estímulo aversivo (en nuestro caso choque eléctrico) a un determinado contexto y, 24 horas más tarde, se vuelve a situar al animal en el mismo contexto para medir, mediante su comportamiento, su grado de recuerdo (Ver apartado de materiales y

RESULTADOS

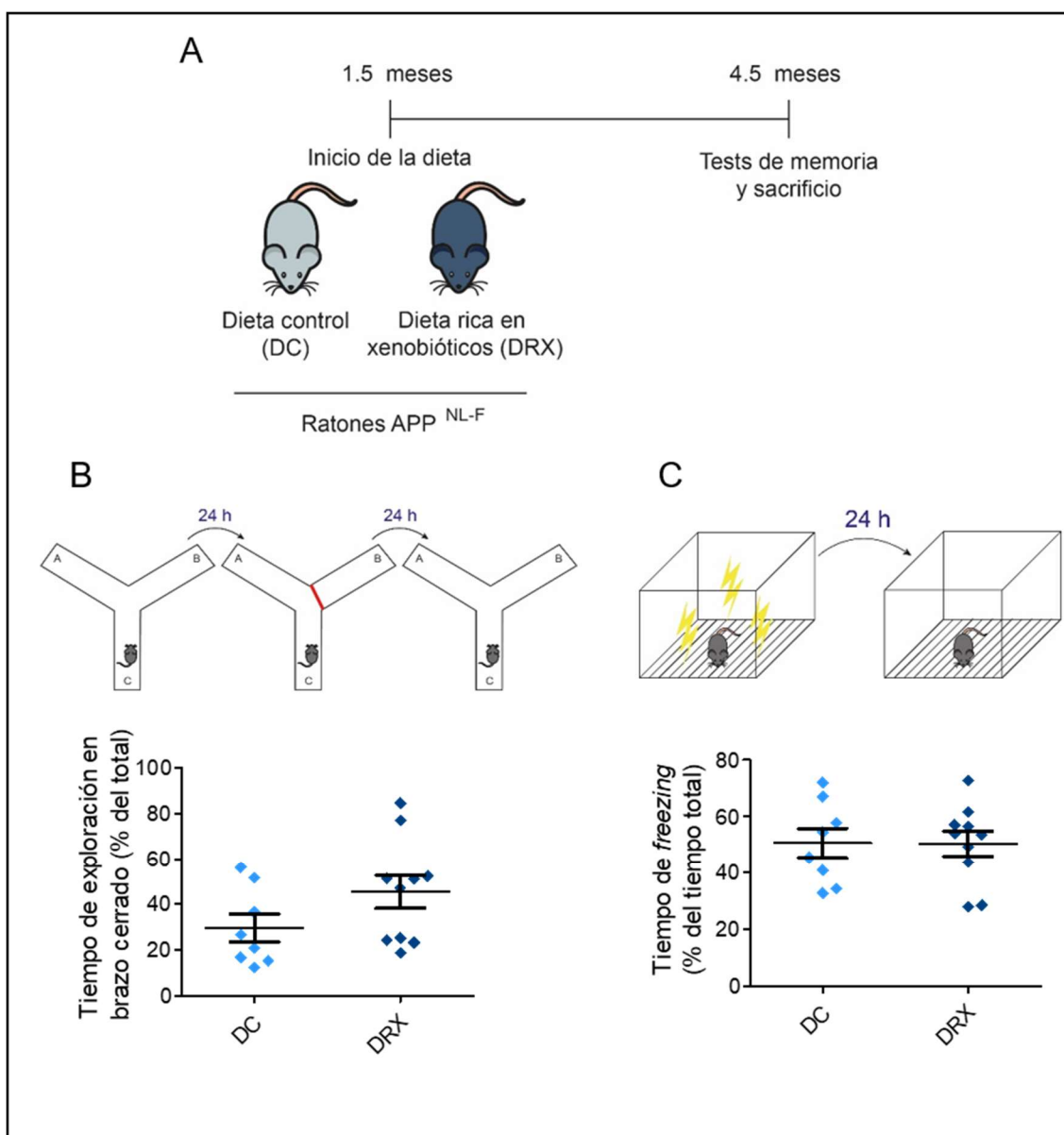


Figura 4.27. Efecto de una dieta rica en xenobióticos en la capacidad cognitiva en ratones APP^{NL-F}. Evaluación de la memoria espacial y contextual en ratones APP^{NL-F} alimentados con una dieta rica en contaminantes (DRX) o una dieta control (DC). **(A)** Diseño experimental. **(B)** Análisis del tiempo de exploración en el brazo cerrado en la fase de retención del laberinto en Y. **(C)** Análisis del tiempo de “freezing” en la fase de retención del test del contexto condicionado por miedo. Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías ($n=8$ por grupo, $*p<0.05$).

métodos). En ninguno de estos dos test observamos ninguna diferencia entre los ratones alimentados con la dieta control y los que lo habían sido con la dieta rica en xenobióticos (**Figura 4.27 B y C**), por lo que esta última no parecía haber ejercido ningún efecto en la memoria espacial.

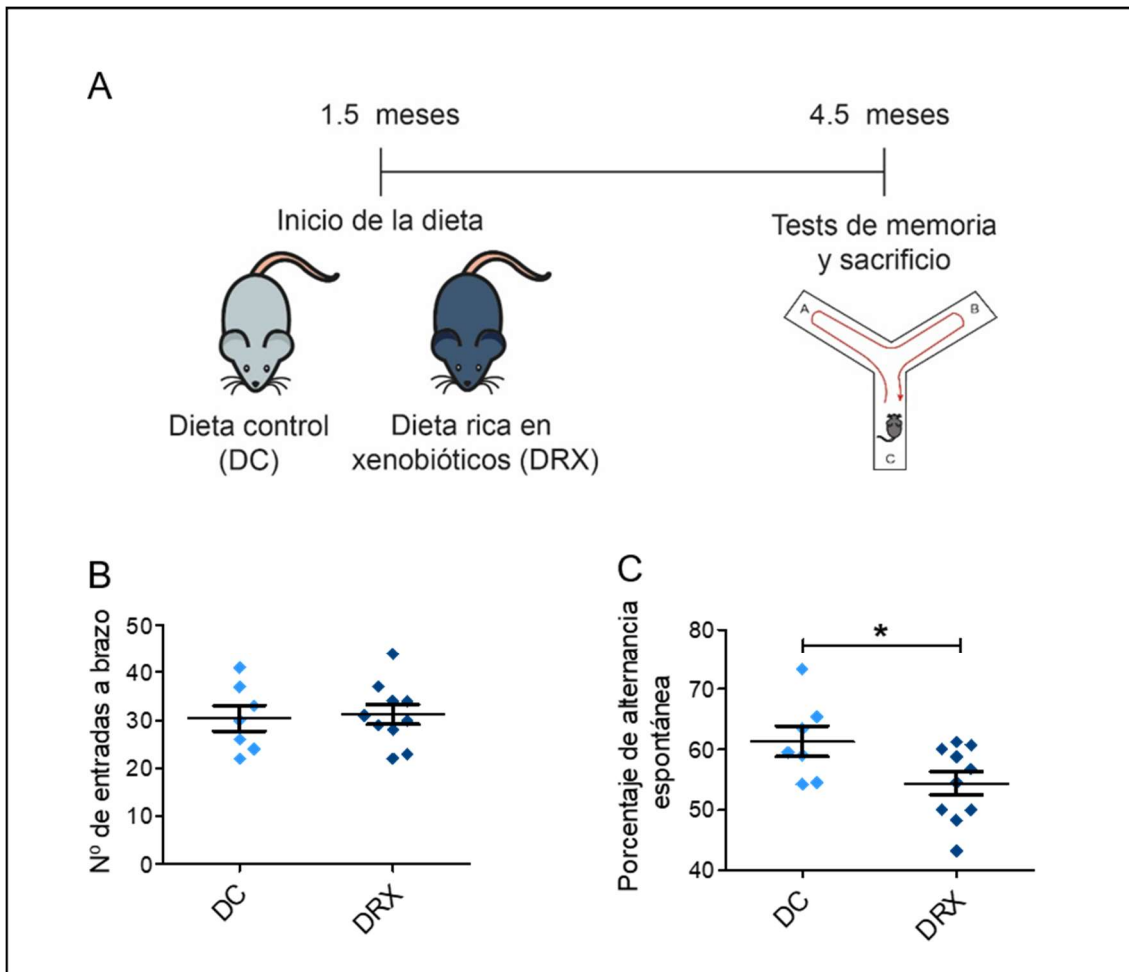


Figura 4.28. Efecto de una dieta rica en xenobióticos en la memoria de trabajo en ratones APP^{NL-F} . (A) Diseño experimental. (B) Análisis del número de entradas a los brazos en el laberinto en Y. (C) Porcentaje de alternancia espontánea a tiempo final del test. La media se representa en la línea central \pm SEM ($n=8$ por grupo). Datos representados como media \pm SEM y analizados mediante ANOVA de dos vías ($n=8$ por grupo, $*p<0.05$).

Para determinar posibles cambios asociados a la dieta en la memoria de trabajo, utilizamos el test de alternancia espontánea en el laberinto en Y, puesto que habíamos comprobado que, en nuestro contexto, este test era lo suficientemente sensible para detectar déficits en este tipo de memoria. Además, Saito y col. demostraron previamente que los ratones APP^{NF-L} presentaban un menor porcentaje de alternancia espontánea en este test respecto a sus controles APP^{WT} (Saito et al. 2014). El número de entradas a los brazos fue semejante en ambos grupos, sin embargo, el porcentaje de alternancia espontánea en el grupo de animales alimentados con la dieta rica en xenobióticos fue menor que en el grupo

RESULTADOS

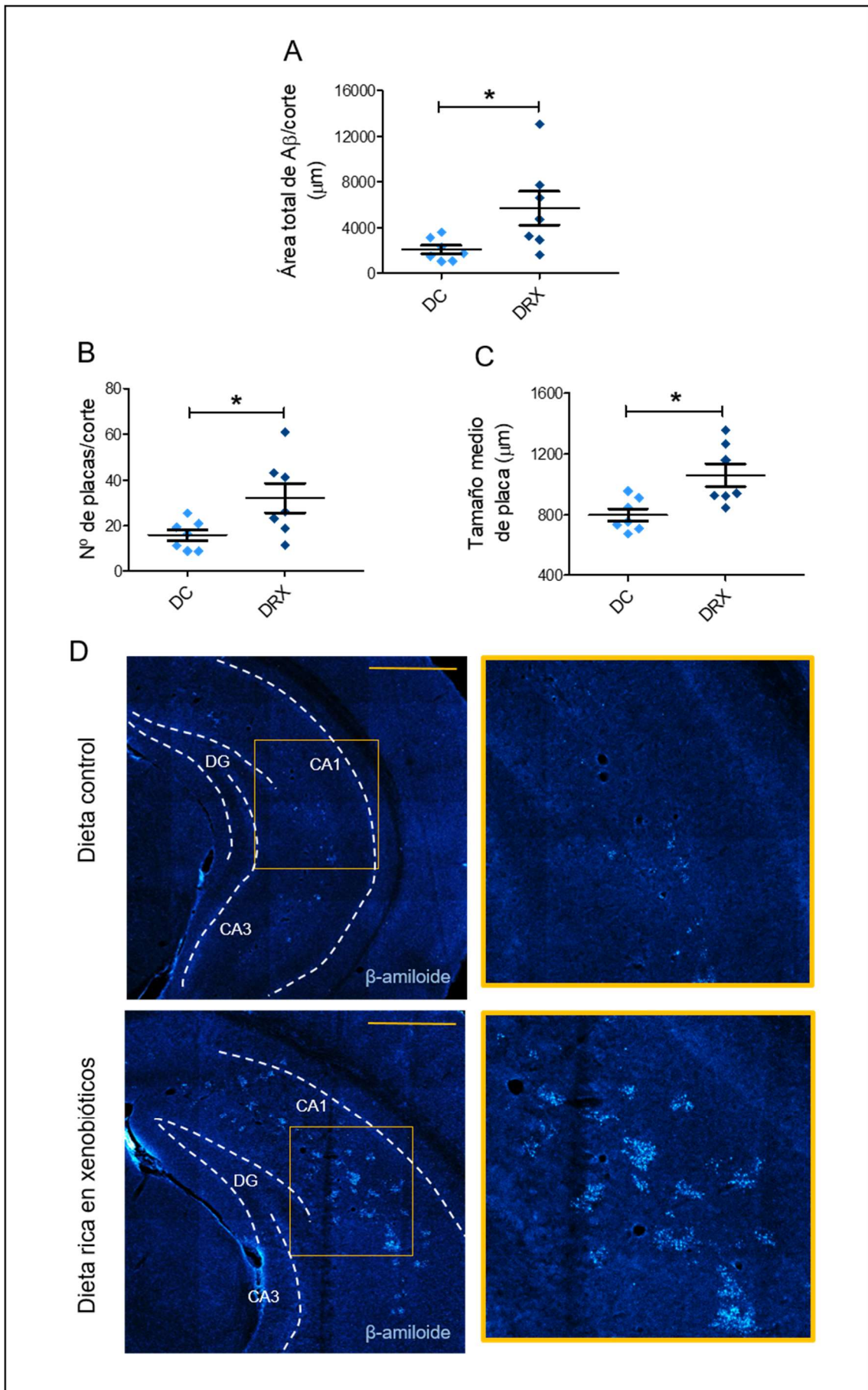


Figura 4.29. Efecto de una dieta rica en xenobióticos en la aparición de placas amiloides en ratones APP^{NL-F} en hipocampo. (A) Cuantificación del área positiva para el marcaje A β normalizado por el número de cortes analizados (B) Cuantificación del número de placas amiloides normalizado por el número de cortes analizados. (C) Análisis del tamaño medio de placa. La media se representa en la línea central \pm SEM. Datos analizados mediante t de student ($n=8$ por grupo, $*p<0.05$). (D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para A β (azul) en secciones coronales de hipocampo en animales alimentados con la dieta control y en animales alimentados con la dieta rica en xenobióticos. Barra de escala de 500 μ m.

control lo que indica que esta dieta tiene un efecto deletéreo en la memoria de trabajo de los animales APP^{NL-F} (Figura 4.28 C).

4.3.2. Efecto de la activación crónica de AhR en el desarrollo de placas amiloides en ratones APP^{NL-F}

Tras las diferencias detectadas en la memoria de trabajo entre las dos dietas, procedimos al análisis de las placas β -amiloide por inmunofluorescencia en secciones coronales de cerebro. En ambos grupos detectamos placas de β -amiloide en el hipocampo. Sin embargo, la cantidad y el tamaño de las mismas difería entre las dos dietas. En el grupo de ratones de la dieta rica en xenobióticos había una mayor área de marcaje para A β , un mayor número de placas amiloides y éstas eran de un tamaño medio mayor (Figura 4.29 A-C).

En ambos grupos de animales, las placas se encontraron principalmente en la región de CA1, aunque en los animales de la dieta rica en xenobióticos se encontraron algunas placas dispersas en la región del giro dentado y en CA2/3.

Por último, nos preguntamos si existía algún tipo de relación entre el grado de activación de AhR y la aparición de placas amiloides. Dado que anteriormente habíamos comprobado que existe una correlación positiva entre los niveles de ligando de AhR circulantes y la expresión de Cyp1B1 en hígado, decidimos analizar los niveles de este gen, así como del gen Cyp1A1 y del propio AhR. En el caso de AhR, no se encontró relación alguna entre sus niveles hepáticos y los 3 parámetros de análisis de las placas (área de A β por corte, número de placas por corte y tamaño medio de placa), como tampoco en el caso de Cyp1A1 (Figura 4.30 A y B). Respecto al gen Cyp1B1, detectamos una correlación lineal entre su expresión en hígado con el área de marcaje de A β y con el número de placas, pero no con el tamaño medio de las mismas (Figura 4.30 C).

RESULTADOS

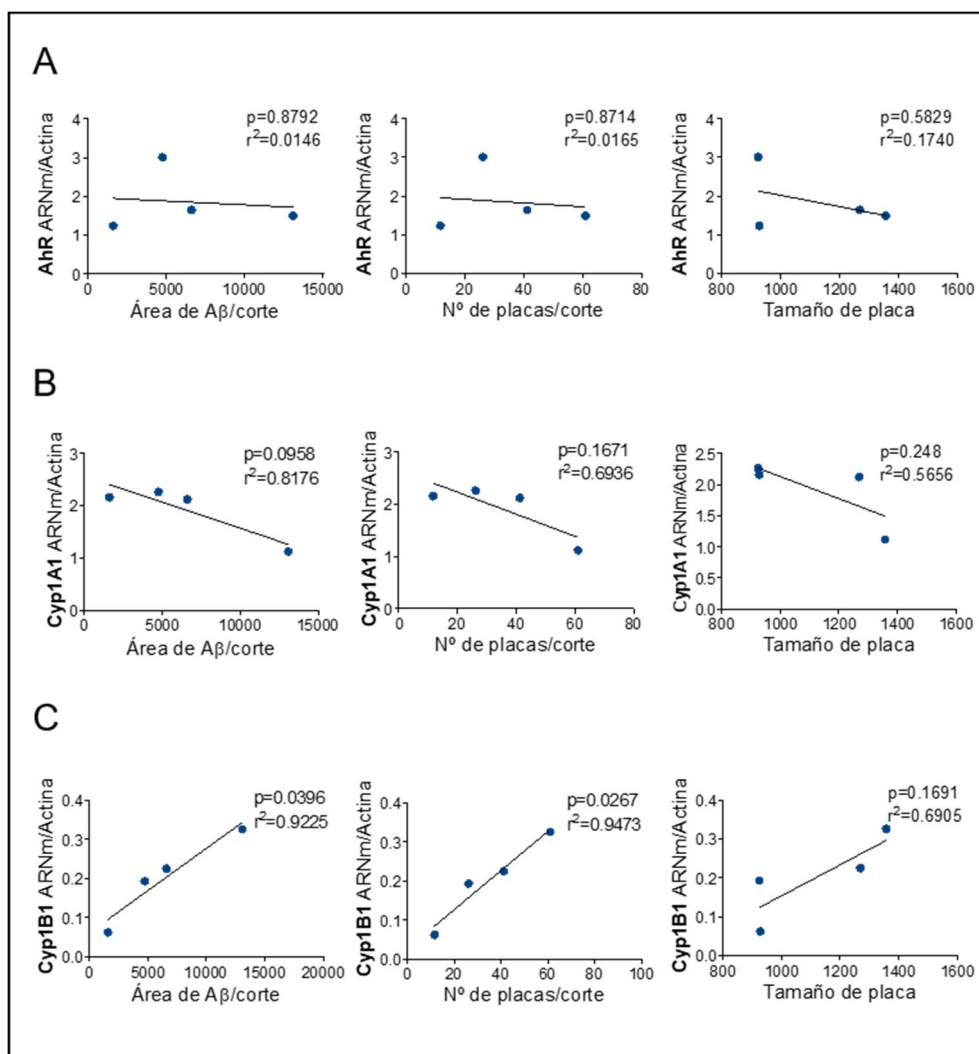


Figura 4.30. Relación entre los niveles de AhR, Cyp1A1 y Cyp1B1 en hígado y la aparición de placas amiloides en hipocampo en los animales alimentados con una dieta rica en xenobióticos. Correlación lineal entre los niveles de ARNm de AhR (A), Cyp1A1 (B) y Cyp1B1 (C) en hígado y el área de marcaje para Aβ por corte, el número de placas por corte y el tamaño medio de placa en hipocampo. Los círculos corresponden a los datos de los animales alimentados con la dieta rica en xenobióticos. Datos analizados mediante r de Pearson (n=4).



5. Discusión

El papel de AhR en el SNC ha sido estudiado por diversos grupos en distintos contextos patológicos como la isquemia cerebral y la encefalitis autoinmune experimental (Cuartero et al. 2014; Rothhammer et al. 2016). Por otro lado, también hay evidencias de la implicación del receptor en diferentes fenómenos asociados al envejecimiento como el agotamiento de células madre hematopoyéticas y la pérdida de función vascular que acontece con la edad (Singh et al. 2013; Eckers et al. 2016). Sin embargo, hasta la fecha, no existen estudios que examinen la función de AhR en el envejecimiento cerebral.

