

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Fisiología



TESIS DOCTORAL

**Efectos del DHA con baja concentración de ácido fitánico en
un modelo experimental de la enfermedad de Alzheimer**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

M^a Belén Ruiz-Roso Guerra

Directores

**Natalia de las Heras Jiménez
Beatriz Martín Fernández
Baltasar Ruiz-Roso Calvo de Mora**

Madrid 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**EFFECTOS DEL DHA CON BAJA CONCENTRACIÓN DE
ÁCIDO FITÁNICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS DOCTORAL

**M^a BELÉN RUIZ-ROSO GUERRA
MADRID, 2017**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**EFECTOS DEL DHA CON BAJA CONCENTRACIÓN DE
ÁCIDO FITÁNICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Memoria presentada por M^a Belén Ruiz-Roso para optar al
grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Bajo la dirección de:

Dra. Natalia de las Heras Jiménez
Dra. Beatriz Martín Fernández
Dr. Baltasar Ruiz-Roso Calvo de Mora
Tutor: **Dr. Vicente Lahera Juliá**

Doctora Natalia de las Heras Jimenez, Profesora Contratada del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

Doctora Beatriz Martín Fernández, Profesora Asociada del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

Doctor Baltasar Ruiz-Roso Calvo de Mora, Profesor titular del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y

Doctor Vicente Lahera Juliá, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN

Que Dña. M^a Belén Ruiz-Roso Guerra ha realizado la tesis doctoral titulada: “EFECTOS DEL DHA CON BAJA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO FITÁNICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER” en el Dep Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, bajo su dirección, y que hallándose concluída, autorizan su defensa ante un Tribunal. Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid, a 15 de Noviembre de 2017.

Dra. Natalia de las Heras Jiménez

Dra. Beatriz Martín Fernández

Dr. Baltasar Ruiz-Roso Calvo de Mora

Dr. Vicente Lahera Juliá

A mis padres, abuelos y maestros,
pilar fundamental de todo lo que soy

Agradecimientos

La presente Tesis Doctoral es la culminación de varios años de investigación y trabajo continuo, que como todo proyecto, no tenía asegurado el éxito. Lo que sí era seguro, o al menos probable, era la aparición de las dificultades, las adversidades, los altos y bajos, las lecciones que aprender y los retos que superar. Por fortuna, este camino no lo he recorrido sola, y ante todo, tengo que dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante este periodo.

Con estas líneas quisiera además mostrar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo, fruto de su ayuda, tanto profesional como personal.

A mis directores de tesis por el apoyo constante y la confianza que han depositado en mí. Muchas gracias al Dr. Vicente Lahera, por haberme dado la oportunidad de unirme al grupo de investigación, por su ayuda inestimable, sus consejos y experiencia. A la Dra. Natalia de las Heras, por el esfuerzo y el tiempo invertido en este trabajo, por saber motivarme para hacer las cosas siempre mejor y por esos ratos de desconexión en las comidas. A la Dra. Beatriz Martín, por ser mi guía, por su dedicación, intenso trabajo e infinita paciencia.

A mis queridos compañeros y amigos, Elena, Adrián, Merche, Sandra, Gema, Raquel, Rocío, Ana y Roberto, con quienes he compartido los mejores y peores momentos de estos años. Debo agradecerles que a pesar de lo difícil del camino, han conseguido que sólo recuerde las risas, los cafés, la lotería, los congresos, las cervezas, las charlas en la azotea, las confidencias en cultivos... Y a Raúl, por amenizarme esas tardes con el HPLC. Un placer chicos! Sois los mejores.

A todo el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por su acogida y afecto, especialmente al Dr. Jesús A.F. Tresguerres, la Dra. Anabel Martín, la Dra. Victoria Cachofeiro, la Dra. Vatican, la Dra. Villanúa, y al Dr. Ricardo Gredilla, que siempre han estado dispuestos a ayudarme y a aconsejarme durante el trabajo diario, mostrándose accesible en todo momento para resolver las más variopintas cuestiones que han surgido a pie de laboratorio. También al Dr. López-Farré y al Dr. Zamorano-León. Avelina, Blanca, Virginia. Gracias a todos por vuestro apoyo.