5.1. Regulación de AhR por la edad

5.1.1. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR en cerebro

5.1.1.1. Efecto de la edad en la expresión de AhR en cerebro

Los resultados presentados en esta Tesis doctoral muestran, por primera vez, que en el envejecimiento se producen cambios en los niveles de expresión de AhR en el cerebro. Hemos detectado que, con la edad, se produce una disminución de la expresión proteica del receptor que afecta al hipocampo y a la corteza, pero no al estriado. Estudios previos ya habían puesto de manifiesto que AhR se expresa en diferentes estructuras del cerebro adulto, como corteza, hipocampo, hipotálamo y cerebelo (Petersen et al. 2000). No obstante, estos estudios se habían realizado sólo en adultos jóvenes. Recientemente, se ha publicado un estudio espacio-temporal de la expresión de AhR en cerebro de ratones desde etapas prenatales hasta los 12 meses de edad (Kimura and Tohyama 2017). A través de la técnica de hibridación *in situ*, han podido detectar ARNm del receptor en bulbo olfatorio, cerebelo, hipocampo y corteza (estructura que mostró los niveles más altos de expresión) en todas las etapas estudiadas. Aunque el objetivo de los autores no es tanto detectar las variaciones a lo largo de la edad como las variaciones entre la etapa embrionaria y la postnatal, el estudio resalta la especificidad y potencial importancia del patrón espacial en la expresión de AhR. Nuestros datos también sugieren una estrecha regulación a nivel regional puesto que la edad no afecta del mismo modo a la expresión en las diferentes estructuras analizadas.

DISCUSIÓN

Respecto a la expresión de AhR a lo largo de la edad, hasta la fecha sólo existe un trabajo centrado en una estructura del SNC, que es el epitelio pigmentario de la retina (RPE, por sus siglas en inglés) (Hu et al. 2013). En este estudio sí se describe cómo decae la expresión de AhR en el envejecimiento en las células del RPE. Por lo tanto, todo parece indicar que en aquellas estructuras del SNC en las que cambia la expresión de AhR a lo largo de la edad, este cambio se traduce en una disminución de los niveles del receptor.

A través de los estudios de colocalización con inmunohistoquímica detectamos que la localización de AhR era principalmente neuronal, como ya habíamos descrito previamente en nuestro grupo (Cuartero et al. 2014). En el trabajo de Cuartero y colaboradores, cuyo objeto de estudio fue el papel de AhR en un modelo de isquemia experimental, se describió la localización del receptor en cerebro, mayoritariamente en neuronas, tanto en animales isquémicos como en animales sham.

En los ratones jóvenes, encontramos también alguna colocalización puntual con astrocitos tanto en corteza como en hipocampo. Sin embargo, en los ratones de 24 meses la presencia del receptor sólo se detectó en neuronas. La ausencia de colocalizaciones con células GFAP⁺ podría deberse a una ausencia de AhR en este tipo celular en los animales envejecidos. Sin embargo, también cabe la posibilidad de que el marcaje con inmunohistoquímica no sea lo suficientemente sensible para detectar la expresión cuando ésta es muy baja. La presencia de AhR en astrocitos se ha descrito en varios estudios (Filbrandt et al. 2004; Rothhammer et al. 2016). Respecto a las células microgliales, trabajos previos han observado expresión de AhR en este tipo celular ante estímulos inflamatorios (Rothhammer et al. 2018; Lee et al. 2015; Buttgereit et al. 2016). Sin embargo, nosotros no observamos presencia alguna del receptor en estas células. Esta aparente discrepancia podría deberse a que la expresión de AhR en este tipo celular sea dependiente de la presencia de un estímulo dañino agudo y que, en ausencia de dicho estímulo, los niveles del receptor sean mínimos.

En definitiva, demostramos que la expresión de AhR, cuya localización es principalmente neuronal, disminuye de forma notable en regiones concretas de cerebro de ratón.

En su función como factor de transcripción, AhR forma un heterodímero con ARNT. Por lo tanto, además de la expresión de AhR en cerebro a distintas edades, en esta Tesis Doctoral también se ha estudiado el efecto de la edad en la expresión de su "compañero" transcripcional. Las estructuras analizadas a este respecto fueron la corteza y el hipocampo y los resultados obtenidos fueron diferentes en cada una de ellas. Mientras que en la corteza cerebral no encontramos diferencias entre los ratones de 2 y 24 meses, en el hipocampo detectamos una disminución de la expresión de esta proteína en los animales envejecidos. La diferencia encontrada entre ambas estructuras nos llamó la atención y vuelve a ser un indicativo de la alta regulación a nivel local de la vía de señalización de AhR.

Dado el relevante papel que ARNT tiene en la función de AhR, los cambios asociados a la edad en sus niveles de expresión podrían facilitar ciertas pistas sobre el grado de funcionalidad del receptor. Como se ha explicado antes, la formación del dímero AhR-ARNT es esencial para que el receptor pueda ejercer su función como factor de transcripción. Sin embargo, respecto a la función E3 ubiquitina ligasa de AhR, queda por esclarecer la posible participación de ARNT. Lo que sí se sabe es que, al actuar como ubiquitina ligasa, AhR se asocia a una serie de proteínas para formar un complejo funcional (complejo CUL4B^{AhR}). Cuando se describió por primera vez esta función del receptor, se identificaron por co-inmunoprecipitación las proteínas que formaban parte de dicho complejo, entre las que se encontraba ARNT (Ohtake et al. 2007). Sin embargo, un estudio posterior publicó que la degradación del receptor de estrógenos por parte del complejo CUL4B^{AhR} es independiente de ARNT y que, de hecho, cuando la disponibilidad de esta proteína es menor, la función de AhR como E3 ligasa se potencia (Luecke-Johansson et al. 2017). Por lo tanto, las diferencias en los cambios asociados a la edad entre la corteza y el hipocampo en la expresión de ARNT podrían indicar que la función predominante que ejerce AhR en cada estructura es diferente. En cualquier caso,

DISCUSIÓN

nuestros datos sugieren que, independientemente del mecanismo, los cambios de expresión de AhR podrían afectar su función en las edades más avanzadas.

5.1.1.2. Efecto de la edad en la función transcripcional de AhR en cerebro

Para el análisis de la función transcripcional de AhR en cerebro, decidimos determinar los niveles de dos de sus genes diana: Cyp1A1 y Cyp1B1.

Inicialmente, los experimentos se realizaron con ARNm procedente de extractos de cerebro completo, tanto a nivel basal como tras activación aguda de AhR. En primer lugar, es importante señalar que nuestros resultados confirman lo descrito previamente en la literatura sobre la naturaleza principalmente inducible del gen Cyp1A1 frente al carácter más constitutivo del gen Cyp1B1 (Hakkola et al. 1997; Kerzee and Ramos 2001). Nuestros datos muestran que, en condiciones basales, los niveles de expresión de Cyp1B1 en cerebro son diez veces más altos en cerebro que los niveles de Cyp1A1, pero que, tras la activación aguda de AhR, la inducción de la expresión de Cyp1A1 es diez veces mayor que la de Cyp1B1.

Respecto al efecto de la edad, en los niveles basales de Cyp1A1 no encontramos ninguna diferencia entre los animales de 2 meses y los de 24. Dado que la expresión constitutiva de este gen es mínima (Nebert et al. 2004), no resulta extraño que las diferencias en la expresión de AhR por la edad no tengan efecto alguno en los niveles basales de esta enzima. Sin embargo, en los niveles de Cyp1B1, cuya expresión constitutiva es más alta, sí encontramos diferencias entre los ratones jóvenes y los ratones de mayor edad, siendo más altos en estos últimos. Además, tras la activación aguda de AhR, no observamos diferencias en el porcentaje de inducción entre las dos edades en ninguno de los dos genes. Estos resultados nos llamaron la atención puesto que, tanto en corteza como en hipocampo, habíamos detectado un descenso en los niveles proteicos de AhR.

La relación entre los niveles de AhR y estos dos genes diana ha sido previamente estudiada en linfocitos humanos (Lin, Hu, and Chang 2003), donde se ha podido comprobar que los niveles de AhR se correlacionan con la expresión basal de Cyp1B1, así como con la inducción de Cyp1A1 tras activación del receptor. La aparente discrepancia en nuestros datos entre los niveles de AhR y los niveles de

sus genes diana podría radicar en el hecho de que, al realizar el experimento con cerebro completo, la contribución del AhR presente en corteza e hipocampo quede diluida con el resto de estructuras cerebrales. Sin embargo, esto parece poco probable dado que la corteza es la estructura predominante en los extractos de cerebro completo. De hecho, al evaluar los niveles proteicos de Cyp1B1 a nivel basal en corteza obtuvimos el mismo resultado que en los extractos de cerebro completo: un aumento en la expresión en los ratones envejecidos.

El conjunto de estos datos sugiere, por lo tanto, que el descenso de los niveles de AhR en los animales envejecidos no está acompañado de una reducción en su función transcripcional, al menos en los genes diana estudiados, ni en condiciones basales ni tras su activación tras un estímulo agudo.

Por otro lado, en el hipocampo, los niveles basales de Cyp1B1 no mostraron cambios a lo largo de la edad. Las diferencias entre los cambios asociados a la edad en esta estructura y la corteza vuelven a poner de relieve la estrecha regulación a nivel local que se da en la señalización de AhR en cerebro. En este sentido, es importante recordar los niveles de expresión de ARNT. En corteza, estos niveles se mantienen a lo largo de la edad mientras que los de Cyp1B1 aumentan, y, en el hipocampo, es la expresión de Cyp1B1 la que se mantiene constante mientras que la de ARNT disminuye. Con estos resultados parece probable que, en cerebro, la cantidad disponible de ARNT sea decisiva en los niveles de expresión constitutiva de Cyp1B1.

En cualquier caso, un factor adicional a tener en cuenta es que AhR es un factor de transcripción activado por ligando, por lo que los niveles de sus agonistas son determinantes su actividad transcripcional de AhR por ligando. Este tema se abordará más adelante en la discusión.

Por otra parte, existen otros factores importantes en la regulación de la expresión de Cyp1B1, como son los niveles de citoquinas. Se ha demostrado que, en ciertos casos, citoquinas proinflamatorias pueden inducir la expresión de este gen (Šmerdová et al. 2014; Patel et al. 2014). Como se mencionó en la introducción, los niveles de citoquinas aumentan con la edad por el fenómeno conocido como

DISCUSIÓN

inflammaging tanto en el SNC como a nivel periférico (Michaud et al. 2013; Sparkman and Johnson 2008). Por lo tanto, no podemos descartar que el incremento en los niveles de estos mediadores inflamatorios en los animales envejecidos contribuya al aumento en la expresión de Cyp1B1.

5.1.2. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR a nivel periférico

5.1.2.1. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR en el hígado

Cuando se activa la función transcripcional de AhR induciendo la expresión de varios miembros de la familia del citocromo P450, el receptor está actuando como un sensor de los xenobióticos y desencadenando una respuesta celular que, en último término, conduce al metabolismo de los compuestos que lo han activado (Barouki, Coumoul, and Fernandez-Salguero 2007). En este sentido, AhR está desarrollando una función de detoxificación y el órgano detoxificador por excelencia es el hígado. Por esta razón, decidimos evaluar el posible efecto de la edad en la señalización de AhR en este órgano.

Contrariamente a lo observado en cerebro, al analizar la expresión de proteína de AhR en el hígado detectamos que la edad producía, en este órgano, un aumento en los niveles del receptor. Además, pese a observar un incremento a nivel de proteína, no encontramos diferencias significativas en el análisis de la expresión de ARNm entre los ratones de 2 meses y los de 24, aunque sí se detectó una tendencia al alza en los animales de mayor edad. Esta aparente discordancia entre niveles de ARNm y proteína podría deberse a diferentes motivos. Por un lado, se ha descrito en distintos tejidos que la expresión de AhR puede inducirse en condiciones de alteración homeostática y/o daño tisular, como es la inflamación (Tanaka et al. 2005; Champion et al. 2013) o excitotoxicidad (Cuartero et al. 2014). También se ha demostrado que AhR es degradado vía proteosoma una vez ha realizado su acción al activarse por un ligando exógeno (Ma and Baldwin 2000; Davarinos and Pollenz 1999). Sin embargo, poco se conoce sobre la regulación de su expresión en condiciones basales, sin un estímulo que active su ruta de señalización, más allá de los cambios que pudieran producirse en los posibles ligandos endógenos. Es posible, por lo tanto, que la tasa de reposición en ausencia de un estímulo agudo

sea más lenta, de forma que se degrade menos proteína y se requiera menos expresión de mensajero. Otra posibilidad que no puede descartarse es que el declive funcional que sufre el proteosoma con la edad (Saez and Vilchez 2014) esté provocando una acumulación de AhR por una ausencia de su degradación en hígado.

Curiosamente, a pesar de las diferencias en los niveles de AhR entre los cambios asociados a la edad en cerebro y en hígado, en lo que concierne a la expresión de los genes diana, en condiciones basales, los resultados fueron los mismos que en cerebro. En los niveles de Cyp1A1 no observamos diferencias entre los animales jóvenes y los animales envejecidos, mientras que en los de Cyp1B1 se produce un incremento de la expresión con la edad. Tras la activación aguda del receptor por inyección del agonista FICZ, el porcentaje de inducción de Cyp1A1 fue mucho mayor en los animales de 24 meses que en los de 2; sin embargo, en los niveles de Cyp1B1 fue similar en los dos grupos.

El hecho de que, en condiciones basales, la expresión de Cyp1B1, el gen con carácter más constitutivo, sea mayor en el grupo de 24 meses y que, tras la activación de AhR, el porcentaje de inducción de Cyp1A1, el gen más inducible de los dos, sea también mayor en los animales envejecidos, apoya la idea de que, en el hígado, a diferencia de lo que ocurre en cerebro, los niveles proteicos de AhR tienen una alta relación con su función transcripcional.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que la expresión constitutiva de Cyp1B1 se regula a través de AhR (Yang et al. 2008). Sería posible que el receptor pudiera activarse de forma espontánea; no obstante, son numerosas las evidencias que apuntan a que la presencia de ligando agonista es esencial para desencadenar la señalización de AhR (Esser, Rannug, and Stockinger 2009). Por lo tanto, lo más probable es que, en ausencia de un estímulo exógeno, la activación de AhR sea a través de los propios ligandos endógenos.

5.1.2.2. Efecto de la edad en los niveles circulantes de ligandos agonistas de AhR

Nuestros resultados ponen de manifiesto por primera vez que, durante el envejecimiento, se produce un incremento de los niveles plasmáticos de ligandos

DISCUSIÓN

agonistas de AhR. Además, hemos establecido una correlación positiva entre los niveles de Cyp1B1 en el hígado en condiciones basales y los niveles plasmáticos de dichos ligandos en plasma. Este hecho apoya la idea de que la expresión constitutiva de Cyp1B1 está regulada por AhR y refuerza la hipótesis de su implicación en el envejecimiento.

En humanos, se ha descrito previamente un aumento en los niveles plasmáticos de ligandos de AhR en contextos patológicos como la diabetes tipo II (Roh et al. 2015). Además, estos niveles se han asociado con diferentes parámetros del síndrome metabólico y de disfunción mitocondrial (Wook-Ha et al. 2013). Los ligandos de AhR también se han estudiado en pacientes de esclerosis múltiple, en los cuales se ha visto un descenso de las concentraciones plasmáticas en las fases remitentes de la enfermedad, pero un aumento de las mismas durante los brotes en comparación con controles sanos (Rothhammer et al. 2017).

En la señalización por AhR, el tipo de ligando agonista que estimula al receptor tiene una importancia capital (Sorg 2014). En el contexto de la inflamación, se ha demostrado que las funciones de AhR pueden llegar a ser opuestas dependiendo del agonista que lo active (Quintana 2013). Por ejemplo, en la EAE se ha descrito que la activación de AhR por TCDD induce la expansión de linfocitos T reguladores y mejora la sintomatología. Sin embargo, la estimulación del receptor con el agonista FICZ interfiere en el desarrollo de estas mismas células y provoca un empeoramiento de los síntomas de la EAE (Quintana et al. 2008).

En este sentido, la metodología utilizada para detectar la actividad agonista del plasma en nuestro estudio es importante. Al haberlo realizado a través de un ensayo de luciferasa, nuestros resultados reflejan el conjunto final de todas aquellas moléculas capaces de activar la acción transcripcional de AhR, independientemente de su estructura u origen. La ventaja de esta técnica es que consigue detectar el nivel de activación real al que está sometido AhR a nivel sistémico y que se haría patente en órganos altamente irrigados, como es el hígado. Sin embargo, este ensayo no nos permite diferenciar el tipo de molécula cuyos niveles están aumentados en los animales envejecidos.

El origen de los ligandos de AhR puede ser diverso. Es fácil imaginar que, hoy en día, la exposición mayoritaria a agonistas de AhR sea por xenobióticos derivados de la contaminación. Sin embargo, dadas las condiciones de mantenimiento de nuestros ratones, parece poco probable que sus agonistas plasmáticos provengan de la contaminación ambiental. Por lo tanto, otro posible origen de ligandos de AhR es a través del metabolismo de compuestos provenientes de la dieta, principalmente del triptófano cuya degradación, tanto por la vía de las kinureninas como por la de los índoles, da lugar a varios agonistas del receptor (Park et al. 2015). El metabolismo de los compuestos provenientes de la dieta está estrechamente ligado a la flora intestinal (Lee et al. 2017) y los cambios que se producen en ella a lo largo de la edad han sido ampliamente descritos (Buford 2017). A este respecto, en 2013 se publicó un estudio metagenómico sobre el perfil del microbioma intestinal en personas centenarias que puso de manifiesto que la edad produce un incremento en los genes relacionados con el metabolismo de ciertos aminoácidos, siendo los del triptófano los que más aumentaban (Rampelli et al. 2013). Estas evidencias sugieren que el aumento de los niveles plasmáticos de agonistas de AhR con el envejecimiento proceden, al menos en parte, del metabolismo del triptófano por la microbiota. Uno de los ligandos endógenos que más relevancia está cobrando en los últimos tiempos es uno de estos metabolitos del triptófano, la L-kinurenina (Nguyen et al. 2014; Moyer et al. 2016; Zelante et al. 2013; Campesato et al. 2018).

Por esta razón, decidimos estudiar la ruta de las kinureninas en el plasma de los ratones jóvenes y en el de los ratones envejecidos. Aunque los resultados son todavía preliminares, todo parece confirmar que, en efecto, la edad provoca un incremento del metabolismo del triptófano a través de esta ruta, aumentando los niveles de sus intermediarios.

Se ha observado que los niveles de L-kinurenina se elevan en condiciones de inflamación (Campbell et al. 2014). En pacientes de esclerosis lateral amiotrófica se ha descrito un incremento en las concentraciones de esta molécula en suero y líquido cefalorraquídeo (Chen et al. 2010). Sus niveles plasmáticos también se han asociado con un mayor riesgo de mortalidad en enfermos cardiovasculares (Zuo et

DISCUSIÓN

al. 2016). Además, también se ha demostrado que, en un modelo experimental de isquemia, los niveles de esta molécula aumentan en el área infartada a las pocas horas del evento (Cuartero et al. 2014). A pesar de estos datos, existe cierta controversia sobre el papel que la activación de AhR mediante la L-kinurenina puede tener en los procesos inflamatorios (Mándi and Vécsei 2012). Mientras que hay autores que sostienen que el incremento de la molécula contribuye al daño (Davis and Liu 2015), otros mantienen que es un mecanismo de compensación anti-inflamatorio (Rothhammer et al. 2017) y le otorgan a AhR un papel esencial en el control de la inflamación a través de su regulación por sus ligandos endógenos (Rothhammer et al. 2016). Todos estos precedentes aumentan el interés por las alteraciones que la edad pueda producir en ruta de las kinurenina y su posible relación con el fenómeno de *inflammaging*.

Por otro lado, queda por determinar si el aumento periférico en los niveles de agonista afecta a los niveles de ligando a nivel cerebral. En este sentido, se ha demostrado que la L-kinurenina plasmática es captada por el cerebro a través de la BHE (Fukui et al. 1991). Además, un estudio sobre los cambios producidos por el envejecimiento en la ruta de las kinureninas puso de manifiesto que la edad produce un aumento en los niveles tanto de L-kinurenina como de ácido kinurénico, así como un incremento en la actividad de la indolamina 2,3 deoxigenasa (IDO), que es la primera enzima en actuar en la ruta de las kinureninas. En este punto, hay que recordar los resultados obtenidos respecto al efecto de la edad en los niveles de Cyp1B1 a nivel cerebral, donde encontramos un aumento en la expresión de este gen diana de AhR en los animales de mayor edad. Por lo tanto, nuestros datos plantean la posibilidad de que este aumento podría ser consecuencia del incremento en los niveles de ligando a nivel cerebral procedentes de la circulación o bien sintetizados a nivel local.

5.1.3. Efecto de la edad en la expresión y función de AhR: perspectivas futuras

En el primer objetivo de esta Tesis Doctoral hemos demostrado cómo la edad afecta a la expresión y la función de AhR, así como a los niveles de otros mediadores implicados en su ruta de señalización. Uno de los hallazgos más interesantes es el

incremento que se produce con la edad en los niveles de agonistas de AhR a nivel sistémico. Junto a este aumento, hemos detectado un incremento tanto de expresión como de función del receptor a nivel hepático. La correlación positiva existente entre los niveles plasmáticos de ligando y la expresión de Cyp1B1 apoya la idea de que el aumento de AhR y de su función transcripcional en el hígado es consecuencia del incremento de los agonistas del receptor a nivel sistémico.

Sin embargo, los resultados obtenidos a nivel cerebral son más controvertidos: mientras que la expresión del receptor, localizado principalmente en neuronas, disminuye tanto en corteza como en hipocampo con la edad, su función transcripcional no parece estar afectada por este descenso. Además, a nivel basal, los niveles de Cyp1B1 son mayores en los animales envejecidos, por lo que parece bastante probable que los niveles de agonistas de AhR en cerebro estén aumentados en el envejecimiento, aunque estas suposiciones deben ser comprobadas. Por otro lado, las diferencias encontradas en el efecto ejercido por la edad entre corteza e hipocampo en ARNT sugieren que sus niveles pueden ser determinantes en la función transcripcional de AhR. No se puede descartar, además, una regulación de Cyp1b1 por las citoquinas inflamatorias, elevadas en estas circunstancias.

Más allá de su función transcripcional, AhR puede ejercer otras funciones, como es la de E3 ubiquitina ligasa (Ohtake et al. 2007) o interaccionando con otras rutas de señalización (Moreno-Marín et al. 2018; Roman et al. 2017). El hecho de haber encontrado diferencias en la expresión de AhR, pero no en su papel transcripcional a lo largo de la edad, abre las puertas a futuros experimentos sobre las posibles funciones neuronales de AhR y el efecto que la edad puede tener sobre ellas.

5.2. Papel de AhR en el envejecimiento fisiológico

5.2.1. Efecto de la delección génica de AhR en la aparición de rasgos generales asociados al envejecimiento

Nuestro siguiente paso fue caracterizar el papel que AhR podría ejercer en el envejecimiento, para lo que recurrimos a experimentos de pérdida de función utilizando ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}.

DISCUSIÓN

Lo primero que hicimos fue establecer fue el perfil temporal de indicadores de envejecimiento que presentaban los ratones $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ a nivel general (prolapso rectal, hipertrofia cardíaca, fibrosis hepática, esplenomegalia, tumores macroscópicos y cifosis). A través de un estudio descriptivo detectamos que la aparición de los rasgos fenotípicos asociados al envejecimiento era más temprana en el genotipo $AhR^{-/-}$ que en el $AhR^{+/+}$. La incidencia de algunos de estos rasgos en los ratones $AhR^{-/-}$ fue más alta en los de 12 meses que en los de 16 meses. Esto probablemente se deba a un sesgo introducido a la hora de elegir que animales se sacrificaban a los 12 meses. Puesto que a lo largo del estudio hubo varios ratones que presentaban un aspecto altamente deteriorado, por razones éticas, decidimos sacrificarlos a los 12 meses.

Esta no es la primera vez que se pone de manifiesto la aparición temprana de rasgos característicos del envejecimiento en ratones carentes de AhR. En 1997, Fernández-Salguero y colaboradores (Fernandez-Salguero et al. 1997), publicaron un estudio fenotípico comparando ratones $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ de entre 6 y 12 meses. En dicho estudio, describieron cómo los ratones $AhR^{-/-}$ presentaban hipertrofia y fibrosis cardíaca, lesiones vasculares y tumores hepáticos, entre otros rasgos, en un porcentaje mucho mayor que los ratones $AhR^{+/+}$ de su misma edad. Estos datos confirman, por lo tanto, nuestros resultados sobre la manifestación prematura de un fenotipo envejecido en ausencia de AhR y apoyan la importancia de AhR en el proceso de envejecimiento.

La implicación de AhR en la aparición de características asociadas al envejecimiento se ha descrito en otros contextos. Se ha demostrado que los ratones $AhR^{-/-}$ presentan un agotamiento temprano de células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) por un incremento descontrolado de la proliferación de estas células que acaba provocando una extenuación prematura de las mismas (Singh et al. 2013; Bennett et al. 2015). En este trabajo se pone de relevancia el papel crítico de AhR en el control del balance proliferación/quiescencia y como la ausencia del receptor conduce, en último término, a un envejecimiento prematuro de las HSC. En un trabajo reciente de nuestro laboratorio sobre la implicación de AhR en la neurogénesis hipocampal, nosotros también hemos podido comprobar

que la delección génica de AhR produce un aumento en la proliferación de células madre neurales y un agotamiento temprano del reservorio de estas células que comienza a los 3 meses de edad (de la Parra et al. 2018).

Sin embargo, según un estudio sobre la implicación de AhR en el envejecimiento vascular, la ausencia de AhR podría ser beneficiosa para la función vascular a lo largo de la edad ya que los ratones AhR^{-/-} conservaban mejor con la edad la elasticidad vascular que sus controles AhR^{+/+} (Eckers et al. 2016). Estos datos sugieren que, aunque a nivel general, los ratones AhR^{-/-} presentan características fenotípicas de un envejecimiento acelerado, hay funciones, como la vascular, en las cuales la ausencia de AhR parece tener un efecto beneficioso durante el envejecimiento, aunque estos datos requieren estudios adicionales para ser confirmados.

5.2.2. Efecto de la delección génica de AhR en la aparición de rasgos asociados al envejecimiento cerebral

Como se comentó en la introducción, hay estructuras cerebrales que sufren cambios en su volumen con la edad (Scahill et al. 2003). A través de imágenes de resonancia magnética observamos que los ratones AhR^{-/-} presentan a los 16 meses una clara tendencia a un aumento en el volumen ventricular y una disminución significativa del volumen cortical en comparación con los ratones AhR^{+/+} de su misma edad.

Ya se ha descrito previamente que el volumen de los ventrículos incrementa a lo largo de la edad en ratones de fenotipo salvaje (Maheswaran et al. 2009). Además, en humanos, está ampliamente demostrado que el aumento en el volumen ventricular es una huella del envejecimiento del cerebro (Coffey et al. 1992b). Respecto a la corteza, se ha observado que el grosor de esta estructura tiende también a disminuir con la edad en humanos (Raz et al. 2005). Por otro lado, en los ratones SAMP10, que se han propuesto como modelo de envejecimiento cerebral prematuro, se ha visto que se produce asimismo una reducción acelerada del grosor cortical (Shimada and Hasegawa-Ishii 2011). De nuevo, la ausencia de AhR estaría ligada a una aceleración de los cambios inducidos por el envejecimiento a nivel cortical.

DISCUSIÓN

Otra estructura cuyo volumen disminuye en el envejecimiento fisiológico es el hipocampo (Jack et al. 2000). Sin embargo, a los 16 meses, nosotros no detectamos diferencias entre los ratones AhR^{+/+} y AhR^{-/-}. No obstante, en datos previos de nuestro laboratorio hemos comprobado que estas diferencias sí existen, aunque empiezan a una edad más temprana (De la Parra *et al.*, en prensa). Una posible explicación de nuestros resultados sería que, a la edad escogida para este estudio, la disminución del volumen del hipocampo en los ratones AhR^{+/+} haya compensado estas diferencias anteriores.

Además de los cambios volumétricos, los ratones AhR^{-/-} presentaron una fuerte tendencia a una reducción de la fracción anisotrópica en el cuerpo caloso, lo cual es indicativo de pérdida de la integridad de la sustancia blanca (Assaf and Pasternak 2008). Esta pérdida es uno de los rasgos más característicos del cerebro envejecido (Gunning-Dixon et al. 2009). Recientemente se ha publicado un estudio sobre la participación de AhR en el proceso de mielinización durante el desarrollo en el sistema nervioso periférico (Sampathkumar et al. 2018). Dicho estudio demostró que, durante el desarrollo, los ratones AhR^{-/-} presentan alteraciones en las proteínas que forman parte de la vaina de mielina, así como en varios reguladores del proceso de mielinización. Por otro lado, a nivel del SNC, también se ha demostrado que la ausencia de AhR produce alteraciones en la mielinización del nervio óptico, así como una disminución de varias proteínas que forman parte de la mielina (Juricek et al. 2017).

El conjunto de estos datos pone de manifiesto que los ratones AhR^{-/-} presentan una serie de cambios asociados al envejecimiento de manera temprana, similares, en muchos casos, a los observados en modelos animales de envejecimiento prematuro (Buffenstein, Edrey, and Larsen 2008) y apuntan, por lo tanto, a una implicación de AhR en el control de la homeostasis fisiológica asociada a la edad.

5.2.3. Papel de AhR en los déficits neurológicos asociados a la edad

Uno de los rasgos más característicos de la edad es la aparición de déficits neurológicos que acaban interfiriendo con la capacidad de realizar las actividades diarias. Para evaluar el papel de AhR en la aparición de estos déficits realizamos primero un perfil temporal tanto de la función motora como de la función cognitiva

en los ratones AhR^{+/+} y en los ratones AhR^{-/-} y, después, evaluamos el efecto que una dieta rica en xenobióticos agonistas de AhR podría tener en estas mismas funciones en los animales envejecidos de fenotipo salvaje.

5.2.3.1. Papel de AhR en los déficits motores asociados a la edad

A través del perfil temporal, observamos que los ratones AhR^{-/-} presentaban déficits motores, caracterizados por el uso de pasos más cortos en la marcha y una menor velocidad de nado, a una edad más temprana que los ratones AhR^{+/+}.

En un estudio de 2014 sobre la relación entre AhR y actividad motora se demostró que la actividad basal en *D. melanogaster* y *C. elegans* aumenta cuando hay una regulación a la baja de la expresión de AhR (Williams et al. 2014). Los autores también realizaron comparaciones entre ratones con distintos alelos para el gen AhR. Como se comentó en la introducción, en ratón se conocen hasta 5 alelos para el receptor que difieren en su capacidad de respuesta a los agonistas. Los autores postulan que los ratones con el alelo de AhR menos funcional muestran una mayor actividad exploratoria a los 5 meses de edad. Si bien estos resultados parecen ir en contra de lo que nosotros hemos observado, hay que tener en cuenta varios factores. El primero y más evidente es que el objetivo de análisis es distinto. Mientras que estos autores se centran en el análisis de la actividad exploratoria general, nosotros evaluamos funciones más concretas como es el patrón de marcha o la velocidad de nado. El segundo factor que hay que considerar es que las edades de los ratones son distintas. Por último, es importante destacar que los ratones que tienen un alelo menos funcional pueden no equivaler a los ratones que no expresan el receptor.

Como se ha comentado en el apartado anterior, nuestros datos sobre la pérdida de la integridad de la sustancia blanca indican que los ratones AhR^{-/-} son más susceptibles a ésta a lo largo de la edad. Es posible, por lo tanto, que estas alteraciones en la sustancia blanca causen, en último término, problemas motores. De hecho, en uno de los estudios anteriormente mencionados sobre la implicación de AhR en el proceso de mielinización, los autores observan que la ausencia de AhR

DISCUSIÓN

produce un empeoramiento de la función motora en los ratones (Sampathkumar et al. 2018).

5.2.3.2. Papel de AhR en los déficits cognitivos asociados a la edad

El tipo de memoria más afectado por la edad es la memoria de trabajo, tal y como pudimos comprobar al evaluar ratones de 2 y 24 meses de fenotipo salvaje. Nuestros datos indican que los ratones AhR^{-/-} desarrollan alteraciones en la memoria de trabajo a una edad más temprana que sus respectivos controles. Además, no detectamos ningún déficit en este tipo de memoria en los animales AhR^{-/-} jóvenes, por lo que la alteración de este tipo de función cognitiva en estos ratones parece únicamente asociada a la edad.

La implicación de AhR en la memoria se ha estudiado previamente en el contexto de la neurogénesis adulta hipocampal (McNab et al. 2015). Nuestro laboratorio ha demostrado que los ratones jóvenes AhR^{-/-} presentan una neurogénesis aberrante que da lugar a una actividad sináptica alterada asociada a alteraciones en memoria espacial a largo plazo (de la Parra et al. 2018). Este trabajo apoya la importancia de AhR en una función típicamente alterada en el envejecimiento, como es la cognitiva.

Aunque desconocemos todavía el mecanismo a través del cual la falta de AhR estaría potenciando los déficits cognitivos asociados a la edad, es muy probable que sea a nivel neuronal puesto que es el tipo celular del SNC en el que más se expresa el receptor, tanto en los ratones jóvenes como en los envejecidos. En este sentido, se ha demostrado que AhR está implicado en la modulación de los receptores NMDA (Kim and Yang 2005; Lin et al. 2008; Lin et al. 2009). La transmisión glutamatérgica, especialmente la mediada por estos receptores, es fundamental en los fenómenos de plasticidad sináptica, siendo además imprescindible en los procesos de potenciación, memoria y aprendizaje (Chen et al. 2011; Chen et al. 2012; Cuthbert et al. 2007). Por lo tanto, es posible que la modulación de las distintas subunidades de los receptores NMDA sea el mecanismo por el cual AhR esté implicado en los déficits cognitivos observados.

Estos datos son los primeros en mostrar la implicación de AhR en el empeoramiento de la función motora y cognitiva a lo largo de la edad. Para estudios futuros queda por determinar, de nuevo, por qué mecanismo AhR ejerce su papel en estas funciones.

5.2.4. Papel de AhR en el *inflammaging*

5.2.4.1. Papel de AhR en los niveles circulantes de citoquinas a lo largo de la edad

A pesar de que el papel de AhR en inflamación ha sido estudiado en varios contextos, hasta la fecha no existe ningún estudio que relacione al receptor con el fenómeno de *inflammaging*. El análisis de los niveles de citoquinas plasmáticas en animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} reveló que el aumento de estos mediadores a lo largo de la edad era mayor en los ratones que carecen del receptor. Es importante destacar que en los animales jóvenes no encontramos estas diferencias entre genotipos (datos no mostrados) y que, por lo tanto, este incremento está asociado a la edad.

El aumento de las concentraciones de citoquinas circulantes es uno de los rasgos más característicos del *inflammaging* (Michaud et al. 2013; Morley and Baumgartner 2004). Según nuestros datos y de acuerdo con lo previamente descrito, las citoquinas que más aumentan a lo largo de la edad son la IL-6 y el TNF- α , que se consideran verdaderos marcadores del envejecimiento y se han relacionado con distintos rasgos patológicos asociados a la edad (Michaud et al. 2013).

Existen varios trabajos sobre la conexión de AhR y los niveles de TNF- α e IL-6. Se ha descrito, por ejemplo, que la activación de AhR con TCDD disminuye los niveles séricos de estas citoquinas en la colitis asociada al cáncer de colon (Alzahrani et al. 2017). Además, los niveles en suero de estos mediadores proinflamatorios durante el desarrollo de malaria tras infección por *Plasmodium berghei* son más altos en los ratones AhR^{-/-} que en los AhR^{+/+} (Brant et al. 2014). Por otro lado, se ha demostrado que los macrófagos de ratones AhR^{-/-} secretan más TNF- α tras la activación por LPS (lipopolisacárido) que los macrófagos AhR^{+/+} (Kimura et al. 2009). Los mecanismos moleculares por los cuales AhR ejerce una regulación negativa de la respuesta inflamatoria no se conocen bien todavía. En este sentido, se ha

DISCUSIÓN

propuesto que la activación de AhR promueve la degradación de la subunidad RelA/p65 de NFκB, lo que resulta en una disminución de los niveles de varias citoquinas pro-inflamatoria, incluido el TNF-α, en macrófagos peritoneales de ratón (Domínguez-Acosta et al. 2018). Se requieren estudios adicionales para dilucidar si este es el mecanismo implicado en nuestro sistema.

Otra citoquina que ha sido ampliamente estudiada en relación con AhR es la IL-17. En el análisis de las citoquinas plasmáticas de animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} detectamos un mayor aumento de la IL-17 a lo largo de la edad en los ratones carentes del receptor que en los de fenotipo salvaje. La IL-17 se libera exclusivamente por las células Th17 (Ouyang, Kolls, and Zheng 2008) y está implicada en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes (Zhu and Qian 2012). Varios trabajos de los últimos años han mostrado el papel fundamental que juega AhR en el balance de células Treg/Th17, y que puede llegar a tener acciones opuestas en este sentido dependiendo del ligando que lo active (Baricza et al. 2016). En la encefalitis autoinmune experimental, se ha demostrado que mientras que el FICZ, agonista endógeno del receptor, interfiere en la diferenciación de las Treg y potencia las Th17 y el desarrollo de la enfermedad, el TCDD, agonista exógeno, aumenta la población Treg y frena la EAE (Quintana et al. 2008). La mejoría de la autoinmunidad con TCDD también se ha descrito en la colitis experimental (Singh et al. 2011).

Por otro lado, las citoquinas IL-4 e IL-10 tienden a ejercer un efecto anti-inflamatorio. La bibliografía sobre su conexión con AhR es mucho más reducida y los pocos datos que hay publicados al respecto sugieren que la activación de AhR induce la liberación de estos mediadores (Wagage et al. 2014). Por lo tanto, es posible, que los mayores niveles detectados en los animales AhR^{-/-} de IL-4 e IL-10 sean fruto de un mecanismo compensatorio por la elevación de los niveles de citoquinas proinflamatorias más que de la delección de AhR.

En definitiva, el conjunto de los datos descritos en la presente Tesis Doctoral apoya la idea de que la señalización de AhR es esencial en el control de los niveles de citoquinas durante el *inflammaging*.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, los ratones AhR^{-/-} presentan unos elevados niveles circulantes de citoquinas a partir de los 12 meses de edad. Se ha descrito que niveles altos de citoquinas pueden tener un efecto fibrogénico estimulando la proliferación de fibroblastos y de células endoteliales (Kovacs and DiPietro 1994), y se ha demostrado que la inflamación puede contribuir al desarrollo de fibrosis hepática (Friedman 2003). También existen evidencias sobre la implicación de la IL-6, el TNF- α y el IFN- γ en el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Samak et al. 2016). En este sentido, es posible que la aparición temprana de algunos de los rasgos descritos en los animales AhR^{-/-} sea una consecuencia secundaria a la elevación de las citoquinas periféricas.

5.2.4.2. Papel de AhR en la neuroinflamación asociada a la edad

Una de las consecuencias de la inflamación sistémica es la influencia que ésta puede ejercer en el estado inflamatorio del cerebro. En los órganos cirunventriculares del cerebro (regiones del SNC sin BHE), las citoquinas pueden difundir libremente desde la sangre al parénquima cerebral y viceversa. Además, las citoquinas circulantes son capaces de activar las células endoteliales de la BHE que, a su vez, mandarían señales a las células residentes del SNC, especialmente a las células microgliales y los astrocitos (Perry 2004). Por esta razón, tras la detección del aumento de citoquinas plasmáticas en los animales AhR^{-/-} envejecidos quisimos evaluar el posible estado neuroinflamatorio de estos animales. En primer lugar, determinamos las concentraciones de estos mismos mediadores en cerebro.

Existen múltiples evidencias de que, con la edad, se produce una elevación de citoquinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias en el cerebro (Bodles and Barger 2004). Nuestros datos corroboran lo anteriormente descrito puesto que en la mayoría de citoquinas evaluadas observamos un aumento de los niveles con la edad. Sin embargo, sólo detectamos diferencias significativas entre genotipos en IL-10 y en IFN- γ . Este último resultado nos llamó la atención puesto que el IFN- γ fue la única citoquina que no estaba elevada en el plasma de los ratones AhR^{-/-}. Esto sugiere que el aumento de esta citoquina en cerebro en ratones carentes de AhR se produce a nivel local y no por su difusión desde la sangre. Hay evidencias de que tanto la microglía como los astrocitos son capaces de secretar esta molécula en

DISCUSIÓN

distintos contextos (Suzuki et al. 2005; Lau and Yu 2001; Chung and Benveniste 1990).

Hasta la fecha, el papel de AhR en la neuroinflamación en ausencia de un daño agudo sólo se ha estudiado en el nervio óptico (Juricek et al. 2017). Los autores de este trabajo demuestran que en los ratones AhR^{-/-} se produce un aumento de los niveles de TNF- α junto a una desmielinización del nervio óptico. A pesar de que nosotros no encontramos un efecto del genotipo en las concentraciones cerebrales de TNF- α , sí detectamos cierta tendencia a un aumento de sus niveles en los ratones AhR^{-/-} respecto a los animales AhR^{+/+} de su misma edad. En este sentido, es importante poner de relieve el hecho de que, en todas las citoquinas evaluadas, las concentraciones de las muestras rozaban el límite inferior de sensibilidad, e incluso algunas de ellas se encontraban por debajo.