Al Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universidad Complutense de Madrid. Al Dr. Jose Antonio López por su supervisión y tener siempre la puerta abierta para resolver dudas, atender quejas y solucionar problemas. Al Dr. Víctor Echeverry, por enseñarme tanto, por esos días eternos en el animalario con los test de comportamiento, y que me ha demostrado en todo momento ser más que un compañero, ser un amigo al que siempre podré recurrir. Como no mencionar a Javi y su banda de rock, y a Antonio, yeyu, por ser tan único, por su alegría característica y sus incansables ganas de fiesta (ese B12 mítico no se olvidará).

Especialmente quisiera mostrar mi gratitud y más sincero cariño al Departamento de Nutrición, Bromatología, Higiene y Seguridad Alimentaria de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. A la Dra. Lourdes Pérez-Olleros, la Dra. Ana Requejo y la Dra. Rosa Ortega, por su cercanía, acogida y afecto, dispuestas siempre a enseñarme y aconsejarme. Y a todos los profesores que he tenido en la Facultad de Farmacia, gracias.

A la empresa Natac Biotech S.L. y a su director José Carlos Quintela por habernos proporcionado el producto experimental que ha sido objeto de estudio en este trabajo.

A mi comunidad. Gracias a los catequistas, a Blanca, Najó, Raquel, Paloma, Luis, Flor, Dani, Olaya, Tony, Ana, Agustín, Pilar, Concha, Cris, Isidro, Quina y Don Manuel. No me quiero dejar a nadie. Muchas gracias por apoyarme tanto de forma incondicional, por escucharme y entenderme, por aguantar mis inseguridades, mis miedos, esos cantos con la guitarra, por abrirme vuestra casa y sobre todo por quererme tal y como soy.

A mis amigos, Cris, Contreras, Paloma, Lucía, Jorge, Christian, Ricardo, Bea, Blanca y María, así como, a Ignacio y a toda su familia. Mi total agradecimiento por escuchar estoicamente mis quejas, alegrías y entusiastas explicaciones de lo bueno que es comer pescado azul.

Les doy las gracias a mis hermanos, Rafa y Alberto que de tanto escucharme conocen mi trabajo mejor que yo. A mis abuelos Santiago, Teresa, Baltasar y Emilia. A mis tíos y primos. Gracias a todos.

Pero mi mayor agradecimiento se lo debo a mis padres, Baltasar y Teresa, por apoyarme siempre, por dejarlo todo por mí, por atreverse a dar la vida por sus hijos, y especialmente por enseñarme a luchar por lo que quiero, a hacer lo que debo hacer aunque no quiera, y a finalizar lo que he empezado. Sin ellos nunca habría terminado esta Tesis Doctoral.

*“Si os mantenéis en mi palabra
conoceréis la verdad, y la verdad os hará libres”*

(Jn 8, 31-38)