La técnica del CBA ha sido previamente utilizada en nuestro grupo (Fernández et al. 2018; Zarruk et al. 2012) en el análisis de mediadores inflamatorios tras un modelo experimental de ictus isquémico. Sin embargo, hasta ahora no la habíamos usado en el análisis de citoquinas en cerebro en ausencia de un daño agudo. Es posible la técnica utilizada no sea la más sensible en nuestro contexto y que el uso de otros métodos, como la PCR cuantitativa o el western blot, pudieran revelar unas diferencias que mediante el CBA se pudieran estar perdiendo por la limitación de la técnica para medir concentraciones bajas.

Esta es la razón que nos condujo a usar otra aproximación para determinar el estado inflamatorio en el cerebro de los ratones AhR^{-/-} envejecidos. En este sentido, en condiciones de neuroinflamación tanto los astrocitos como la microglía sufren una polarización hacia un estado más reactivo que se conoce como reactividad glial (Burda and Sofroniew 2014).

En los ratones AhR^{-/-} observamos una mayor reactividad astrogliar que en los ratones AhR^{+/+}. Sin embargo, a nivel de la microglía no detectamos diferencias entre ambos genotipos. Recientemente, se ha publicado un artículo en el que se describe que en el nervio óptico de los ratones AhR^{-/-} se produce un incremento en la expresión astrocitaria de GFAP sin cambios en las células microgliales (Juricek et al.

2017). Por lo tanto, estos datos indican que la ausencia de AhR produce con la edad un incremento de la neuroinflamación induciendo en los astrocitos un fenotipo reactivo, pero sin afección de la microglía.

En definitiva, AhR parece jugar un papel crucial en el control del proceso de inflamación crónica asociado al envejecimiento. Serían necesarios más estudios para determinar los mecanismos de señalización por los que AhR ejerce esta función.

5.2.5. Efecto de la activación crónica de AhR en el envejecimiento

Una vez caracterizado el envejecimiento en ausencia de AhR, quisimos establecer los posibles efectos de una activación crónica de AhR mediante una dieta rica en xenobióticos, en donde todos los compuestos utilizados presentan actividad agonista para AhR.

La activación crónica de AhR a través de la dieta en los animales envejecidos no produjo ningún efecto a nivel cognitivo ni motor a los tiempos estudiados. La falta de efecto de esta dieta nos llamó la atención puesto que a lo largo de los últimos 20 años se han publicado una gran cantidad de trabajos sobre el efecto deletéreo de la exposición a xenobióticos ligandos de AhR en etapas prenatales y postnatales tempranas sobre la función cognitiva (Peterson et al. 2015; Perera et al. 2006; Schantz et al. 1996; Edwards et al. 2010; Latchney et al. 2013). Una posibilidad es que la señalización de AhR esté ya saturada debido al incremento que hemos demostrado en los niveles plasmáticos de agonistas en los animales envejecidos. Sería interesante, por lo tanto, realizar estos experimentos en animales más jóvenes que los utilizados para ver cómo afecta esta dieta a su envejecimiento.

5.2.6. Papel de AhR en el envejecimiento fisiológico: perspectivas futuras

El conjunto de los datos obtenidos respecto al segundo objetivo de esta Tesis Doctoral demuestra que la ausencia de AhR produce una serie de características fenotípicas características de un envejecimiento prematuro.

El envejecimiento es un proceso complejo y multifactorial. El hecho de que AhR intervenga en uno de esos factores puede favorecer la aparición de rasgos asociados al envejecimiento, pero no podemos descartar que pudieran ser

DISCUSIÓN

directamente dependientes de AhR. Por tanto, como limitación de nuestro trabajo, hemos de tener en cuenta que la utilización de *knock-out* completos para el receptor hace necesario continuar los estudios para determinar hasta qué punto las alteraciones observadas son una consecuencia directa de la falta de señalización por AhR a lo largo de la vida o pudieran ser resultado de un desarrollo anormal en este tipo de transgénico. En este sentido, el uso de *knock-out* inducibles o de herramientas farmacológicas puede ser de gran ayuda.

En cualquier caso, nuestros datos apoyan un papel del receptor en procesos que ocurren, directa o indirectamente, durante el envejecimiento y abre nuevas preguntas acerca de los mecanismos a través de los cuales AhR pueda estar influyendo en diferentes fenómenos asociados a la edad como el proceso de *inflammaging*, la pérdida de integridad de la sustancia blanca o los déficits cognitivos.

5.3. Efecto de la activación crónica de AhR en el desarrollo de placas amiloides y déficits cognitivos en ratones APP^{NL-F}

Los resultados presentados en esta Tesis doctoral ponen de manifiesto, por primera vez, que la administración de una dieta enriquecida en xenobióticos, considerados contaminantes ambientales, acelera el desarrollo de placas amiloides. Puesto que, farmacológicamente, estos compuestos se caracterizan por ser agonistas de AhR, nuestros datos sugieren que este efecto se debe a la activación crónica de este receptor. Además, los ratones alimentados con xenobióticos en la dieta presentan una alteración en la memoria de trabajo que no aparece en sus controles.

A pesar de que los efectos perjudiciales de la exposición a contaminantes ambientales en la aparición de depósitos de amiloide han sido previamente estudiados (Calderón-Garcidueñas et al. 2008; Cacciottolo et al. 2017; Calderón-Garcidueñas et al. 2012), nuestro trabajo aporta dos factores de enorme importancia al respecto. El primero de ellos es que, hasta ahora, todos los estudios realizados en este ámbito habían centrado su atención en la contaminación proveniente del aire. Nuestro estudio es pionero en la investigación de los efectos

de los xenobióticos en la aparición de placas amiloides a través de la dieta que, como ya se ha mencionado, es la principal fuente de exposición a xenobióticos en humanos.

El segundo factor relevante es la posible implicación de AhR en el proceso, puesto que los compuestos utilizados en la dieta son ligandos específicos de AhR. En este sentido, un hallazgo interesante es la correlación positiva entre el número de placas y los niveles de expresión de Cyp1B1 en hígado. Por resultados anteriores sabemos que el ARNm de este gen en el hígado se correlaciona de forma positiva con los ligandos de AhR en plasma. En base a esto, es bastante probable que exista una relación directa entre el número de placas y los niveles de ligando circulantes de AhR.

A nivel mecanístico, es interesante recordar la función E3 ubiquitina ligasa que puede tener AhR. Cada vez hay más evidencias que apoyan la importancia del sistema ubiquitina-proteosoma en el metabolismo de APP y en la acumulación de placas amiloides (revisado en (Wang and Saunders 2014)). En la proteína APP, existen varios sitios de ubiquitinación (Morel et al. 2013; Watanabe et al. 2013; El Ayadi et al. 2012). Esta ubiquitinación es determinante tanto para el tráfico intracelular de la proteína como para la degradación de la misma, pudiendo influir en la acumulación de los depósitos de β -amiloide (Williamson et al. 2017). Actualmente, se desconoce el complejo E3 ubiquitina ligasa responsable de reconocer y ubiquitinar APP, pero las investigaciones en el campo son cada vez más numerosas puesto que se perfila como una posible diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer (Wang and Saunders 2014). Hasta ahora se han propuesto 4 cuatro candidatos para la función: *F-box and leucine rich repeat protein 2* (FBL2) (Watanabe et al. 2013), HRD1 (Kaneko et al. 2010), *C-terminus heat shock protein 70 interacting protein* (CHIP) (Kumar et al. 2007) y la E3 ligasa mahogunin (MGRN1) (Benvegnù, Wahle, and Dotti 2017). Estos 4 trabajos no son excluyentes puesto que una misma proteína puede ser sustrato de más de una E3 ubiquitina ligasa (Iconomou and Saunders 2016).

Por lo tanto, nuestros datos sugieren la interesante posibilidad de que AhR intervenga también en la ubiquitinización de APP y de que los ligandos

DISCUSIÓN

provenientes de la dieta estén causando un desequilibrio entre su función como factor de transcripción y su función como E3 ligasa. En cualquier caso, esta hipótesis debe ser comprobada en futuros estudios.



6. Conclusiones

Conclusiones

1. La edad produce cambios regionales en los niveles de expresión de AhR en el cerebro de ratón. Específicamente, los niveles disminuyen en corteza y en hipocampo, lo que no se refleja en su actividad transcripcional determinada por los niveles de los genes diana Cyp1A1 y Cyp1B1 tanto en condiciones basales como tras activación aguda del receptor.
2. La localización celular de AhR en cerebro es principalmente neuronal, tanto en ratones jóvenes como en ratones envejecidos.
3. La edad produce un aumento en la expresión y en la actividad transcripcional de AhR en el hígado de ratón, así como un aumento de la actividad agonista AhR del plasma de estos animales.
4. La delección génica de AhR promueve la aparición temprana de características generales asociadas al envejecimiento en el ratón, tanto a nivel cerebral como periférico.
5. La delección génica de AhR en el ratón produce una aceleración de los déficits motores y cognitivos asociados a la edad.
6. La delección génica de AhR produce asimismo una aceleración del fenómeno de *inflammaging*, tanto a nivel central como periférico, así como un aumento de la reactividad astrogliol en el cerebro de ratones envejecidos.
7. La administración de una dieta rica en xenobióticos acelera la aparición de placas de β -amiloide en el cerebro de ratón, así como de déficits en la memoria de trabajo en ratones APP^{NL-F}, posiblemente asociada a la actividad de dichos compuestos como agonistas AhR.

CONCLUSIONES

8. Nuestros datos sugieren que AhR participa en el envejecimiento fisiológico por su papel en el control de la inflamación y por su función detoxificadora. Los cambios en su señalización pueden acelerar la aparición de rasgos asociados al envejecimiento y contribuir a su conversión patológica.



7. Bibliografía

- Abbott, B. D., L. S. Birnbaum, and R. M. Pratt. 1987. 'TCDD-Induced hyperplasia of the ureteral epithelium produces hydronephrosis in murine fetuses', *Teratology*, 35: 329-34.
- Abbott, BD, LS Birnbaum, and GH Perdew. 1995. 'Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo', *Developmental Dynamics*, 204: 133-43.
- Abdel-Shafy, Hussein I, and Mona SM Mansour. 2016. 'A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation', *Egyptian Journal of Petroleum*, 25: 107-23.
- Agarwal, Sanjiv, and RS Sohal. 1994. 'Aging and protein oxidative damage', *Mechanisms of ageing and development*, 75: 11-19.
- Albert, Marilyn, Frank H Duffy, and Margaret Naeser. 1987. 'Nonlinear changes in cognition with age and their neurophysiologic correlates', *Canadian Journal of Experimental Psychology*, 41: 141.
- Alley, Dawn E, Eileen Crimmins, Karen Bandeen-Roche, Jack Guralnik, and Luigi Ferrucci. 2007. 'Three-Year Change in Inflammatory Markers in Elderly People and Mortality: The Invecchiare in Chianti Study', *Journal of the American Geriatrics Society*, 55: 1801-07.
- Alonso, Alejandra del C, Ben Li, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2008. 'Mechanism of tau-induced neurodegeneration in Alzheimer disease and related tauopathies', *Current Alzheimer Research*, 5: 375-84.
- Alzahrani, Abdullah M, Hamza Hanieh, Hairul-islam Mohamed Ibrahim, Omar Mohafez, Tamer Shehata, Mohammad Bani Ismail, and Manal Alfwuaires. 2017. 'Enhancing miR-132 expression by aryl hydrocarbon receptor attenuates tumorigenesis associated with chronic colitis', *International immunopharmacology*, 52: 342-51.
- Amenta, Francesco, Elena Bronzetti, Maurizio Sabbatini, and Jose Antonio Vega. 1998. 'Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: a quantitative immunohistochemical study', *Microscopy research and technique*, 43: 29-33.
- Antunes, M, and Grazyna Biala. 2012. 'The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications', *Cognitive processing*, 13: 93-110.
- Artandi, Steven E, and Laura D Attardi. 2005. 'Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer', *Biochemical and biophysical research communications*, 331: 881-90.
- Ashida, Hitoshi, Itsuko Fukuda, Takatoshi Yamashita, and Kazuki Kanazawa. 2000. 'Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin', *FEBS letters*, 476: 213-17.
- Assaf, Yaniv, and Ofer Pasternak. 2008. 'Diffusion tensor imaging (DTI)-based white matter mapping in brain research: a review', *Journal of Molecular Neuroscience*, 34: 51-61.
- Atkinson, Richard C, and Richard M Shiffrin. 1968. 'Human memory: A proposed system and its control processes1.' in *Psychology of learning and motivation* (Elsevier).
- Baba, Takashi, Junsei Mimura, Katarina Gradin, Asato Kuroiwa, Takafumi Watanabe, Yoichi Matsuda, Johji Inazawa, Kazuhiro Sogawa, and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. 2001. 'Structure and expression of the Ah receptor repressor gene', *Journal of Biological Chemistry*, 276: 33101-10.
- Bach, Mary Elizabeth, Mark Barad, Hyeon Son, Min Zhuo, Yun-Fei Lu, Robert Shih, Isabelle Mansuy, Robert D Hawkins, and Eric R Kandel. 1999. 'Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 5280-85.
- Baddeley, Alan. 1992. 'Working memory', *Science*, 255: 556-59.
- Baker III, George T, and Richard L Sprott. 1988. 'Biomarkers of aging', *Experimental gerontology*, 23: 223-39.

- Bales, Kelly R, Tatyana Verina, David J Cummins, Yansheng Du, Richard C Dodel, Josep Saura, Cindy E Fishman, Cynthia A DeLong, Pedro Piccardo, and Valerie Petegnief. 1999. 'Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APPV717F transgenic mouse model of Alzheimer's disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 15233-38.
- Ballatore, Carlo, Virginia M-Y Lee, and John Q Trojanowski. 2007. 'Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders', *Nature Reviews Neuroscience*, 8: 663.
- Baricza, Eszter, Viola Tamási, Nikolett Marton, Edit I Buzás, and György Nagy. 2016. 'The emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the activation and differentiation of Th17 cells', *Cellular and molecular life sciences*, 73: 95-117.
- Barnes, CA. 2003. 'Long-term potentiation and the ageing brain', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 358: 765-72.
- Barnhoorn, Sander, Lieneke M Uittenboogaard, Dick Jaarsma, Wilbert P Vermeij, Maria Tresini, Michael Weymaere, Hervé Menoni, Renata MC Brandt, Monique C de Waard, and Sander M Botter. 2014. 'Cell-autonomous progeroid changes in conditional mouse models for repair endonuclease XPG deficiency', *PLoS genetics*, 10: e1004686.
- Barouki, R., X. Coumoul, and P. M. Fernandez-Salguero. 2007. 'The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein', *FEBS Lett*, 581: 3608-15.
- Bateman, Randall J, Ling Y Munsell, John C Morris, Robert Swarm, Kevin E Yarasheski, and David M Holtzman. 2006. 'Quantifying CNS protein production and clearance rates in humans using in vivo stable isotope labeling, immunoprecipitation, and tandem mass spectrometry', *Nature medicine*, 12: 856.
- Beischlag, T. V., J. Luis Morales, B. D. Hollingshead, and G. H. Perdew. 2008. 'The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression', *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 18: 207-50.
- Bennett, John A, Kameshwar P Singh, Zeenath Unnisa, Stephen L Welle, and Thomas A Gasiewicz. 2015. 'Deficiency in aryl hydrocarbon receptor (AHR) expression throughout aging alters gene expression profiles in murine long-term hematopoietic stem cells', *PLoS One*, 10: e0133791.
- Benson, Jenna M, and David M Shepherd. 2010. 'Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease', *Toxicological sciences*, 120: 68-78.
- Benvegnù, Stefano, Tina Wahle, and Carlos G Dotti. 2017. 'E3 ligase mahogunin (MGRN1) influences amyloid precursor protein maturation and secretion', *Oncotarget*, 8: 89439.
- Bernal, Giovanna M, Joshua S Wahlstrom, Clayton D Crawley, Kirk E Cahill, Peter Pytel, Hua Liang, Shijun Kang, Ralph R Weichselbaum, and Bakhtiar Yamini. 2014. 'Loss of Nfkb1 leads to early onset aging', *Aging (Albany NY)*, 6: 931.
- Bernard, Alfred, Fabrice Broecker, Geert De Poorter, Ann De Cock, Cédric Hermans, Claude Saegerman, and Gilbert Houins. 2002. 'The Belgian PCB/dioxin incident: analysis of the food chain contamination and health risk evaluation', *Environmental Research*, 88: 1-18.
- Bertram, Lars, Christina M. Lill, and Rudolph E. Tanzi. 'The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future', *Neuron*, 68: 270-81.
- Bjeldanes, Leonard F, Jin-Young Kim, Karl R Grose, James C Bartholomew, and Christopher A Bradfield. 1991. 'Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 9543-47.
- Blackburn, Elizabeth H, Carol W Greider, and Jack W Szostak. 2006. 'Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging', *Nature medicine*, 12: 1133.

- Blaylock, Benny L, Steven D Holladay, Christine E Comment, Jerold J Heindel, and Michael I Luster. 1992. 'Exposure to tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters fetal thymocyte maturation', *Toxicology and applied pharmacology*, 112: 207-13.
- Bliwise, Donald L. 1993. 'Sleep in normal aging and dementia', *Sleep: Journal of Sleep Research & Sleep Medicine*.
- Bodles, Angela M, and Steven W Barger. 2004. 'Cytokines and the aging brain—what we don't know might help us', *Trends in neurosciences*, 27: 621-26.
- Bowen, DAVID M, CAROLYN B Smith, PAMELA White, and ALAN N Davison. 1976. 'Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies', *Brain: a journal of neurology*, 99: 459-96.
- Bradford, M. M. 1976. 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72: 248-54.
- Brant, Fatima, Aline S Miranda, Lisia Esper, David Henrique Rodrigues, Lucas Miranda Kangussu, Daniella Bonaventura, Frederico Marianetti Soriani, Vanessa Pinho, Danielle G Souza, and Milene Alvarenga Rachid. 2014. 'Role of the aryl hydrocarbon receptor in the immune response profile and development of pathology during Plasmodium berghei Anka infection', *Infection and immunity*, 82: 3127-40.
- Bravo-Ferrer, I., M. I. Cuartero, J. G. Zarruk, J. M. Pradillo, O. Hurtado, V. G. Romera, J. Diaz-Alonso, J. M. Garcia-Segura, M. Guzman, I. Lizasoain, I. Galve-Roperh, and M. A. Moro. 2017. 'Cannabinoid Type-2 Receptor Drives Neurogenesis and Improves Functional Outcome After Stroke', *Stroke*, 48: 204-12.
- Brody, H. 1992. 'The aging brain', *Acta Neurologica Scandinavica*, 85: 40-44.
- Brunk, Ulf T, and Alexei Terman. 2002. 'Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function¹²', *Free radical biology and medicine*, 33: 611-19.
- Buckles, Virginia Diggles. 1993. 'Age-related slowing.' in, *Sensorimotor impairment in the elderly* (Springer).
- Buffenstein, Rochelle, Yael H Edrey, and Pamela L Larsen. 2008. 'Animal Models in Aging Research.' in, *Sourcebook of Models for Biomedical Research* (Springer).
- Buford, Thomas W. 2017. '(Dis) Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease', *Microbiome*, 5: 80.
- Burda, Joshua E, and Michael V Sofroniew. 2014. 'Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease', *Neuron*, 81: 229-48.
- Burke, Sara N, and Carol A Barnes. 2006. 'Neural plasticity in the ageing brain', *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 30.
- Busbee, Philip B, Michael Rouse, Mitzi Nagarkatti, and Prakash S Nagarkatti. 2013. 'Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders', *Nutrition reviews*, 71: 353-69.
- Butler, Rondi A, Melissa L Kelley, Wade H Powell, Mark E Hahn, and Rebecca J Van Beneden. 2001. 'An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and β -naphthoflavone binding', *Gene*, 278: 223-34.
- Buttgereit, Anne, Iva Lelios, Xueyang Yu, Melissa Vrohings, Natalie R Krakoski, Emmanuel L Gautier, Ryuichi Nishinakamura, Burkhard Becher, and Melanie Greter. 2016. 'Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function', *Nature immunology*, 17: 1397.
- Cacciottolo, Mafalda, Xinhui Wang, Ira Driscoll, Nicholas Woodward, Arian Saffari, Jeanette Reyes, Mark L Serre, William Vizuete, Constantinos Sioutas, and Todd E Morgan. 2017. 'Particulate air pollutants, APOE alleles and their contributions to cognitive impairment in older women and to amyloidogenesis in experimental models', *Translational psychiatry*, 7: e1022.

- Calderón-Garcidueñas, Lilian, Michael Kavanaugh, Michelle Block, Amedeo D'Angiulli, Ricardo Delgado-Chávez, Ricardo Torres-Jardón, Angelica González-Maciel, Rafael Reynoso-Robles, Norma Osnaya, and Rodolfo Villarreal-Calderon. 2012. 'Neuroinflammation, hyperphosphorylated tau, diffuse amyloid plaques, and down-regulation of the cellular prion protein in air pollution exposed children and young adults', *Journal of Alzheimer's Disease*, 28: 93-107.
- Calderón-Garcidueñas, Lilian, Antonieta Mora-Tiscareño, Esperanza Ontiveros, Gilberto Gómez-Garza, Gerardo Barragán-Mejía, James Broadway, Susan Chapman, Gildardo Valencia-Salazar, Valerie Jewells, and Robert R Maronpot. 2008. 'Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs', *Brain and cognition*, 68: 117-27.
- Campbell, Brian M, Erik Charych, Anna W Lee, and Thomas Möller. 2014. 'Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines', *Frontiers in neuroscience*, 8: 12.
- Campbell, Sandra J, Colin J Henderson, Daniel C Anthony, Duncan Davidson, A John Clark, and C Roland Wolf. 2005. 'The murine Cyp1a1 gene is expressed in a restricted spatial and temporal pattern during embryonic development', *Journal of Biological Chemistry*, 280: 5828-35.
- Campestrato, Luis Felipe, Sadna Budhu, Jeremy Tchaicha, Stephane Pourpe, Cailian Liu, Mark G Manfredi, Karen McGovern, Jedd D Wolchok, and Taha Merghoub. 2018. "Interaction between Kynurenine and the AhR is an effector mechanism of tumor immunosuppression and represents a potential immunotherapy target." In.: *Am Assoc Immunol*.
- Campisi, Judith, and Fabrizio d'Adda di Fagagna. 2007. 'Cellular senescence: when bad things happen to good cells', *Nature reviews Molecular cell biology*, 8: 729.
- Canivenc-Lavier, Marie-Chantal, Marie-France Vernevaux, Muriel Totis, Marie-Hélène Siess, Jacques Magdalou, and Marc Suschetet. 1996. 'Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver', *Toxicology*, 114: 19-27.
- Carter, R. J., L. A. Lione, T. Humby, L. Mangiarini, A. Mahal, G. P. Bates, S. B. Dunnett, and A. J. Morton. 1999a. 'Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation', *J Neurosci*, 19: 3248-57.
- Carter, Rebecca J, Lisa A Lione, Trevor Humby, Laura Mangiarini, Amarbirpal Mahal, Gillian P Bates, Stephen B Dunnett, and A Jennifer Morton. 1999b. 'Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation', *Journal of Neuroscience*, 19: 3248-57.
- Carver, Lucy A., and Christopher A. Bradfield. 1997. 'Ligand-dependent Interaction of the Aryl Hydrocarbon Receptor with a Novel Immunophilin Homolog in Vivo', *Journal of Biological Chemistry*, 272: 11452-56.
- Cerbai, Francesca, Daniele Lana, Daniele Nosi, Polina Petkova-Kirova, Sandra Zecchi, Holly M Brothers, Gary L Wenk, and Maria Grazia Giovannini. 2012. 'The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus', *PLoS One*, 7: e45250.
- Champion, S, C Sauzet, P Bremond, Karim Benbrahim, J Abraldes, E Seree, Y Barra, and PH Villard. 2013. 'Activation of the NFκB Pathway Enhances AhR Expression in Intestinal Caco-2 Cells', *ISRN toxicology*, 2013.
- Chang, C., D. R. Smith, V. S. Prasad, C. L. Sidman, D. W. Nebert, and A. Puga. 1993. 'Ten nucleotide differences, five of which cause amino acid changes, are associated with the Ah receptor locus polymorphism of C57BL/6 and DBA/2 mice', *Pharmacogenetics*, 3: 312-21.
- Chen, Bo-Shiun, John A Gray, Antonio Sanz-Clemente, Zhe Wei, Eleanor V Thomas, Roger A Nicoll, and Katherine W Roche. 2012. 'SAP102 mediates synaptic clearance of NMDA receptors', *Cell reports*, 2: 1120-28.

- Chen, Bo-Shiun, Eleanor V Thomas, Antonio Sanz-Clemente, and Katherine W Roche. 2011. 'NMDA receptor-dependent regulation of dendritic spine morphology by SAP102 splice variants', *Journal of Neuroscience*, 31: 89-96.
- Chen, Hong, Jeffrey C Kwong, Ray Copes, Karen Tu, Paul J Villeneuve, Aaron Van Donkelaar, Perry Hystad, Randall V Martin, Brian J Murray, and Barry Jessiman. 2017. 'Living near major roads and the incidence of dementia, Parkinson's disease, and multiple sclerosis: a population-based cohort study', *The Lancet*, 389: 718-26.
- Chen, Wei-Wei, Xia Zhang, and Wen-Juan Huang. 2016. 'Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases', *Molecular medicine reports*, 13: 3391-96.
- Chen, Yiquan, Roger Stankovic, Karen M Cullen, Vincent Meininger, Brett Garner, Sarah Coggan, Ross Grant, Bruce J Brew, and Gilles J Guillemin. 2010. 'The kynurenine pathway and inflammation in amyotrophic lateral sclerosis', *Neurotoxicity research*, 18: 132-42.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. 'Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction', *Anal Biochem*, 162: 156-9.
- Chung, I Yup, and EN Benveniste. 1990. 'Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta', *The Journal of Immunology*, 144: 2999-3007.
- Ciolino, Henry P, Phillip J Daschner, Thomas TY Wang, and Grace Chao Yeh. 1998. 'Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells', *Biochemical pharmacology*, 56: 197-206.
- Ciolino, Henry P, Thomas TY Wang, and Grace Chao Yeh. 1998. 'Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity', *Cancer Research*, 58: 2754-60.
- Climaco-Arvizu, Samantha, Omar Domínguez-Acosta, María Asunción Cabañas-Cortés, Miriam Rodríguez-Sosa, Frank J Gonzalez, Libia Vega, and Guillermo Elizondo. 2016. 'Aryl hydrocarbon receptor influences nitric oxide and arginine production and alters M1/M2 macrophage polarization', *Life sciences*, 155: 76-84.
- Coffey, C. E., W. E. Wilkinson, LA. Parashos, S.A.R. Soady, R. J. Sullivan, L. J. Patterson, G. S. Figiel, M. C. Webb, C. E. Spritzer, and W. T. Djang. 1992a. 'Quantitative cerebral anatomy of the aging human brain', *A cross-sectional study using magnetic resonance imaging*, 42: 527-27.
- Coffey, CE, WE Wilkinson, LA Parashos, SAR Soady, RJ Sullivan, LJ Patterson, GS Figiel, MC Webb, CE Spritzer, and WT Djang. 1992b. 'Quantitative cerebral anatomy of the aging human brain A cross-sectional study using magnetic resonance imaging', *Neurology*, 42: 527-27.
- Coleman, Paul D, and Dorothy G Flood. 1987. 'Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease', *Neurobiology of aging*, 8: 521-45.
- Collado, Manuel, Maria A Blasco, and Manuel Serrano. 2007. 'Cellular senescence in cancer and aging', *Cell*, 130: 223-33.
- Conde, Jessica R., and Wolfgang J. Streit. 2006. 'Microglia in the Aging Brain', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65: 199-203.
- Conney, A. H. 1982. 'Induction of Microsomal-Enzymes by Foreign Chemicals and Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons - Clowes, G.H.A. Memorial Lecture', *Cancer Research*, 42: 4875-917.
- Contreras-Vidal, José L, HansL Teulings, and GeorgeE Stelmach. 1998. 'Elderly subjects are impaired in spatial coordination in fine motor control', *Acta psychologica*, 100: 25-35.
- Corder, Elizabeth H, Ann M Saunders, Waren J Strittmatter, Donald E Schmechel, P Craig Gaskell, GWet Small, Allen D Roses, JL Haines, and Margaret A Pericak-Vance. 1993. 'Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families', *Science*, 261: 921-23.

- Craik, Fergus IM, Morris Moscovitch, and Joan M McDowd. 1994. 'Contributions of surface and conceptual information to performance on implicit and explicit memory tasks', *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition*, 20: 864.
- Crews, S. T., J. B. Thomas, and C. S. Goodman. 1988. 'The Drosophila single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product', *Cell*, 52: 143-51.
- Crews, Stephen T. 1998. 'Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins', *Genes & development*, 12: 607-20.
- Cuartero, María I, Iván Ballesteros, Juan de la Parra, Andrew L Harkin, Aine Abautret-Daly, Eoin Sherwin, Pedro Fernández-Salguero, Ángel L Corbí, Ignacio Lizasoain, and María A Moro. 2014. 'An I-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke', *Circulation: CIRCULATIONAHA*. 114.011394.
- Cummings, Jeffrey L. 2004. 'Alzheimer's Disease', *New England Journal of Medicine*, 351: 56-67.
- Curcio, CA, and JW Hinds. 1983. 'Stability of synaptic density and spine volume in dentate gyrus of aged rats', *Neurobiology of aging*, 4: 77-87.
- Curfs, Daniëlle MJ, Ad M Knaapen, Daniëlle MFA Pachen, Marion JJ Gijbels, Esther Lutgens, Marjan LF Smook, Mark M Kockx, Mat JAP Daemen, and Frederik J van Schooten. 2005. 'Polycyclic aromatic hydrocarbons induce an inflammatory atherosclerotic plaque phenotype irrespective of their DNA binding properties', *The FASEB journal*, 19: 1290-92.
- Cuthbert, Peter C, Lianne E Stanford, Marcelo P Coba, James A Ainge, Ann E Fink, Patricio Opazo, Jary Y Delgado, Noboru H Komiyama, Thomas J O'Dell, and Seth GN Grant. 2007. 'Synapse-associated protein 102/dlg3 couples the NMDA receptor to specific plasticity pathways and learning strategies', *Journal of Neuroscience*, 27: 2673-82.
- Davarinos, Nikos A, and Richard S Pollenz. 1999. 'Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export', *Journal of Biological Chemistry*, 274: 28708-15.
- Davies, Kelvin J. 1987. 'Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects', *Journal of Biological Chemistry*, 262: 9895-901.
- Davis, Ian, and Aimin Liu. 2015. 'What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapy?', *Expert review of neurotherapeutics*, 15: 719-21.
- De Brabander, JM, RJK Kramers, and HBM Uylings. 1998. 'Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex', *European Journal of Neuroscience*, 10: 1261-69.
- de la Parra, Juan, María I Cuartero, Alberto Pérez-Ruiz, Alicia García-Culebras, Ricardo Martín, José Sánchez-Prieto, Juan M García-Segura, Ignacio Lizasoain, and María A Moro. 2018. 'AhR Deletion Promotes Aberrant Morphogenesis and Synaptic Activity of Adult-Generated Granule Neurons and Impairs Hippocampus-Dependent Memory', *eNeuro: ENEURO*. 0370-17.2018.
- De Luigi, Ada, Claudia Fragiaco, Ugo Lucca, Pierluigi Quadri, Mauro Tettamanti, and Maria Grazia De Simoni. 2001. 'Inflammatory markers in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia', *Mechanisms of ageing and development*, 122: 1985-95.
- de Waard, Monique C, Ingrid van der Pluijm, Nils Zuiderveen Borgesius, Laura H Comley, Elize D Haasdijk, Yvonne Rijksen, Yanto Ridwan, Gerben Zondag, Jan HJ Hoeijmakers, and Ype Elgersma. 2010. 'Age-related motor neuron degeneration in DNA repair-deficient Ercc1 mice', *Acta neuropathologica*, 120: 461-75.
- Denison, Michael S, Joan M Fisher, and JP Whitlock. 1989. 'Protein-DNA interactions at recognition sites for the dioxin-Ah receptor complex', *Journal of Biological Chemistry*, 264: 16478-82.

- Denison, Michael S, and Scott R Nagy. 2003. 'Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals', *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43: 309-34.
- Denison, Michael S, Anatoly A Soshilov, Guochun He, Danica E DeGroot, and Bin Zhao. 2011. 'Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor', *Toxicological sciences*, 124: 1-22.
- Desmond, John E, John DE Gabrieli, Anthony D Wagner, Bruce L Ginier, and Gary H Glover. 1997. 'Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI', *Journal of Neuroscience*, 17: 9675-85.
- Di Benedetto, Svetlana, Ludmila Müller, Elisabeth Wenger, Sandra Düzel, and Graham Pawelec. 2017. 'Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 75: 114-28.
- DiNatale, Brett C, Iain A Murray, Jennifer C Schroeder, Colin A Flaveny, Tejas S Lahoti, Elizabeth M Laurenzana, Curtis J Omiecinski, and Gary H Perdew. 2010. 'Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling', *Toxicological sciences*, 115: 89-97.
- Dinel, Anne-Laure, Corinne Joffre, Pierre Trifilieff, Agnes Aubert, Aline Foury, Pascale Le Ruyet, and Sophie Layé. 2014. 'Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood', *Journal of neuroinflammation*, 11: 155.
- Diniz, Daniel G, César AR Foro, Carla Rego, David A Gloria, Fabio RR De Oliveira, Juliana MP Paes, Aline A De Sousa, Tatyana P Tokuhashi, Lucas S Trindade, and Máira CP Turiel. 2010. 'Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes', *European Journal of Neuroscience*, 32: 509-19.
- DiPatre, Pier Luigi, and Benjamin B Gelman. 1997. 'Microglial cell activation in aging and Alzheimer disease: partial linkage with neurofibrillary tangle burden in the hippocampus', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56: 143-49.
- Domínguez-Acosta, O, L Vega, E Estrada-Muñiz, MS Rodríguez, FJ Gonzalez, and G Elizondo. 2018. 'Activation of aryl hydrocarbon receptor regulates the LPS/IFN γ -induced inflammatory response by inducing ubiquitin-proteosomal and lysosomal degradation of RelA/p65', *Biochemical pharmacology*.
- Dominguez, Diana Ines, and Bart De Strooper. 2002. 'Novel therapeutic strategies provide the real test for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease', *Trends in pharmacological sciences*, 23: 324-30.
- Doostdar, Hamed, M Danny Burke, and Richard T Mayer. 2000. 'Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1', *Toxicology*, 144: 31-38.
- Durazzo, Timothy C, Niklas Mattsson, and Michael W Weiner. 2014. 'Smoking and increased Alzheimer's disease risk: a review of potential mechanisms', *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 10: S122-S45.
- Eckers, Anna, Sascha Jakob, Christian Heiss, Thomas Haarmann-Stemmann, Christine Goy, Vanessa Brinkmann, Miriam M Cortese-Krott, Roberto Sansone, Charlotte Esser, and Niloofar Ale-Agha. 2016. 'The aryl hydrocarbon receptor promotes aging phenotypes across species', *Scientific reports*, 6: 19618.
- Edwards, Susan Claire, Wieslaw Jedrychowski, Maria Butscher, David Camann, Agnieszka Kieltyka, Elzbieta Mroz, Elzbieta Flak, Zhigang Li, Shuang Wang, and Virginia Rauh. 2010. 'Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland', *Environmental health perspectives*, 118: 1326.

- El Ayadi, Amina, Emily S Stieren, José M Barral, and Darren Boehning. 2012. 'Ubiquitin-1 regulates amyloid precursor protein maturation and degradation by stimulating K63-linked polyubiquitination of lysine 688', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 13416-21.
- Esser, Charlotte. 2009. 'The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation', *Biochemical pharmacology*, 77: 597-607.
- Esser, Charlotte, Agneta Rannug, and Brigitta Stockinger. 2009. 'The aryl hydrocarbon receptor in immunity', *Trends in immunology*, 30: 447-54.
- Fabricius, Katrine, Jette Stub Jacobsen, and Bente Pakkenberg. 2013. 'Effect of age on neocortical brain cells in 90+ year old human females—a cell counting study', *Neurobiology of aging*, 34: 91-99.
- Fang, S, and AM Weissman. 2004. 'A field guide to ubiquitylation', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 61: 1546-61.
- Farrer, Lindsay A, L Adrienne Cupples, Jonathan L Haines, Bradley Hyman, Walter A Kukull, Richard Mayeux, Richard H Myers, Margaret A Pericak-Vance, Neil Risch, and Cornelia M Van Duijn. 1997. 'Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis', *Jama*, 278: 1349-56.
- Fernandez-Salguero, PM, JM Ward, JP Sundberg, and FJ Gonzalez. 1997. 'Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice', *Veterinary pathology*, 34: 605-14.
- Fernández, Gerónimo, Ana Moraga, María I Cuartero, Alicia García-Culebras, Carolina Peña-Martínez, Jesús M Pradillo, Macarena Hernández-Jiménez, Silvia Sacristán, M Irene Ayuso, and Rafael Gonzalo-Gobernado. 2018. 'TLR4-Binding DNA Aptamers Show a Protective Effect against Acute Stroke in Animal Models', *Molecular Therapy*.
- Filbrandt, Carissa R, Zhenhua Wu, Berislav Zlokovic, Lisa Opanashuk, and Thomas A Gasiewicz. 2004. 'Presence and functional activity of the aryl hydrocarbon receptor in isolated murine cerebral vascular endothelial cells and astrocytes', *Neurotoxicology*, 25: 605-16.
- Finch, Caleb E. 1976. 'The regulation of physiological changes during mammalian aging', *The Quarterly Review of Biology*, 51: 49-83.
- . 2003. 'Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging', *Neurobiology of aging*, 24: S123-S27.
- Flood, Dorothy G. 1993. 'Critical issues in the analysis of dendritic extent in aging humans, primates, and rodents', *Neurobiology of aging*, 14: 649-54.
- Franceschi, Claudio, Massimiliano Bonafè, Silvana Valensin, Fabiola Olivieri, Maria De Luca, Enzo Ottaviani, and Giovanna De Benedictis. 2000. 'Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908: 244-54.
- Franceschi, Claudio, and Judith Campisi. 2014. 'Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases', *The Journals of Gerontology: Series A*, 69: S4-S9.
- Francis, Paul T, Alan M Palmer, Michael Snape, and Gordon K Wilcock. 1999. 'The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66: 137-47.
- Frank, Matthew G, Ruth M Barrientos, Joseph C Biedenkapp, Jerry W Rudy, Linda R Watkins, and Steven F Maier. 2006. 'mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging', *Neurobiology of aging*, 27: 717-22.
- Friedman, Scott L. 2003. 'Liver fibrosis—from bench to bedside', *Journal of hepatology*, 38: 38-53.

- Fukui, Shinsuke, Robert Schwarcz, Stanley I Rapoport, Yoshiaki Takada, and Quentin R Smith. 1991. 'Blood–brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism', *Journal of neurochemistry*, 56: 2007-17.
- Fukunaga, Bert N, Markus R Probst, Suzanne Reisz-Porszasz, and Oliver Hankinson. 1995. 'Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 270: 29270-78.
- Furness, Sebastian GB, Michael J Lees, and Murray L Whitelaw. 2007. 'The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors', *FEBS letters*, 581: 3616-25.
- Furness, Sebastian GB, and Fiona Whelan. 2009. 'The pleiotropy of dioxin toxicity—Xenobiotic misappropriation of the aryl hydrocarbon receptor's alternative physiological roles', *Pharmacology & Therapeutics*, 124: 336-53.
- Gais, Steffen, and Monika Schönauer. 2017. 'Untangling a cholinergic pathway from wakefulness to memory', *Neuron*, 94: 696-98.
- Garcia-Alloza, M, WD Hirst, CP LH Chen, B Lasheras, PT Francis, and MJ Ramirez. 2004. 'Differential involvement of 5-HT 1B/1D and 5-HT 6 receptors in cognitive and non-cognitive symptoms in Alzheimer's disease', *Neuropsychopharmacology*, 29: 410.
- Ghosh, A, J Carnahan, and ME Greenberg. 1994. 'Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons', *Science*, 263: 1618-23.
- Giil, Lasse Melvaer, Øivind Midttun, Helga Refsum, Arve Ulvik, Rajiv Advani, A David Smith, and Per Magne Ueland. 2017. 'Kynurenine Pathway Metabolites in Alzheimer's Disease', *Journal of Alzheimer's Disease*, 60: 495-504.
- Gillner, Mikael, Jan Bergman, Christian Cambillau, Monika Alexandersson, Birgitta Fernström, and Jan-Ake Gustafsson. 1993. 'Interactions of indolo [3, 2-b] carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver', *Molecular Pharmacology*, 44: 336-45.
- Gohlke, Julia M, Pat S Stockton, Stella Sieber, Julie Foley, and Christopher J Portier. 2009. 'AhR-mediated gene expression in the developing mouse telencephalon', *Reproductive toxicology*, 28: 321-28.
- Gonzalez, FJ, P Fernandez-Salguero, SST Lee, T Pineau, and JM Ward. 1995. 'Xenobiotic receptor knockout mice', *Toxicology letters*, 82: 117-21.
- Gouédard, Cédric, Robert Barouki, and Yannick Morel. 2004. 'Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism', *Molecular and Cellular Biology*, 24: 5209-22.
- Gradelet, S, J Leclerc, MH Siess, and PO Astorg. 1996. 'β-Apo-8'-carotenal, but not β-carotene, is a strong inducer of liver cytochromes P4501A1 and 1A2 in rat', *Xenobiotica*, 26: 909-19.
- Gray, LE, and Joseph S Ostby. 1995. 'In utero 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring', *Toxicology and applied pharmacology*, 133: 285-94.
- Guerreiro, Rita Joao, Miquel Baquero, Rafael Blesa, Mercè Boada, Jose Miguel Brás, Maria J Bullido, Ana Calado, Richard Crook, Carla Ferreira, and Ana Frank. 2010. 'Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP', *Neurobiology of aging*, 31: 725-31.
- Gulaj, E, K Pawlak, B Bien, and D Pawlak. 2010. 'Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients', *Advances in Medical Sciences*, 55: 204-11.
- Gunning-Dixon, Faith M, Adam M Brickman, Janice C Cheng, and George S Alexopoulos. 2009. 'Aging of cerebral white matter: a review of MRI findings', *International Journal of Geriatric Psychiatry: A journal of the psychiatry of late life and allied sciences*, 24: 109-17.
- Gureviciene, Irina, Kestutis Gurevicius, and Heikki Tanila. 2009. 'Aging and α-synuclein affect synaptic plasticity in the dentate gyrus', *Journal of Neural Transmission*, 116: 13.