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	21
II. RESUMEN	27
III. SUMMARY	33
IV. INTRODUCCIÓN	39
1. Enfermedades neurodegenerativas.....	39
1.1. La Enfermedad de Alzheimer.....	40
2. Patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer.....	41
2.1. La hipótesis amiloidea.....	42
2.2. La proteína tau.....	47
2.3. La alteración de la homeostasis del calcio neuronal.....	48
2.4. El estrés oxidativo.....	49
2.5. La respuesta inflamatoria.....	54
2.6. Disfunción colinérgica.....	56
2.7. Componente genético de la Enfermedad de Alzheimer.....	58
2.7.1. La Apolipoproteína E.....	60
2.7.2. Acciones de la Apolipoproteína E	61
2.8. Alteraciones cerebrovasculares en la enfermedad de Alzheimer	62
2.8.1. Alteraciones del metabolismo lipídico.....	64
3. El ratón ApoE ^{-/-} como modelo de la Enfermedad de Alzheimer	65
4. Tratamientos de la Enfermedad de Alzheimer	66
5. El ácido docosahexaenoico	67
5.1. El DHA en el sistema nervioso central	69
5.2. El DHA y su papel en la Enfermedad de Alzheimer	70
5.2.1. El DHA y su efecto en la cascada amiloidea	71
5.2.2. El DHA y su protección frente a la inflamación y el estrés oxidativo	71
5.2.3. El DHA y la función cognitiva.....	72
5.2.4. El DHA y las alteraciones cerebrovasculares	73
6. El ácido fitánico.....	74
6.1. Efectos neurotóxicos del ácido fitánico	76

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 81

7. Hipótesis	81
8. Objetivos	81
8.1. Objetivo general	81
8.2. Objetivos específicos	82

VI. MATERIAL Y MÉTODOS 87

9. Modelo experimental animal	87
9.1. Diseño experimental	87
9.2. Formulación y elaboración de las dietas	88
9.3. Alojamiento y manipulación	91
9.4. Estudios conductuales	91
9.4.1. Laberinto acuático de Morris	92
9.4.2. Test de campo abierto	94
9.4.3. Test de natación forzada	95
9.4.4. Test de suspensión por la cola	96
9.5. Extracción y conservación de las muestras	96
9.6. Perfil lipídico, glucosa e insulina séricos	97
9.7. Actividad de la β -secretasa BACE-1	98
10. Modelo experimental celular	99
10.1. Línea celular y condiciones de cultivo	99
10.2. Ensayos celulares	101
10.3. Metodología experimental	103
10.3.1. Supervivencia celular	103
10.3.2. Producción de anión superóxido	104
11. Estudio de la expresión proteica	105
11.1. Extracción de proteínas del hipocampo	105
11.2. Extracción de proteínas de las células Bv-2	106
11.3. Cuantificación de proteínas	107
11.4. Electroforesis y transferencia	107
11.5. Western blot	110
12. Análisis estadístico	111

VII. RESULTADOS 115

13. Efectos del DHA con baja concentración de AF en ratones ApoE ^{-/-} como modelo experimental de la Enfermedad de Alzheimer	115
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

13.1. Efectos del DHA+AF 50 sobre las alteraciones cognitivas en comparación con el DHA+AF 1000 en ratones ApoE ^{-/-}	115
13.1.1. Laberinto acuático de Morris.....	115
13.1.2. Test de campo abierto.....	119
13.1.3. Test de natación forzada y de suspensión por la cola	120
13.2. Efectos del DHA+AF 50 sobre el peso corporal de los ratones ApoE ^{-/-}	122
13.3. Efectos del DHA+AF 50 sobre las concentraciones séricas de lípidos en ratones ApoE ^{-/-}	123
13.4. Efectos del DHA+AF 50 sobre las concentraciones séricas de glucosa, insulina e índice Homa.....	124
13.5. Efectos del DHA+AF 50 sobre la actividad enzimática de la BACE-1 en el hipocampo de ratones ApoE ^{-/-}	125
13.6. Efectos del DHA+AF 50 sobre la expresión proteica de los biomarcadores de las alteraciones producidas en el hipocampo de ratones ApoE ^{-/-} como modelo de la Enfermedad de Alzheimer.....	126
13.6.1. Péptido β- amiloide y proteína precursora.....	126
13.6.2. Proteína tau total y tau fosforilada.....	127
13.6.3. Quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II.....	129
13.6.4. Factor neurotrófico derivado del cerebro	129
13.6.5. Interleuquina-6 y factor de necrosis tumoral-α	130
13.6.6. Óxido nítrico sintasa inducible.....	131
13.6.7. Subunidad p22-phox de la NADPH oxidasa.....	132
13.6.8. Superóxido dismutasa 1	133
13.6.9. Glutación peroxidasa y glutatión reductasa.....	134
13.6.10. Catalasa.....	135
13.6.11. Caspasa-3.....	136