- Hahn, Mark E, Lenka L Allan, and David H Sherr. 2009. 'Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor', *Biochemical pharmacology*, 77: 485-97.
- Hakkola, Jukka, Markku Pasanen, Olavi Pelkonen, Janne Hukkanen, Sari Evisalmi, Sisko Anttila, Anders Rane, Marjatta Mäntylä, Raija Purkunen, and Seppo Saarikoski. 1997. 'Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells', *Carcinogenesis*, 18: 391-97.
- Hamer, M, and Y Chida. 2009. 'Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence', *Psychological medicine*, 39: 3-11.
- Hankinson, O. 1995. 'The aryl hydrocarbon receptor complex', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35: 307-40.
- Hao, Nan, and Murray L Whitelaw. 2013. 'The emerging roles of AhR in physiology and immunity', *Biochemical pharmacology*, 86: 561-70.
- Hardy, John, and Dennis J Selkoe. 2002. 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics', *Science*, 297: 353-56.
- Harkema, Liesbeth, Sameh Ahmed Youssef, and Alain de Bruin. 2016. 'Pathology of mouse models of accelerated aging', *Veterinary pathology*, 53: 366-89.
- Harman, Denham. 2006. 'Alzheimer's Disease Pathogenesis', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067: 454-60.
- Harper, P. A., Jm Wong, M. S. Lam, and A. B. Okey. 2002. 'Polymorphisms in the human AH receptor', *Chem Biol Interact*, 141: 161-87.
- Harper, Patricia A, David S Riddick, and Allan B Okey. 2006. 'Regulating the regulator: factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor', *Biochemical pharmacology*, 72: 267-79.
- Haug, Herbert, and Reinhard Eggers. 1991. 'Morphometry of the human cortex cerebri and corpus striatum during aging', *Neurobiology of aging*, 12: 336-38.
- Hayes, Kevin R, Gina M Zastrow, Manabu Nukaya, Kalyan Pande, Ed Glover, John P Maufort, Adam L Liss, Yan Liu, Susan M Moran, and Aaron L Vollrath. 2007. 'Hepatic transcriptional networks induced by exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin', *Chemical research in toxicology*, 20: 1573-81.
- Head, E, R Mehta, J Hartley, M Kameka, BJ Cummings, CW Cotman, WW Ruehl, and NW Milgram. 1995. 'Spatial learning and memory as a function of age in the dog', *Behavioral neuroscience*, 109: 851.
- Heemels, Marie-Thérèse. 2016. "Neurodegenerative diseases." In.: Nature Publishing Group.
- Heid, Scott E, Richard S Pollenz, and Hollie I Swanson. 2000. 'Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor', *Molecular Pharmacology*, 57: 82-92.
- Helenius, Merja, Maarit Hänninen, Sanna K Lehtinen, and Antero Salminen. 1996. 'Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF-kB transcription factor in mouse cardiac muscle', *Journal of molecular and cellular cardiology*, 28: 487-98.
- Heneka, Michael T, Markus P Kummer, and Eicke Latz. 2014. 'Innate immune activation in neurodegenerative disease', *Nature Reviews Immunology*, 14: 463.
- Henson, Peter M. 2005. 'Dampening inflammation', *Nature immunology*, 6: 1179.
- Hernandez-Jimenez, M., C. Pena-Martinez, M. D. C. Godino, J. Diaz-Guzman, M. A. Moro, and I. Lizasoain. 2017. 'Test repositioning for functional assessment of neurological outcome after experimental stroke in mice', *PLoS One*, 12: e0176770.
- Hickie, Ian, Sharon Naismith, Philip B. Ward, Keelin Turner, Elizabeth Scott, Philip Mitchell, Kay Wilhelm, and Gordon Parker. 2005. 'Reduced hippocampal volumes and memory loss in patients with early- and late-onset depression', *The British Journal of Psychiatry*, 186: 197-202.

- Holtzman, David M. 2001. 'Role of apoE/A β interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy', *Journal of Molecular Neuroscience*, 17: 147-55.
- Hu, Peng, Rolf Herrmann, Amanda Bednar, Peter Saloupis, Mary A Dwyer, Ping Yang, Xiaoping Qi, Russell S Thomas, Glenn J Jaffe, and Michael E Boulton. 2013. 'Aryl hydrocarbon receptor deficiency causes dysregulated cellular matrix metabolism and age-related macular degeneration-like pathology', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: E4069-E78.
- Huang, Bo, Ryan Butler, Yifei Miao, Yubing Dai, Wanfu Wu, Wen Su, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Margaret Warner, and Jan-Åke Gustafsson. 2016. 'Dysregulation of Notch and ER α signaling in AhR $-/-$ male mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113: 11883-88.
- Huang, Z. J., I. Edery, and M. Rosbash. 1993. 'PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors', *Nature*, 364: 259-62.
- Hubble, Jean Pintar. 1998. 'Aging and the basal ganglia', *Neurologic clinics*, 16: 649-57.
- Hung, Chia-Wei, Yu-Chih Chen, Wan-Ling Hsieh, Shih-Hwa Chiou, and Chung-Lan Kao. 2010. 'Ageing and neurodegenerative diseases', *Ageing research reviews*, 9: S36-S46.
- Iconomou, Mary, and Darren N Saunders. 2016. 'Systematic approaches to identify E3 ligase substrates', *Biochemical Journal*, 473: 4083-101.
- Ikuta, Togo, Yasuhito Kobayashi, and Kaname Kawajiri. 2004. 'Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor', *Biochemical and biophysical research communications*, 317: 545-50.
- Isabel Cuartero, María, Juan de la Parra, Alicia García-Culebras, Iván Ballesteros, and Ignacio Lizasoain. 2016. 'The kynurenine pathway in the acute and chronic phases of cerebral ischemia', *Current pharmaceutical design*, 22: 1060-73.
- Jack, Clifford R, Ronald Carl Petersen, Y Xu, PC O'Brien, Glenn E Smith, Robert J Ivnik, Bradley F Boeve, Eric George Tangalos, and E Kokmen. 2000. 'Rates of hippocampal atrophy correlate with change in clinical status in aging and AD', *Neurology*, 55: 484-90.
- Jackson, Andrew S, Xuemei Sui, James R Hébert, Timothy S Church, and Steven N Blair. 2009. 'Role of lifestyle and aging on the longitudinal change in cardiorespiratory fitness', *Archives of Internal Medicine*, 169: 1781-87.
- Jain, Sanjay, Emin Maltepe, Min M Lu, Celeste Simon, and Christopher A Bradfield. 1998. 'Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 α , HIF2 α and Ah receptor mRNAs in the developing mouse', *Mechanisms of development*, 73: 117-23.
- Jauch, Diana, Ewa M Urbańska, Paolo Guidetti, Edward D Bird, J-PG Vonsattel, William O Whetsell Jr, and Robert Schwarcz. 1995. 'Dysfunction of brain kynurenic acid metabolism in Huntington's disease: focus on kynurenine aminotransferases', *Journal of the neurological sciences*, 130: 39-47.
- Ju, Q., C. C. Zouboulis, and L. Xia. 2009. 'Environmental pollution and acne: Chloracne', *Dermatoendocrinol*, 1: 125-8.
- Juricek, Ludmila, Julie Carcaud, Alice Pelhaitre, Thorfinn T Riday, Aline Chevallier, Justine Lanzini, Nicolas Auzeil, Olivier Laprévotte, Florent Dumont, and Sebastien Jacques. 2017. 'AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation', *Scientific reports*, 7: 9794.
- Jurk, Diana, Caroline Wilson, João F Passos, Fiona Oakley, Clara Correia-Melo, Laura Greaves, Gabriele Saretzki, Chris Fox, Conor Lawless, and Rhys Anderson. 2014. 'Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice', *Nature communications*, 5: 4172.
- Kaneko, Masayuki, Hiroshi Koike, Ryo Saito, Yoshihisa Kitamura, Yasunobu Okuma, and Yasuyuki Nomura. 2010. 'Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid- β generation', *Journal of Neuroscience*, 30: 3924-32.

- Katz, Sidney, Thomas D. Downs, Helen R. Cash, and Robert C. Grotz. 1970. 'Progress in Development of the Index of ADL1', *The Gerontologist*, 10: 20-30.
- Kaushik, Susmita, and Ana Maria Cuervo. 2015. 'Proteostasis and aging', *Nature medicine*, 21: 1406.
- Kawajiri, Kaname, and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. 2007. 'Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor', *Archives of biochemistry and biophysics*, 464: 207-12.
- Kawajiri, Kaname, Yasuhito Kobayashi, Fumiaki Ohtake, Togo Ikuta, Yoshibumi Matsushima, Junsei Mimura, Sven Pettersson, Richard S Pollenz, Toshiyuki Sakaki, and Takatsugu Hirokawa. 2009. 'Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 13481-86.
- Kazlauskas, Arunas, Lorenz Poellinger, and Ingemar Pongratz. 1999. 'Evidence That the Co-chaperone p23 Regulates Ligand Responsiveness of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 274: 13519-24.
- Keller, Jeffrey N, Edgardo Dimayuga, Qinghua Chen, Jeffrey Thorpe, Jillian Gee, and Qunxing Ding. 2004. 'Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36: 2376-91.
- Kerzee, J Kevin, and Kenneth S Ramos. 2001. 'Constitutive and inducible expression of Cyp1a1 and Cyp1b1 in vascular smooth muscle cells: role of the Ahr bHLH/PAS transcription factor', *Circulation research*, 89: 573-82.
- Kewley, Robyn J, Murray L Whitelaw, and Anne Chapman-Smith. 2004. 'The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36: 189-204.
- Khorram, O., M. Garthwaite, and T. Golos. 2002. 'Uterine and ovarian aryl hydrocarbon receptor (AHR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) mRNA expression in benign and malignant gynaecological conditions', *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 8: 75-80.
- Kim, Ki-Hyun, Shamin Ara Jahan, Ehsanul Kabir, and Richard JC Brown. 2013. 'A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects', *Environment international*, 60: 71-80.
- Kim, Sun-Young, and Jae-Ho Yang. 2005. 'Neurotoxic effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells', *Experimental & molecular medicine*, 37: 58.
- Kimura, Akihiro, Tetsuji Naka, Taisuke Nakahama, Ichino Chinen, Kazuya Masuda, Keiko Nohara, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, and Tadimitsu Kishimoto. 2009. 'Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses', *Journal of Experimental Medicine*, 206: 2027-35.
- Kimura, Eiki, and Chiharu Tohyama. 2017. 'Embryonic and Postnatal Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor mRNA in Mouse Brain', *Frontiers in Neuroanatomy*, 11: 4.
- Klevanski, Maja, Ulrike Herrmann, Sascha W Weyer, Romain Fol, Nathalie Cartier, David P Wolfer, John H Caldwell, Martin Korte, and Ulrike C Müller. 2015. 'The APP intracellular domain is required for normal synaptic morphology, synaptic plasticity, and hippocampus-dependent behavior', *Journal of Neuroscience*, 35: 16018-33.
- Köks, Sulev, Soner Dogan, Bilge Guvenc Tuna, Herminia González-Navarro, Paul Potter, and Roosmarijn E Vandenbroucke. 2016. 'Mouse models of ageing and their relevance to disease', *Mechanisms of ageing and development*, 160: 41-53.
- Kovacs, Elizabeth J, and Luisa A DiPietro. 1994. 'Fibrogenic cytokines and connective tissue production', *The FASEB journal*, 8: 854-61.
- Krabbe, Grietje, Annett Halle, Vitali Matyash, Jan L Rinnenthal, Gina D Eom, Ulrike Bernhardt, Kelly R Miller, Stefan Prokop, Helmut Kettenmann, and Frank L Heppner. 2013. 'Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology', *PLoS One*, 8: e60921.

- Kruegel, Undine, Brett Robison, Thomas Dange, Günther Kahlert, Joe R Delaney, Soumya Kotireddy, Mitsuhiro Tsuchiya, Scott Tsuchiyama, Christopher J Murakami, and Jennifer Schleit. 2011. 'Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*', *PLoS genetics*, 7: e1002253.
- Kuilman, Thomas, Chrysiis Michaloglou, Wolter J Mooi, and Daniel S Peeper. 2010. 'The essence of senescence', *Genes & development*, 24: 2463-79.
- Kumar, Pravir, Rashmi K Ambasta, Vimal Veereshwarayya, Kenneth M Rosen, Ken S Kosik, Hamid Band, Ruben Mestril, Cam Patterson, and Henry W Querfurth. 2007. 'CHIP and HSPs interact with β -APP in a proteasome-dependent manner and influence A β metabolism', *Human molecular genetics*, 16: 848-64.
- Kuro-o, Makoto, Yutaka Matsumura, Hiroki Aizawa, Hiroshi Kawaguchi, Tatsuo Suga, Toshihiro Utsugi, Yoshio Ohyama, Masahiko Kurabayashi, Tadashi Kaname, and Eisuke Kume. 1997. 'Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing', *Nature*, 390: 45.
- L Woodard, John, Michael A Sugarman, Kristy A Nielson, J Carson Smith, Michael Seidenberg, Sally Durgerian, Alissa Butts, Nathan Hantke, Melissa Lancaster, and Monica A Matthews. 2012. 'Lifestyle and genetic contributions to cognitive decline and hippocampal structure and function in healthy aging', *Current Alzheimer Research*, 9: 436-46.
- Lahvis, Gareth P, and Christopher A Bradfield. 1998. 'Ahr null alleles: distinctive or different?', *Biochemical pharmacology*, 56: 781-87.
- Lai, Zona C, Mark B Moss, Ronald J Killiany, Douglas L Rosene, and James G Herndon. 1995. 'Executive system dysfunction in the aged monkey: spatial and object reversal learning', *Neurobiology of aging*, 16: 947-54.
- Latchney, Sarah E, Amy M Hein, M Kerry O'Banion, Emanuel DiCicco-Bloom, and Lisa A Opanashuk. 2013. 'Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory', *Journal of neurochemistry*, 125: 430-45.
- Lau, Lok Ting, and Albert Cheung-Hoi Yu. 2001. 'Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury', *Journal of neurotrauma*, 18: 351-59.
- Launer, LJ, K Andersen, MEea Dewey, L Letenneur, A Ott, LA Amaducci, C Brayne, JRM Copeland, J-F Dartigues, and P Kragh-Sorensen. 1999. 'Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease results from EURODEM pooled analyses', *Neurology*, 52: 78-78.
- Lawrence, Toby. 2009. 'The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1.
- Lee, Byung-Hoon, Min Jae Lee, Soyeon Park, Dong-Chan Oh, Suzanne Elsassner, Ping-Chung Chen, Carlos Gartner, Nevena Dimova, John Hanna, and Steven P Gygi. 2010. 'Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14', *Nature*, 467: 179.
- Lee, C. Y. Daniel, and Gary E. Landreth. 2010. 'The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain', *Journal of Neural Transmission*, 117: 949-60.
- Lee, Hae Ung, Zachary E McPherson, Bryan Tan, Agata Korecka, and Sven Pettersson. 2017. 'Host-microbiome interactions: the aryl hydrocarbon receptor and the central nervous system', *Journal of Molecular Medicine*, 95: 29-39.
- Lee, Yi-Hsuan, Chun-Hua Lin, Pei-Chien Hsu, Yu-Yo Sun, Yu-Jie Huang, Jiun-Horng Zhuo, Chen-Yu Wang, Yu-Ling Gan, Chia-Chi Hung, and Chia-Yi Kuan. 2015. 'Aryl hydrocarbon receptor mediates both proinflammatory and anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-activated microglia', *Glia*, 63: 1138-54.

- Lewis, Simon JG, Anja Dove, Trevor W Robbins, Roger A Barker, and Adrian M Owen. 2004. 'Striatal contributions to working memory: a functional magnetic resonance imaging study in humans', *European Journal of Neuroscience*, 19: 755-60.
- Lim, Chai K, Francisco J Fernández-Gomez, Nady Braidly, Cristina Estrada, Cristina Costa, Silvia Costa, Alban Bessedé, Emiliano Fernandez-Villalba, Anna Zinger, and Maria Trinidad Herrero. 2017. 'Involvement of the kynurenine pathway in the pathogenesis of Parkinson's disease', *Progress in neurobiology*, 155: 76-95.
- Lin, Chun-Hua, Chien-Chang Chen, Chih-Ming Chou, Chen-Yu Wang, Chia-Chi Hung, Julia Y Chen, Heng-Wei Chang, Yung-Chuan Chen, Gean Chan Yeh, and Yi-Hsuan Lee. 2009. 'Knockdown of the aryl hydrocarbon receptor attenuates excitotoxicity and enhances NMDA-induced BDNF expression in cortical neurons', *Journal of neurochemistry*, 111: 777-89.
- Lin, Chun-Hua, Shu-Hui Juan, Chen Yu Wang, Yu-Yo Sun, Chih-Ming Chou, Shwu-Fen Chang, Ssu-Yao Hu, Wen-Sen Lee, and Yi-Hsuan Lee. 2008. 'Neuronal activity enhances aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression and dioxin neurotoxicity in cortical neurons', *Journal of neurochemistry*, 104: 1415-29.
- Lin, Pinpin, Suh-Woan Hu, and Tzu-Hua Chang. 2003. 'Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR), hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1), and inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in human lymphocytes', *Toxicological sciences*, 71: 20-26.
- Lodovici, M, P Dolara, C Casalini, S Ciappellano, and G Testolin. 1995. 'Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet', *Food Additives & Contaminants*, 12: 703-13.
- Long, Jeffrey M, Audrey N Kalehua, Nancy J Muth, Michael E Calhoun, Mathias Jucker, John M Hengemihle, Donald K Ingram, and Peter R Mouton. 1998. 'Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus', *Neurobiology of aging*, 19: 497-503.
- López-Otín, Carlos, Maria A Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, and Guido Kroemer. 2013. 'The hallmarks of aging', *Cell*, 153: 1194-217.
- Luecke-Johansson, Sandra, Michael Gralla, Helene Rundqvist, Jolene Caifeng Ho, Randall S Johnson, Katarina Gradin, and Lorenz Poellinger. 2017. 'A molecular mechanism to switch the aryl hydrocarbon receptor from a transcription factor to an E3 ubiquitin ligase', *Molecular and Cellular Biology*, 37: e00630-16.
- Ma, Qiang, and Kimberly T Baldwin. 2000. '2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced Degradation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by the Ubiquitin-Proteasome Pathway ROLE OF THE TRANSCRIPTION ACTIVATION AND DNA BINDING OF AhR', *Journal of Biological Chemistry*, 275: 8432-38.
- Ma, Qiang, and James P. Whitlock. 1997. 'A Novel Cytoplasmic Protein That Interacts with the Ah Receptor, Contains Tetratricopeptide Repeat Motifs, and Augments the Transcriptional Response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin', *Journal of Biological Chemistry*, 272: 8878-84.
- MacDonald, Christopher J, Henry P Ciolino, and Grace Chao Yeh. 2001. 'Dibenzoylmethane modulates aryl hydrocarbon receptor function and expression of cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1', *Cancer Research*, 61: 3919-24.
- Machado, Fabiana S, James E Johndrow, Lisia Esper, Alexandra Dias, Andre Bafica, Charles N Serhan, and Julio Aliberti. 2006. 'Anti-inflammatory actions of lipoxin A 4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent', *Nature medicine*, 12: 330.
- Maheswaran, Satheesh, Hervé Barjat, Daniel Rueckert, Simon T Bate, David R Howlett, Lorna Tilling, Sean C Smart, Andreas Pohlmann, Jill C Richardson, and Thomas Hartkens. 2009. 'Longitudinal regional brain volume changes quantified in normal aging and Alzheimer's APPx PS1 mice using MRI', *Brain research*, 1270: 19-32.