14. Efectos de la incubación con DHA y concentraciones crecientes de af en la microglía activada de ratón	137
14.1. Supervivencia celular	137
14.2. Producción de anión superóxido.....	138
14.3. Efectos del DHA+AF 50, DHA+AF 100 Y DHA+AF 500 sobre la expresión proteica microglial de biomarcadores de neurodegeneración	140
14.3.1. Factor neurotrófico derivado del cerebro	140
14.3.2. Interleuquina-6, factor de necrosis tumoral-α y ciclooxigenasa 2	141
14.3.3. Óxido nítrico sintasa inducible.....	143
14.3.4. Subunidad p22phox de la NADPH oxidasa	144
14.3.5. Superoxido dismutasa 1	145
14.3.6. Glutación peroxidasa.....	146
14.3.7. Glutatión reductasa	147
14.3.8. Caspasa-3.....	148

VIII. DISCUSIÓN 153

15. El DHA+AF 50 mejora las alteraciones cognitivas en comparación con el DHA+AF 1000 en ratones ApoE ^{-/-}	153
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

15.1. El DHA+AF 50 mejoró la memoria y el aprendizaje de los ratones ApoE ^{-/-} comparado con el DHA+AF 1000	153
15.2. El DHA+AF 50 no modificó la actividad locomotora espontánea en ratones ApoE ^{-/-}	157
15.3. El DHA+AF 50 mejoró el estado de ansiedad, depresión y aprendizaje comparado con el DHA+AF 1000 en ratones ApoE ^{-/-}	158
16. El DHA+AF 50 mejora el perfil lipídico en ratones ApoE ^{-/-}	160
17. El DHA+AF 50 redujo la amiloidogénesis en el hipocampo de los ratones ApoE ^{-/-} comparado con el DHA+AF 1000	163
18. El DHA+AF 50 aumenta la expresión del BDNF en el hipocampo de los ratones ApoE ^{-/-} y en cultivos de microglía activada comparado con el DHA+AF 1000.....	165
19. El DHA+AF 50 reduce la hiperfosforilación de la proteína tau en el hipocampo de los ratones ApoE ^{-/-} comparado con el DHA+AF 1000	168
20. El DHA+AF 50 reduce la inflamación en el hipocampo de los ratones ApoE ^{-/-} y en cultivos de microglía activada comparado con el DHA+AF 1000	171
21. El DHA+AF 50 reduce el estrés oxidativo en el hipocampo de los ratones ApoE ^{-/-} y en cultivos de microglía activada comparado con el DHA+AF 1000	174
22. El DHA+AF 50 reduce la apoptosis en el hipocampo de los ratones ApoE ^{-/-} y en cultivos de microglía activada comparado con el DHA+AF 1000	178
IX. RESUMEN DE LOS RESULTADOS	185
X. CONCLUSIONES	191
XI. BIBLIOGRAFÍA	195



I. ABBREVIATURAS

Aβ : Péptido β -amiloide	BDNF : Factor neurotrófico derivado del cerebro
AA : Ácido araquidónico	BHE : Barrera hematoencefálica
Ach : Acetilcolina	BSA : Albúmina de suero bovino
ADN : Ácido desoxirribonucleico	Bv-2 : Línea celular de microglía de ratón
AD : Alzheimer's disease	CaMKII : Calcio/calmodulina proteína quinasa II
ADP : Adenosindifosfato	GAPDH : Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
AF : Ácido fitánico	Cas-3 : Caspasa-3
AG : Ácido graso	Cas-9 : Caspasa-9
AGPI : Ácido graso poliinsaturado	CHME 3 : Línea celular de microglía humana
AGPI n-3 : Ácido graso poliinsaturado omega 3	CoT : Colesterol total
AGPI n-6 : Ácido graso poliinsaturado omega	COX-2 : Ciclooxygenasa 2
AICD : Dominio intracelular de APP	DHA : Ácido docosahexaenoico
Akt : Proteinquinasa B	DHCR7 : 7-dehidrocolesterol-reductasa
ALA : Ácido α -linolénico	DHCR24 : 24-dehidroxicolesterol-reductasa
ApoE : Apolipoproteína E	DHE : Dihidroetidio
ApoER2 : Receptor APOE 2	DMSO : dimetil sulfóxido
APP : Proteína precursora del péptido β -amiloide	DPA : Ácido docosapentaenoico
ARN : Ácido ribonucleico	DR6 : Receptor de muerte neuronal 6
ATP : Adenosintrifosfato	DTT : Ditiotreitól
BACE : (β -site APP cleaving enzyme)	EA : Enfermedad de Alzheimer
BACE-1 : β secretasa 1	
BACE-2 : β -secretasa 2	

EAE: Enfermedad de Alzheimer esporádica	iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
EAF: Enfermedad de Alzheimer familiar	IP3: Inositol trifosfato
ECA 1: Enzima convertidora de la angiotensina 1	JNK: c-jun quinasa N-terminal
EDI: enzima degradadora de insulina	ISF: Intersticial del cerebro
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	LA: Ácido linoléico
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial	LCR: Líquido cefaloraquídeo
EPA: Ácido eicosapentaenoico	LDL: Lipoproteína de baja densidad
ERN: Especies reactivas de nitrógeno	LDL-col: Colesterol LDL
EROs: Especies reactivas de oxígeno	LDLox: Colesterol LDL oxidado
FBS: Suero bovino fetal	LDLR: Receptores de lipoproteína de baja densidad
GPx: Glutation peroxidasa	LOX: Lipoxigenasa
GRd: Glutation reductasa	LPS: Lipopolisacárido
GSK 3β: Glucógeno sintasa quinasa 3β	LRP: Receptor de LDL
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno	LTP: Potenciación a largo plazo
HDL: Lipoproteína de alta densidad	MAPK/ERK: Proteínquinasa activada por mitógenos
HDL-col: Colesterol HDL	MDA: Malondialdehído
HDL: Lipoproteína de alta densidad	MMP-9: Metaloproteínasa-9
HNE: 4-hidroxinoneal	n-3: Omega 3
IDL: Lipoproteína de densidad intermedia	n-6: Omega 6
IDL-col: Colesterol IDL	NaCl: Cloruro sódico
Ig G: Inmunoglobulina G	NF-κB: Factor de transcripción nuclear kappa B
IL-6: Interleuquina 6	NGF: Factor de crecimiento nervioso
IL-8: Interleuquina 8	NMDA: N-metil-D-aspartato receptores ionotrópicos de glutamato

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOX: NADPH-oxidasa

NPD 1: Neuroprotectina D1

O₂⁻: Anión superóxido

OMS: Organización Mundial de la Salud

P22phox: Subunidad p22phox de la NADPH oxidasa

PBS: Tampón fosfato salino

PC: fosfatidilcolina

PE: Fosfatidiletanolamina

PhA: Phytanic acid

PKA: Proteínquinasa-A

PKB : Proteinquinasa B

PPAR: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas

PPAR α : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo α

PPAR γ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo γ

ppm: Partes por millón

PS: Fosfatidilserina

PSEN: Presenilinas

PSEN: Presenilina tipo 1

P-tau: Proteína tau fosforilada

PVDF: polivinildifluoruro

RAR: Receptor de ácido retinoico

RXR: Receptor de retinoides X

sAPP: proteína precursora amiloide soluble

sAPP α : proteína precursora amiloide soluble tipo α

sAPP β : proteína precursora amiloide soluble tipo β

SDS: dodecilsulfato sódico

SNC: Sistema nervioso central

SOD 1: Superoxido dismutasa 1

SPMs: Mediadores pro-resolución de la inflamación específicos

STX-3: Syntaxina-3

TBHQ: Terbutil hidroquinona

TG: Triglicérido

TMB: 3,3',5,5'-terametilbenzidina

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNF- α : Factor de necrosis tumoral tipo alfa