- Malaguarnera, L, L Ferlito, RM Imbesi, GS Gulizia, S Di Mauro, D Maugeri, M Malaguarnera, and A Messina. 2001. 'Immunosenescence: a review', *Archives of gerontology and geriatrics*, 32: 1-14.
- Mándi, Yvette, and László Vécsei. 2012. 'The kynurenine system and immunoregulation', *Journal of Neural Transmission*, 119: 197-209.
- Maragakis, Nicholas J, and Jeffrey D Rothstein. 2006. 'Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease', *Nature Reviews Neurology*, 2: 679.
- Marin, S, P Villalba, J Diaz-Ferrero, G Font, and V Yusà. 2011. 'Congener profile, occurrence and estimated dietary intake of dioxins and dioxin-like PCBs in foods marketed in the Region of Valencia (Spain)', *Chemosphere*, 82: 1253-61.
- Markham, Julie A, and Janice M Juraska. 2002. 'Aging and sex influence the anatomy of the rat anterior cingulate cortex', *Neurobiology of aging*, 23: 579-88.
- Martorell, Isabel, Gemma Perelló, Roser Martí-Cid, Victòria Castell, Juan M Llobet, and José L Domingo. 2010. 'Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: temporal trend', *Environment international*, 36: 424-32.
- Masters, C. L., R. Bateman, K. Blennow, C. C. Rowe, R. A. Sperling, and J. L. Cummings. 2015. 'Alzheimer's disease', *Nat Rev Dis Primers*, 1: 15056.
- Matikainen, T., G. I. Perez, A. Jurisicova, J. K. Pru, J. J. Schlezinger, H. Y. Ryu, J. Laine, T. Sakai, S. J. Korsmeyer, R. F. Casper, D. H. Sherr, and J. L. Tilly. 2001. 'Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals', *Nat Genet*, 28: 355-60.
- Mawuenyega, Kwasi G, Wendy Sigurdson, Vitaliy Ovod, Ling Munsell, Tom Kasten, John C Morris, Kevin E Yarasheski, and Randall J Bateman. 2010. 'Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease', *Science*, 330: 1774-74.
- McGuire, J., P. Coumailleau, M. L. Whitelaw, J. A. Gustafsson, and L. Poellinger. 1995. 'The basic helix-loop-helix/PAS factor Sim is associated with hsp90. Implications for regulation by interaction with partner factors', *J Biol Chem*, 270: 31353-7.
- McNab, Fiona, Peter Zeidman, Robb B Rutledge, Peter Smittenaar, Harriet R Brown, Rick A Adams, and Raymond J Dolan. 2015. 'Age-related changes in working memory and the ability to ignore distraction', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 6515-18.
- Medzhitov, Ruslan. 2008. 'Origin and physiological roles of inflammation', *Nature*, 454: 428.
- Meyer, B. K., M. G. Pray-Grant, J. P. Vanden Heuvel, and G. H. Perdew. 1998. 'Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity', *Mol Cell Biol*, 18: 978-88.
- Michaud, Martin, Laurent Balardy, Guillaume Moulis, Clement Gaudin, Caroline Peyrot, Bruno Vellas, Matteo Cesari, and Fati Nourhashemi. 2013. 'Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases', *Journal of the American Medical Directors Association*, 14: 877-82.
- Micka, Jana, Athena Milatovich, Anil Menon, Gregory A Grabowski, Alvaro Puga, and Daniel W Nebert. 1997. 'Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility', *Pharmacogenetics and Genomics*, 7: 95-100.
- Miedel, Christian J, Jennifer M Patton, Andrew N Miedel, Edward S Miedel, and Jonathan M Levenson. 2017. 'Assessment of Spontaneous Alternation, Novel Object Recognition and Limb Claspings in Transgenic Mouse Models of Amyloid- β and Tau Neuropathology', *Journal of visualized experiments: JoVE*.
- Mielke, M. M., P. Vemuri, and W. A. Rocca. 2014. 'Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences', *Clin Epidemiol*, 6: 37-48.

- Mimura, Junsei, Masatsugu Ema, Kazuhiro Sogawa, and Yoshiaki Fujii-Kuriyama. 1999. 'Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function', *Genes & development*, 13: 20-25.
- Mimura, Junsei, Keisuke Yamashita, Kenji Nakamura, Masanobu Morita, Toshio N Takagi, Kazuki Nakao, Masatsugu Ema, Kazuhiro Sogawa, Mineo Yasuda, and Motoya Katsuki. 1997. 'Loss of teratogenic response to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor', *Genes to cells*, 2: 645-54.
- Møller, Peter, Mille Løhr, Janne K Folkmann, Lone Mikkelsen, and Steffen Loft. 2010. 'Aging and oxidatively damaged nuclear DNA in animal organs', *Free radical biology and medicine*, 48: 1275-85.
- Montgomery, Erwin B, William C Koller, Theodora JK LaMantia, Mary C Newman, Elizabeth Swanson-Hyland, Alfred W Kaszniak, and Kelly Lyons. 2000. 'Early detection of probable idiopathic Parkinson's disease: I. Development of a diagnostic test battery', *Movement disorders*, 15: 467-73.
- Morel, Etienne, Zeina Chamoun, Zofia M Lasiecka, Robin B Chan, Rebecca L Williamson, Christopher Vetanovetz, Claudia Dall'Armi, Sabrina Simoes, Kimberly S Point Du Jour, and Brian D McCabe. 2013. 'Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system', *Nature communications*, 4: 2250.
- Moreno-Marín, Nuria, Jaime M Merino, Alberto Alvarez-Barrientos, Daxeshkumar P Patel, Shogo Takahashi, José M González-Sancho, Pablo Gandolfo, Rosa M Rios, Alberto Muñoz, and Frank J Gonzalez. 2018. 'Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes Liver Polyploidization and Inhibits PI3K, ERK, and Wnt/ β -Catenin Signaling', *iScience*, 4: 44-63.
- Morgan, Edward T. 1997. 'Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection', *Drug metabolism reviews*, 29: 1129-88.
- Morgan, Todd E, Irina Rozovsky, Sarah K Goldsmith, David J Stone, Toru Yoshida, and Caleb E Finch. 1997. 'Increased transcription of the astrocyte gene GFAP during middle-age is attenuated by food restriction: implications for the role of oxidative stress', *Free radical biology and medicine*, 23: 524-28.
- Morley, John E, and Richard N Baumgartner. 2004. "Cytokine-related aging process." In.: Oxford University Press.
- Moskalev, Alexey A, Mikhail V Shaposhnikov, Ekaterina N Plyusnina, Alex Zhavoronkov, Arie Budovsky, Hagai Yanai, and Vadim E Fraifeld. 2013. 'The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria', *Ageing research reviews*, 12: 661-84.
- Moyer, Benjamin J, Itzel Y Rojas, Joanna S Kerley-Hamilton, Haley F Hazlett, Krishnamurthy V Nemani, Heidi W Trask, Rachel J West, Leslie E Lupien, Alan J Collins, and Carol S Ringelberg. 2016. 'Inhibition of the aryl hydrocarbon receptor prevents Western diet-induced obesity. Model for AHR activation by kynurenine via oxidized-LDL, TLR2/4, TGF β , and IDO1', *Toxicology and applied pharmacology*, 300: 13-24.
- Mullan, Mike, Fiona Crawford, Karin Axelman, Henry Houlden, Lena Lilius, Bengt Winblad, and Lars Lannfelt. 1992. 'A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid', *Nature genetics*, 1: 345-47.
- Murphy, M Paul, and Harry LeVine III. 2010. 'Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide', *Journal of Alzheimer's Disease*, 19: 311-23.
- Nadel, Lynn, and Lloyd MacDonald. 1980. 'Hippocampus: Cognitive map or working memory?', *Behavioral and neural biology*, 29: 405-09.
- Namba, Yoshio, Masanori Tomonaga, Hiroshi Kawasaki, Eiichi Otomo, and Kazuhiko Ikeda. 1991. 'Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease', *Brain research*, 541: 163-66.

- Nathan, Carl. 2002. 'Points of control in inflammation', *Nature*, 420: 846.
- NEBERT, D WTT_GOUJON, FM Goujon, and JE Gielen. 1972. 'Aryl hydrocarbon hydroxylase induction by polycyclic hydrocarbons: simple autosomal dominant trait in the mouse', *Nature*, 236: 107-10.
- Nebert, Daniel W, Timothy P Dalton, Allan B Okey, and Frank J Gonzalez. 2004. 'Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 23847-50.
- Negishi, Takaaki, Yutaka Kato, Osamu Ooneda, Junsei Mimura, Tomonari Takada, Hidenori Mochizuki, Masayuki Yamamoto, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, and Shoji Furusako. 2005. 'Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance', *The Journal of Immunology*, 175: 7348-56.
- Nguyen, Nam Trung, Taisuke Nakahama, Duc Hoang Le, Le Van Son, Ha Hoang Chu, and Tadamitsu Kishimoto. 2014. 'Aryl hydrocarbon receptor and kynurenine: recent advances in autoimmune disease research', *Frontiers in immunology*, 5: 551.
- Nichols, Nancy R, Jonathan R Day, Nicholas J Laping, Steven A Johnson, and Caleb E Finch. 1993. 'GFAP mRNA increases with age in rat and human brain', *Neurobiology of aging*, 14: 421-29.
- O'Banion, M Kerry, Paul D Coleman, and Linda M Callahan. 1994. "Regional neuronal loss in aging and Alzheimer's disease: a brief review." In *Seminars in Neuroscience*, 307-14. Elsevier.
- O'Brien, Richard J, and Philip C Wong. 2011. 'Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease', *Annual review of neuroscience*, 34: 185-204.
- Ohtake, Fumiaki, Atsushi Baba, Ichiro Takada, Maiko Okada, Kei Iwasaki, Hiromi Miki, Sayuri Takahashi, Alexander Kouzmenko, Keiko Nohara, and Tomoki Chiba. 2007. 'Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase', *Nature*, 446: 562-66.
- Ohtake, Fumiaki, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, and Shigeaki Kato. 2009. 'AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions', *Biochemical pharmacology*, 77: 474-84.
- Okey, A. B., L. M. Vella, and P. A. Harper. 1989. 'Detection and characterization of a low affinity form of cytosolic Ah receptor in livers of mice nonresponsive to induction of cytochrome P1-450 by 3-methylcholanthrene', *Mol Pharmacol*, 35: 823-30.
- Omicinski, Curtis J, Carrie A Redlich, and Paola Costa. 1990. 'Induction and developmental expression of cytochrome P450IA1 messenger RNA in rat and human tissues: detection by the polymerase chain reaction', *Cancer Research*, 50: 4315-21.
- Osorio, Fernando G, Clea Bárcena, Clara Soria-Valles, Andrew J Ramsay, Félix de Carlos, Juan Cobo, Antonio Fueyo, José MP Freije, and Carlos López-Otín. 2012. 'Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- κ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response', *Genes & development*, 26: 2311-24.
- Ouyang, Wenjun, Jay K Kolls, and Yan Zheng. 2008. 'The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation', *Immunity*, 28: 454-67.
- Ownby, Raymond L. 2010. 'Neuroinflammation and Cognitive Aging', *Current Psychiatry Reports*, 12: 39-45.
- Paganga, George, and Catherine A Rice-Evans. 1997. 'The identification of flavonoids as glycosides in human plasma', *FEBS letters*, 401: 78-82.
- Park, Sophia L, Rebecca Justiniano, Joshua D Williams, Christopher M Cabello, Shuxi Qiao, and Georg T Wondrak. 2015. 'The tryptophan-derived endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand 6-formylindolo [3, 2-b] carbazole is a nanomolar UVA photosensitizer in epidermal keratinocytes', *Journal of Investigative Dermatology*, 135: 1649-58.
- Patandin, Svati, Caren I Lanting, Paul GH Mulder, E Rudy Boersma, Pieter JJ Sauer, and Nynke Weisglas-Kuperus. 1999. 'Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age', *The Journal of pediatrics*, 134: 33-41.

- Patel, Saroor AA, Upinder Bhambra, Michalis P Charalambous, Rhiannon M David, Robert J Edwards, Tracy Lightfoot, Alan R Boobis, and Nigel J Gooderham. 2014. 'Interleukin-6 mediated upregulation of CYP1B1 and CYP2E1 in colorectal cancer involves DNA methylation, miR27b and STAT3', *British journal of cancer*, 111: 2287.
- Peinado, Maria Angeles, Adoracion Quesada, Juan Angel Pedrosa, Manuel Martinez, Francisco Jose Esteban, Maria Luisa del Moral, and Jose Maria Peinado. 1997. 'Light microscopic quantification of morphological changes during aging in neurons and glia of the rat parietal cortex', *The Anatomical Record*, 247: 420-25.
- Perera, Frederica P, Virginia Rauh, Robin M Whyatt, Wei-Yann Tsai, Deliang Tang, Diurka Diaz, Lori Hoepner, Dana Barr, Yi-Hsuan Tu, and David Camann. 2006. 'Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children', *Environmental health perspectives*, 114: 1287.
- Perry, Elaine K, Peter H Gibson, Garry Blessed, Robert H Perry, and Bernard E Tomlinson. 1977. 'Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia: Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue', *Journal of the neurological sciences*, 34: 247-65.
- Perry, V Hugh. 2004. 'The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease', *Brain, behavior, and immunity*, 18: 407-13.
- Perry, V Hugh, and Jessica Teeling. 2013. "Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration." In *Seminars in immunopathology*, 601-12. Springer.
- Perry, VH, MK Matyszak, and S Fearn. 1993. 'Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS', *Glia*, 7: 60-67.
- Petersen, S. L., M. A. Curran, S. A. Marconi, C. D. Carpenter, L. S. Lubbers, and M. D. McAbee. 2000. 'Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem', *J Comp Neurol*, 427: 428-39.
- Peterson, Bradley S, Virginia A Rauh, Ravi Bansal, Xuejun Hao, Zachary Toth, Giancarlo Nati, Kirwan Walsh, Rachel L Miller, Franchesca Arias, and David Semanek. 2015. 'Effects of prenatal exposure to air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the development of brain white matter, cognition, and behavior in later childhood', *JAMA psychiatry*, 72: 531-40.
- Phelan, D, GM Winter, WJ Rogers, JC Lam, and MS Denison. 1998. 'Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin', *Archives of biochemistry and biophysics*, 357: 155-63.
- Piguet, O, KL Double, JJ Kril, J Harasty, V Macdonald, DA McRitchie, and GM Halliday. 2009. 'White matter loss in healthy ageing: a postmortem analysis', *Neurobiology of aging*, 30: 1288-95.
- Pocar, P, B Fischer, T Klönisch, and S Hombach-Klönisch. 2005. 'Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction', *Reproduction*, 129: 379-89.
- Poland, A., and E. Glover. 1973. 'Chlorinated dibenzo-p-dioxins: potent inducers of delta-aminolevulinic acid synthetase and aryl hydrocarbon hydroxylase. II. A study of the structure-activity relationship', *Mol Pharmacol*, 9: 736-47.
- Poland, A. P., E. Glover, J. R. Robinson, and D. W. Nebert. 1974. 'Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Induction of monooxygenase activities and cytochrome P1-450 formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice genetically "nonresponsive" to other aromatic hydrocarbons', *J Biol Chem*, 249: 5599-606.

- POLAND, ALAN, and EDWARD GLOVER. 1975. 'Genetic Expression of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: Evidence for a Receptor Mutation in Genetically Non-responsive Mice', *Molecular Pharmacology*, 11: 389-98.
- Prechel, M Margaret, Luke Halbur, Suma Devata, Abhay M Vaidya, and M Rita I Young. 1996. 'Increased interleukin-6 production by cerebral cortical tissue of adult versus young mice', *Mechanisms of ageing and development*, 92: 185-94.
- Qin, Hongtao, and Jo Anne Powell-Coffman. 2004. 'The Caenorhabditis elegans aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development', *Developmental biology*, 270: 64-75.
- Quintana, Francisco J. 2013. 'The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental control of the immune response', *Immunology*, 138: 183-89.
- Quintana, Francisco J, Alexandre S Basso, Antonio H Iglesias, Thomas Korn, Mauricio F Farez, Estelle Bettelli, Mario Caccamo, Mohamed Oukka, and Howard L Weiner. 2008. 'Control of T reg and T H 17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor', *Nature*, 453: 65.
- Rampelli, Simone, Marco Candela, Silvia Turroni, Elena Biagi, Sebastiano Collino, Claudio Franceschi, Paul W O'Toole, and Patrizia Brigidi. 2013. 'Functional metagenomic profiling of intestinal microbiome in extreme ageing', *Ageing (Albany NY)*, 5: 902.
- Ransohoff, Richard M. 2016. 'How neuroinflammation contributes to neurodegeneration', *Science*, 353: 777-83.
- Ravetz, RS. 1999. 'Psychiatric disorders associated with Alzheimer's disease', *The Journal of the American Osteopathic Association*, 99: S13-6.
- Raz, Naftali. 2004. 'Aging is a manifold of universal biological processes that, with passage of time, profoundly alter anatomy, neurochemistry, and physiology of all organisms. Although no organs or systems escape the impact of aging, its effects on the central nervous system (CNS) are especially dramatic. The brains of older people can be distinguished from those of their younger peers in many ways and on many levels, from mitochondria to gross anatomy. So numerous and diverse are the changes that encompassing the totality of brain aging in one survey would be too daunting an objective. Thus, for comprehensive up-to-date accounts of neurobiology', *Cognitive Neuroscience of Aging: Linking Cognitive and Cerebral Aging: Linking Cognitive and Cerebral Aging*: 19.
- Raz, Naftali, Ulman Lindenberger, Karen M Rodrigue, Kristen M Kennedy, Denise Head, Adrienne Williamson, Cheryl Dahle, Denis Gerstorf, and James D Acker. 2005. 'Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers', *Cerebral Cortex*, 15: 1676-89.
- Reiter, Russel J, DARIO ACUÑA-CASTROVIEJO, DUN-XIAN TAN, and Susanne Burkhardt. 2001. 'Free radical-mediated molecular damage', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 939: 200-15.
- Reyes, Teresa M, Zsuzsanna Fabry, and Christopher L Coe. 1999. 'Brain endothelial cell production of a neuroprotective cytokine, interleukin-6, in response to noxious stimuli', *Brain research*, 851: 215-20.
- Rogers, Joseph, Judith Luber-Narod, Scot D Styren, and W Harold Civin. 1988. 'Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease', *Neurobiology of aging*, 9: 339-49.
- Roh, Eun, Soo Heon Kwak, Hye Seung Jung, Young Min Cho, Youngmi Kim Pak, Kyong Soo Park, Seong Yeon Kim, and Hong Kyu Lee. 2015. 'Serum aryl hydrocarbon receptor ligand activity is associated with insulin resistance and resulting type 2 diabetes', *Acta diabetologica*, 52: 489-95.