VLDL-col: Colesterol VLDL

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad



II. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa de mayor incidencia y la primera causa de demencia en el mundo. La búsqueda de tratamientos eficaces frente a la aparición y el avance de esta patología requiere la búsqueda de nuevas perspectivas terapéuticas. Numerosos estudios experimentales apuntan al ácido docosahexaenoico (DHA) como posible protector de la función cerebral y el proceso neurodegenerativo. Sin embargo, los ensayos clínicos con suplementos de DHA utilizados para la prevención o el tratamiento de la EA no han sido concluyentes. Esta falta de resultados positivos podría deberse en parte, a que los suplementos de DHA utilizados contienen cantidades elevadas de ácido fitánico (AF), un ácido graso con un potente efecto neurotóxico. Por lo tanto, nuestro objetivo fue comparar los efectos neuroprotectores de un DHA con bajo contenido de AF, frente a un DHA con una concentración mayor de AF, en ratones ApoE^{-/-} y en cultivos de células microgliales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar el estudio se utilizaron 27 ratones macho ApoE^{-/-}, como modelo de la EA, que dividimos en tres grupos (n=9): i) ApoE^{-/-}, alimentados con una dieta rica en grasa; ii) ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, alimentados con la dieta rica en grasa enriquecida con 100g de DHA/Kg de grasa y menos de 50 ppm de AF, y iii) ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, alimentados con la dieta rica en grasa enriquecida con 100g de DHA/Kg de grasa y 1000 ppm de AF. Como animales control se utilizaron 27 ratones C57BL/6 distribuidos en tres grupos (n=9): i) Control, alimentados con dieta normal (AIN-93G); ii) DHA+AF 50, alimentados con dieta normal (AIN-93G) enriquecida con 100g de DHA/Kg de grasa y menos de 50 ppm de AF, y iii)

DHA+AF 1000, alimentados con dieta normal (AIN-93G) enriquecida con 100g de DHA/kg de grasa y 1000 ppm de AF. Tras 6 semanas de evolución, se determinaron los perfiles cognitivos y conductuales de los ratones mediante la prueba de campo abierto, el laberinto acuático de Morris, la prueba de natación forzada y la prueba de suspensión. Tras el periodo experimental de 10 semanas, se aisló el hipocampo de los ratones para determinar la actividad de la β -secretasa BACE-1 mediante fluorescencia, y la expresión proteica mediante *western blot* de: marcadores de amiloidogénesis (APP y péptido A β), taupatía (tau total, p-tau y CAMK II), inflamación (IL-6, TNF- α e iNOS), oxidación y anti-oxidación (subunidad p22phox de la NADPH oxidasa, SOD 1, GPx, GRd y catalasa), apoptosis (caspasa-3), y el factor de neuroprotección BDNF.

En estudios adicionales, se utilizaron cultivos de células Bv-2 de microglía de ratón, activadas con 0.1 μ g/ml LPS ó 0.8 mM H₂O₂, y co-incubadas durante 24 horas con DHA 5 μ M y tres concentraciones de AF: 50 ppm, 100 ppm ó 500 ppm. En estos cultivos se valoraron: la supervivencia celular, la producción de anión superóxido y la expresión proteica mediante *western blot* de marcadores de inflamación (IL-6, COX-2, TNF- α e iNOS), oxidación y anti-oxidación (subunidad p22phox, SOD 1, GPx, GRd y catalasa), apoptosis (caspasa-3), y el factor de neuroprotección BDNF.

RESULTADOS

Los ratones ApoE^{-/-} mostraron una menor capacidad de aprendizaje y de memoria espacial en comparación con el grupo Control. Estos parámetros mejoraron en los ratones ApoE^{-/-} alimentados con un DHA bajo en AF en comparación con el grupo

ApoE^{-/-}. Sin embargo, no sucedió así cuando se utiliza un DHA con un nivel elevado de AF.

La actividad de la BACE-1 fue mayor significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, en comparación con el resto de grupos experimentales, que no mostraron ninguna variación. En el grupo ApoE^{-/-}, la expresión proteica hipocampal de la APP, del péptido A β , la proteína p-tau^s, la enzima CAMK II, la IL-6, del TNF- α , la iNOS, la subunidad p22phox, la SOD 1, la GPx, la GRd, la catalasa, la caspasa-3 y la relación tau total/p-tau, aumentaron respecto al grupo Control (p<0.05) y disminuyeron en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, en comparación con el grupo ApoE^{-/-}. Por el contrario, la expresión proteica de estos biomarcadores aumentaron en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 frente al grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 (p<0.05), excepto iNOS, GRd y la subunidad p22phox, que no se modificaron con la administración de DHA con mayor concentración de AF. La expresión proteica del factor BDNF disminuyó en el hipocampo de ratones ApoE^{-/-} respecto al Control (p<0.05), y aumentó en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 comparado con el grupo ApoE^{-/-} (p<0.05), pero disminuyó en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 respecto al grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 (p<0.05).

La expresión proteica de la IL-6, el TNF- α , la COX-2, la iNOS, la caspasa-3, la subunidad p22phox, la SOD 1, la catalasa, la GPx y la GRd aumentaron en células de microglía activadas, mientras que disminuyeron la supervivencia celular y la expresión proteica del BDNF, respecto al grupo Control (p<0.05). El DHA con 50 ppm de AF previno significativamente los efectos producidos por el LPS o el H₂O₂ en todos los parámetros estudiados. El aumento de la concentración de AF incrementó la producción del anión superóxido, de la expresión proteica de la COX-2 y de la subunidad p22phox en cultivos de microglía activadas frente al

Control ($p < 0.05$). La expresión proteica de la IL-6, el TNF- α y la iNOS, en estos grupos co-incubados con DHA y 100 ó 500ppm presentó tendencia a aumentar en comparación con los grupos co-incubados con DHA y 50 ppm de AF. En cambio, la expresión proteica de la caspasa-3, la SOD 1, la catalasa, la GPx y la GRd, no se vieron modificadas con la incubación de DHA, independientemente de la concentración de AF.

CONCLUSIONES

La administración de un DHA con baja concentración de AF redujo significativamente el deterioro cognitivo, la amiloidogénesis, la hiperfosforilación de la proteína tau, la inflamación y el estrés oxidativo, en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}, en comparación con el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000. Así mismo, el DHA de bajo contenido en AF aumentó la supervivencia celular y redujo el proceso inflamatorio, la activación microglial y el estrés oxidativo, en cultivos de microglía Bv-2 activada, en comparación con un DHA con mayor concentración de AF. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, se podría proponer que la cantidad elevada de AF en los suplementos de DHA podría ser causa de los resultados poco concluyentes obtenidos en los ensayos clínicos previos. Por ello, la realización de nuevos ensayos clínicos con un DHA de bajo contenido en AF, podría ofrecer nuevas perspectivas en la prevención y/o el tratamiento de la EA.



III. SUMMARY

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disease and the leading cause of dementia in the world. The search for effective treatments requires new therapeutic approaches. Numerous studies have shown that docosahexaenoic acid (DHA) may protect cognitive function and slow the neurodegenerative process. However, clinical trials with DHA supplements used for the prevention or treatment of AD have not been conclusive. The lack of positive results could be due in part to the fact that the DHA supplements used contain elevated quantities of phytanic acid (PhA), a fatty acid with a strong neurotoxic effect. Therefore, our objective was to compare the neuroprotective effects of low and higher PhA-concentrated DHAs in ApoE^{-/-} mice and microglial cell cultures.