- Roman, Ángel C., José M. Carvajal-Gonzalez, Jaime M. Merino, Sonia Mulero-Navarro, and Pedro M. Fernández-Salguero. 2017. 'The aryl hydrocarbon receptor in the crossroad of signalling networks with therapeutic value', *Pharmacology & Therapeutics*.
- Ross, Christopher A, and Michelle A Poirier. 2004. 'Protein aggregation and neurodegenerative disease', *Nature medicine*, 10: S10.
- Rothhammer, Veit, Davis M Borucki, Emily C Tjon, Maisa C Takenaka, Chun-Cheih Chao, Alberto Ardura-Fabregat, Kalil Alves de Lima, Cristina Gutiérrez-Vázquez, Patrick Hewson, and Ori Staszewski. 2018. 'Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites', *Nature*: 1.
- Rothhammer, Veit, Davis M. Borucki, Maria Isabel Garcia Sanchez, Maria Antonietta Mazzola, Christopher C. Hemond, Keren Regev, Anu Paul, Pia Kivisäkk, Rohit Bakshi, Guillermo Izquierdo, Howard L. Weiner, and Francisco J. Quintana. 2017. 'Dynamic regulation of serum aryl hydrocarbon receptor agonists in MS', *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 4: e359.
- Rothhammer, Veit, Ivan D Mascanfroni, Lukas Bunse, Maisa C Takenaka, Jessica E Kenison, Lior Mayo, Chun-Cheih Chao, Bonny Patel, Raymond Yan, and Manon Blain. 2016. 'Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor', *Nature medicine*, 22: 586.
- Rubinsztein, David C, Guillermo Mariño, and Guido Kroemer. 2011. 'Autophagy and aging', *Cell*, 146: 682-95.
- Rygiel, Karolina A, Martin Picard, and Doug M Turnbull. 2016. 'The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective', *The Journal of physiology*, 594: 4499-512.
- Ryman, Davis C, Natalia Acosta-Baena, Paul S Aisen, Thomas Bird, Adrian Danek, Nick C Fox, Alison Goate, Peter Frommelt, Bernardino Ghetti, and Jessica BS Langbaum. 2014. 'Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease A systematic review and meta-analysis', *Neurology*, 83: 253-60.
- Rypma, Bart, Vivek Prabhakaran, John E Desmond, Gary H Glover, and John DE Gabrieli. 1999. 'Load-dependent roles of frontal brain regions in the maintenance of working memory', *Neuroimage*, 9: 216-26.
- Saez, Isabel, and David Vilchez. 2014. 'The mechanistic links between proteasome activity, aging and age-related diseases', *Current genomics*, 15: 38-51.
- Saito, T., Y. Matsuba, N. Mihira, J. Takano, P. Nilsson, S. Itohara, N. Iwata, and T. C. Saido. 2014. 'Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease', *Nat Neurosci*, 17: 661-3.
- Salminen, Antero, Kai Kaarniranta, and Anu Kauppinen. 2012. 'Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes', *Aging (Albany NY)*, 4: 166.
- Samak, Mostafa, Javid Fatullayev, Anton Sabashnikov, Mohamed Zerriouh, Bastian Schmack, Mina Farag, Aron-Frederik Popov, Pascal M Dohmen, Yeong-Hoon Choi, and Thorsten Wahlers. 2016. 'Cardiac hypertrophy: an introduction to molecular and cellular basis', *Medical science monitor basic research*, 22: 75.
- Sampathkumar, Nirmal Kumar, Mehdi Hichor, Laure Weill, Delphine Meffre, Ludmila Juricek, Ingrid Laurendeau, Aline Chevallier, Nicolas Ortonne, Frédérique Larousserie, and Marc Herbin. 2018. 'Involvement of Aryl hydrocarbon receptor in myelination and in human nerve sheath tumorigenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115: E1319-E28.
- Saunders, Ann M, Warren J Strittmatter, D Schmechel, PH St George-Hyslop, MA Pericak-Vance, SH Joo, BL Rosi, JF Gusella, DR Crapper-MacLachlan, and MJ Alberts. 1993. 'Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease', *Neurology*, 43: 1467-67.

- Scahill, Rachael I, Chris Frost, Rhian Jenkins, Jennifer L Whitwell, Martin N Rossor, and Nick C Fox. 2003. 'A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging', *Archives of neurology*, 60: 989-94.
- Schantz, Susan L, Byung-Woun Seo, Jamal Moshtaghian, Richard E Peterson, and Robert W Moore. 1996. 'Effects of gestational and lactational exposure to TCDD or coplanar PCBs on spatial learning', *Neurotoxicology and teratology*, 18: 305-13.
- Schechter, A., L. Birnbaum, J. J. Ryan, and J. D. Constable. 2006. 'Dioxins: an overview', *Environ Res*, 101: 419-28.
- Schmidt, Jennifer V, GH Su, Janardan K Reddy, M Celeste Simon, and Christopher A Bradfield. 1996. 'Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 6731-36.
- Schuff, N., N. Woerner, L. Boreta, T. Kornfield, L. M. Shaw, J. Q. Trojanowski, P. M. Thompson, Jr C. R. Jack, and M. W. Weiner. 2009. 'MRI of hippocampal volume loss in early Alzheimer's disease in relation to ApoE genotype and biomarkers', *Brain*, 132: 1067-77.
- Schulman, Brenda A, and J Wade Harper. 2009. 'Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways', *Nature reviews Molecular cell biology*, 10: 319-31.
- Schwartz, Alan L, and Aaron Ciechanover. 2009. 'Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology', *Annual review of pharmacology and toxicology*, 49: 73-96.
- Seidler, Rachael D, Jessica A Bernard, Taritonye B Burutolu, Brett W Fling, Mark T Gordon, Joseph T Gwin, Youngbin Kwak, and David B Lipps. 2010. 'Motor control and aging: links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34: 721-33.
- Selkoe, Dennis J. 1991. 'The molecular pathology of Alzheimer's disease', *Neuron*, 6: 487-98.
- Shimada, Atsuyoshi, and Sanae Hasegawa-Ishii. 2011. 'Senescence-accelerated mice (SAMs) as a model for brain aging and immunosenescence', *Aging and disease*, 2: 414.
- Shin, Soona, Nobunao Wakabayashi, Vikas Misra, Shyam Biswal, Gum Hwa Lee, Elin S Agoston, Masayuki Yamamoto, and Thomas W Kensler. 2007. 'NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: influence on adipogenesis', *Molecular and Cellular Biology*, 27: 7188-97.
- Šimko, Peter. 2002. 'Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives', *Journal of chromatography B*, 770: 3-18.
- Singh, Kameshwar P, John A Bennett, Fanny L Casado, Jason L Walrath, Stephen L Welle, and Thomas A Gasiewicz. 2013. 'Loss of aryl hydrocarbon receptor promotes gene changes associated with premature hematopoietic stem cell exhaustion and development of a myeloproliferative disorder in aging mice', *Stem cells and development*, 23: 95-106.
- Singh, Narendra P, Udai P Singh, Balwan Singh, Robert L Price, Mitzi Nagarkatti, and Prakash S Nagarkatti. 2011. 'Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis', *PLoS One*, 6: e23522.
- Šmerdová, Lenka, Jana Svobodová, Markéta Kabátková, Jiří Kohoutek, Dalibor Blažek, Miroslav Machala, and Jan Vondráček. 2014. 'Upregulation of CYP1B1 expression by inflammatory cytokines is mediated by the p38 MAP kinase signal transduction pathway', *Carcinogenesis*, 35: 2534-43.
- Sofroniew, Michael V. 2005. 'Reactive astrocytes in neural repair and protection', *The Neuroscientist*, 11: 400-07.
- Song, Zhijuan, and Richard S Pollenz. 2002. 'Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation', *Molecular Pharmacology*, 62: 806-16.

- Soreq, Lilach, Jamie Rose, Eyal Soreq, John Hardy, Daniah Trabzuni, Mark R Cookson, Colin Smith, Mina Ryten, Rickie Patani, and Jernej Ule. 2017. 'Major shifts in glial regional identity are a transcriptional hallmark of human brain aging', *Cell reports*, 18: 557-70.
- Sorg, Olivier. 2014. 'AhR signalling and dioxin toxicity', *Toxicology letters*, 230: 225-33.
- Sparkman, Nathan L, and Rodney W Johnson. 2008. 'Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress', *Neuroimmunomodulation*, 15: 323-30.
- Speer, K, E Steeg, P Horstmann, Th Kühn, and A Montag. 1990. 'Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe', *Journal of Separation Science*, 13: 104-11.
- Squadrone, S, P Brizio, R Nespoli, C Stella, and MC Abete. 2015. 'Human dietary exposure and levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs) and non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (NDL-PCBs) in free-range eggs close to a secondary aluminum smelter, Northern Italy', *Environmental Pollution*, 206: 429-36.
- Stewart, Mikaela D, Tobias Ritterhoff, Rachel E Kleivit, and Peter S Brzovic. 2016. 'E2 enzymes: more than just middle men', *Cell research*, 26: 423-40.
- Stoll, Guido, Sebastian Jander, and Michael Schroeter. 2002. 'I NEURONAL CELL DEATH OVERVIEW OF BASIC MECHANISMS-3 DETRIMENTAL AND BENEFICIAL EFFECTS OF INJURY-INDUCED INFLAMMATION AND CYTOKINE EXPRESSION IN THE NERVOUS SYSTEM', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 513: 87.
- Strehler, Bernard L, and Albert S Mildvan. 1960. 'General theory of mortality and aging', *Science*, 132: 14-21.
- Streit, Wolfgang J, Nicole W Sammons, Amanda J Kuhns, and D Larry Sparks. 2004. 'Dystrophic microglia in the aging human brain', *Glia*, 45: 208-12.
- Sun, Yi. 2006. 'E3 ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers', *Neoplasia*, 8: 645-54.
- Suzuki, Yasuhiro, Jennifer Claflin, Xisheng Wang, Andrea Lengi, and Takane Kikuchi. 2005. 'Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*', *International journal for parasitology*, 35: 83-90.
- Svennerholm, Lars, Kerstin Boström, and Birgitta Jungbjer. 1997. 'Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes', *Acta neuropathologica*, 94: 345-52.
- Takao, Hidemasa, Naoto Hayashi, and Kuni Ohtomo. 2012. 'A longitudinal study of brain volume changes in normal aging', *European journal of radiology*, 81: 2801-04.
- Tanaka, Go, Sachiko Kanaji, Ayumi Hirano, Kazuhiko Arima, Akira Shinagawa, Chiho Goda, Shin'ichiro Yasunaga, Koichi Ikizawa, Yuki Yoshi Yanagihara, and Masato Kubo. 2005. 'Induction and activation of the aryl hydrocarbon receptor by IL-4 in B cells', *International immunology*, 17: 797-805.
- Taylor, B. L., and I. B. Zhulin. 1999. 'PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light', *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 479-506.
- Terao, Akira, Anjali Apte-Deshpande, Linda Dousman, Stephen Morairty, Barrett P Eynon, Thomas S Kilduff, and Yvonne R Freund. 2002. 'Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus', *Journal of neuroimmunology*, 132: 99-112.
- Terashima, Jun, Chie Tachikawa, Kenzo Kudo, Wataru Habano, and Shogo Ozawa. 2013. 'An aryl hydrocarbon receptor induces VEGF expression through ATF4 under glucose deprivation in HepG2', *BMC molecular biology*, 14: 27.
- Terman, Alexei, and Ulf T. Brunk. 2004. 'Lipofuscin', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36: 1400-04.

- Tian, Yanan, Sui Ke, Michael S Denison, Arnold B Rabson, and Michael A Gallo. 1999. 'Ah receptor and NF- κ B interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity', *Journal of Biological Chemistry*, 274: 510-15.
- Tilstra, Jeremy S, Andria R Robinson, Jin Wang, Siobhán Q Gregg, Cheryl L Clauson, Daniel P Reay, Luigi A Nasto, Claudette M St Croix, Arvydas Usas, and Nam Vo. 2012. 'NF- κ B inhibition delays DNA damage–induced senescence and aging in mice', *The Journal of clinical investigation*, 122: 2601-12.
- Tinel, Marina, Marie-Anne Robin, Jaleh Doostzadeh, Michel Maratrat, Francois Ballet, Nicolas Fardel, Johny El Kahwaji, Philippe Beaune, Martine Daujat, and Gilles Labbe. 1995. 'The interleukin-2 receptor down-regulates the expression of cytochrome P450 in cultured rat hepatocytes', *Gastroenterology*, 109: 1589-99.
- Tomaru, Utano, Satomi Takahashi, Akihiro Ishizu, Yukiko Miyatake, Aya Gohda, Sayuri Suzuki, Ayako Ono, Jiro Ohara, Tomohisa Baba, and Shigeo Murata. 2012. 'Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities', *The American journal of pathology*, 180: 963-72.
- Trifunovic, Aleksandra, Anna Wredenberg, Maria Falkenberg, Johannes N Spelbrink, Anja T Rovio, Carl E Bruder, Mohammad Bohlooly-y, Sebastian Gidlöf, Anders Oldfors, and Rolf Wibom. 2004. 'Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase', *Nature*, 429: 417.
- Tulving, Endel. 1972. 'Episodic and semantic memory', *Organization of memory*, 1: 381-403.
- Underwood, Emily. 2017. "The polluted brain." In.: American Association for the Advancement of Science.
- Verghese, Joe, Roe Holtzer, Mooyeon Oh-Park, Carol A. Derby, Richard B. Lipton, and Cuiling Wang. 2011. 'Inflammatory Markers and Gait Speed Decline in Older Adults', *The Journals of Gerontology: Series A*, 66A: 1083-89.
- Vilchez, David, Ianessa Morantte, Zheng Liu, Peter M Douglas, Carsten Merkwirth, Ana PC Rodrigues, Gerard Manning, and Andrew Dillin. 2012. 'RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions', *Nature*, 489: 263.
- Vina, Jose, Consuelo Borras, and Jaime Miquel. 2007. 'Theories of ageing', *IUBMB life*, 59: 249-54.
- Vogel-Ciernia, Annie, and Marcelo A Wood. 'Examining object location and object recognition memory in mice', *Current protocols in neuroscience*: 8.31. 1-8.31. 17.
- Wagage, Sagie, Beena John, Bryan L Krock, Aisling O'Hara Hall, Louise M Randall, Christopher L Karp, M Celeste Simon, and Christopher A Hunter. 2014. 'The aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 production by NK cells', *The Journal of Immunology*, 192: 1661-70.
- Walford, Roy L. 1969. 'The immunologic theory of aging', *Immunological Reviews*, 2: 171-71.
- Wang, Haizhi, and Aleister J Saunders. 2014. 'The role of ubiquitin-proteasome in the metabolism of amyloid precursor protein (APP): implications for novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease', *Discov Med*, 18: 41-50.
- Watanabe, Tomomichi, Heinz Von Der Kammer, Xiaolu Wang, Yasushi Shintani, and Takashi Horiguchi. 2013. 'Neuronal expression of F-box and leucine-rich-repeat protein 2 decreases over Braak stages in the brains of Alzheimer's disease patients', *Neurodegenerative Diseases*, 11: 1-12.
- Wattenberg, Lee W, and William D Loub. 1978. 'Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles', *Cancer Research*, 38: 1410-13.
- Weaver, J. D., M.-H. Huang, M. Albert, T. Harris, J. W. Rowe, and T. E. Seeman. 2002. 'Interleukin-6 and risk of cognitive decline', *MacArthur Studies of Successful Aging*, 59: 371-78.
- Weber, Roland, Caroline Gaus, Mats Tysklind, Paul Johnston, Martin Forter, Henner Hollert, Emanuel Heinisch, Ivan Holoubek, Mariann Lloyd-Smith, and Shigeki Masunaga. 2008.

- 'Dioxin-and POP-contaminated sites—contemporary and future relevance and challenges', *Environmental Science and Pollution Research*, 15: 363.
- Weindruch, Richard, Tsuyoshi Kayo, Cheol-Koo Lee, and Tomas A Prolla. 2002. 'Gene expression profiling of aging using DNA microarrays', *Mechanisms of ageing and development*, 123: 177-93.
- Whitehouse, Peter J, Donald L Price, Robert G Struble, Arthur W Clark, Joseph T Coyle, and Mahlon R Delon. 1982. 'Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain', *Science*, 215: 1237-39.
- Wietrzych, Marta, Hamid Meziane, Anne Sutter, Norbert Ghyselinck, Paul F Chapman, Pierre Chambon, and Wojciech Krężel. 2005. 'Working memory deficits in retinoid X receptor γ -deficient mice', *Learning & Memory*, 12: 318-26.
- Wilhelmsson, Anna, Scott Cuthill, Marc Denis, Ann Charlotte Wikström, Jan-Ake Gustafsson, and Lorenz Poellinger. 1990. 'The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein', *The EMBO journal*, 9: 69.
- Williams, Evan G, Laurent Mouchiroud, Michael Frochoux, Ashutosh Pandey, Pénélope A Andreux, Bart Deplancke, and Johan Auwerx. 2014. 'An evolutionarily conserved role for the aryl hydrocarbon receptor in the regulation of movement', *PLoS genetics*, 10: e1004673.
- Williamson, Rebecca L, Karine Laulagnier, André Miguel Miranda, Marty A Fernandez, Michael S Wolfe, Rémy Sadoul, and Gilbert Di Paolo. 2017. 'Disruption of amyloid precursor protein ubiquitination selectively increases amyloid beta (A β) 40 levels via presenilin 2-mediated cleavage', *Journal of Biological Chemistry*: jbc. M117. 818138.
- Wiśniewski, Henryk M, and Robert D Terry. 1973. 'Morphology of the aging brain, human and animal.' in *Progress in brain research* (Elsevier).
- Wójtowicz, Anna K, Konrad A Szychowski, Agnieszka Wnuk, and Małgorzata Kajta. 2017. 'Dibutyl phthalate (DBP)-induced apoptosis and neurotoxicity are mediated via the aryl hydrocarbon receptor (AhR) but not by estrogen receptor alpha (ER α), estrogen receptor beta (ER β), or peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in mouse cortical neurons', *Neurotoxicity research*, 31: 77-89.
- Wook-Ha, Park, Jun Dae Won, Kim Jin Taek, Jeong Jae Hoon, Park Hookeun, Chang Yoon-Seok, Park Kyong Soo, Lee Hong Kyu, and Pak Youngmi Kim. 2013. 'Novel cell-based assay reveals associations of circulating serum AhR-ligands with metabolic syndrome and mitochondrial dysfunction', *BioFactors*, 39: 494-504.
- Xiao, Wusheng, Jyungmean Son, Sabine U Vorrink, Frederick E Domann, and Prabhat C Goswami. 2015. 'Ligand-independent activation of aryl hydrocarbon receptor signaling in PCB3-quinone treated HaCaT human keratinocytes', *Toxicology letters*, 233: 258-66.
- Xing, Jin, Kangping Cui, Haiyan Tang, Wen-Jhy Lee, Lin-Chi Wang, Jinning Zhu, and Qianli Huang. 2017. 'Part II: PM2. 5 and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in the ambient air of northern China', *Aerosol Air Qual. Res*, 17: 2010-16.
- Yamamoto, Junko, Kenji Ihara, Hideki Nakayama, Shunji Hikino, Kazuo Satoh, Norio Kubo, Takao Iida, Yoshiaki Fujii, and Toshiro Hara. 2004. 'Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells', *Life sciences*, 74: 1039-49.
- Yang, Xinhai, Sandra Solomon, Lauren R Fraser, Anthony F Trombino, Donghui Liu, Gail E Sonenshein, Eli V Hestermann, and David H Sherr. 2008. 'Constitutive regulation of CYP1B1 by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in pre-malignant and malignant mammary tissue', *Journal of cellular biochemistry*, 104: 402-17.
- Yankner, Bruce A, Tao Lu, and Patrick Loerch. 2008. 'The aging brain', *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.*, 3: 41-66.
- Ye, Shi-Ming, and Rodney W Johnson. 1999. 'Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice', *Journal of neuroimmunology*, 93: 139-48.

- . 2001. 'An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice', *Neuroimmunomodulation*, 9: 183-92.
- Yusty, MA Lage, and JL Cortizo Davina. 2005. 'Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil', *Food Control*, 16: 59-64.
- Zack, J. A., and R. R. Suskind. 1980. 'The mortality experience of workers exposed to tetrachlorodibenzodioxin in a trichlorophenol process accident', *J Occup Med*, 22: 11-4.
- Zarruk, Juan G, David Fernández-López, Isaac García-Yébenes, María S García-Gutiérrez, José Vivancos, Florentino Nombela, Magdalena Torres, María C Burguete, Jorge Manzanares, and Ignacio Lizasoain. 2012. 'Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection', *Stroke*, 43: 211-19.
- Zelante, Teresa, Rossana G Iannitti, Cristina Cunha, Antonella De Luca, Gloria Giovannini, Giuseppe Pieraccini, Riccardo Zecchi, Carmen D'angelo, Cristina Massi-Benedetti, and Francesca Fallarino. 2013. 'Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22', *Immunity*, 39: 372-85.
- Zelinski, Elizabeth M, and Kerry P Burnight. 1997. 'Sixteen-year longitudinal and time lag changes in memory and cognition in older adults', *Psychology and aging*, 12: 503.
- Zhang, Cong, and Ana Maria Cuervo. 2008. 'Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function', *Nature medicine*, 14: 959.
- Zhang, Lina, Juan Ma, Masaru Takeuchi, Yoshihiko Usui, Takaaki Hattori, Yoko Okunuki, Naoyuki Yamakawa, Takeshi Kezuka, Masahiko Kuroda, and Hiroshi Goto. 2010. 'Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by inducing differentiation of regulatory T cells via activation of aryl hydrocarbon receptor', *Investigative ophthalmology & visual science*, 51: 2109-17.
- Zhu, Lihong, Hao Lu, Shuguang Chen, and Takashi Amagai. 2009. 'Pollution level, phase distribution and source analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in residential air in Hangzhou, China', *Journal of Hazardous Materials*, 162: 1165-70.
- Zhu, Shu, and Youcun Qian. 2012. 'IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential', *Clinical science*, 122: 487-511.
- Zuo, Hui, Per M Ueland, Arve Ulvik, Simone JPM Eussen, Stein E Vollset, Ottar Nygård, Øivind Midttun, Despoina Theofylaktopoulou, Klaus Meyer, and Grethe S Tell. 2016. 'Plasma biomarkers of inflammation, the kynurenine pathway, and risks of all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality: The Hordaland Health Study', *American journal of epidemiology*, 183: 249-58.