METHODS

The study was conducted using 27 male ApoE^{-/-} mice as an AD model, divided into three groups (n=9): i) ApoE^{-/-}, fed a high fat diet; ii) ApoE^{-/-}+DHA+PhA 50, fed a high fat diet with 100g of DHA/kg of fat and less than 50 ppm of PhA; and iii) ApoE^{-/-}+DHA+PhA 1000, fed a high fat diet with 100g of DHA/kg of fat and less than 1000 ppm of PhA. As control animals, 27 wild-type C57BL/6 mice were used and distributed in three groups (n = 9): i) Control, fed normal diet (AIN-93G); ii) DHA+PhA 50, fed normal diet (AIN-93G) with 100g of DHA/kg fat and less than 50 ppm of PhA; and iii) DHA+PhA 1000, fed with normal diet (AIN-93G) with 100g of DHA/kg fat and 1000 ppm of PhA.

After six weeks of study, the cognitive and behavioral profiles were determined using the open-field test, Morris water maze, forced swimming test and tail suspension test. At the end of the 10-week experimental period, the mice's

hippocampus was isolated to determine β -secretase activity by fluorescence and protein expression by western blot of the following markers: amyloid factors (APP and A β peptide), taupathy markers (total tau, p-tau and CAMK II), pro-inflammatory factors (IL-6, TNF- α and iNOS), pro-oxidant and anti-oxidant factors (NADPH oxidase subunit p22phox, SOD 1, GPx, GRd and catalase), apoptosis marker (caspase-3), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

In additional experiments, Bv-2 microglial cell cultures were activated with 0.1 μ g/ml LPS or 0.8 mM H₂O₂, and co-incubated for 24 hours with DHA+PhA 50, DHA+PhA 100 or DHA+PhA 500. Expression of the following markers were analyzed: cell viability, superoxide anion production and protein expression by western blot of pro-inflammatory factors (IL-6, COX-2, TNF- α and iNOS), oxidation and anti-oxidation markers (NADPH oxidase subunit p22phox, SOD 1, GPx, GRd and catalase), an apoptotic marker (caspase-3), and BDNF.

RESULTS

ApoE^{-/-} mice demonstrated a decreased capacity for learning and spatial memory than the control group. These parameters improved in ApoE^{-/-} mice fed a low PhA-concentrated DHA as compared to the ApoE^{-/-} group. However, this did not happen when a DHA with a elevated level of PhA was used.

The β -secretase activity was significantly higher in the hippocampus of ApoE^{-/-}+DHA+PhA 1000 mice, in comparison with the rest of the experimental groups, which did not show any variation. Hippocampal protein expression of APP, A β , p-tau, total tau/p-tau ratio, CAMK II, IL-6, TNF- α , iNOS, p22phox subunit of NADPH oxidase, SOD 1, GPx, GRd, catalase and caspase-3 increased in the ApoE^{-/-} group, compared to control group (p <0.05), and decreased in the ApoE^{-/-}+DHA+PhA 50 group, compared to the ApoE^{-/-} group. In contrast, protein expression of these

biomarkers increased in the hippocampus of ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 mice, compared to ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 group (p <0.05), whereas iNOS, GRd and p22phox protein expression were not modified with the higher PhA-concentrated DHA. BDNF protein expression decreased in the hippocampus of ApoE^{-/-} mice, compared to the control group (p <0.05), increased in the ApoE^{-/-}+DHA+PhA 50 group, compared with ApoE^{-/-} group (p <0.05), but decreased in ApoE^{-/-}+DHA+PhA 1000 group, compared to the ApoE^{-/-}+DHA+PhA 50 group (p <0.05).

IL-6, TNF- α , COX-2, iNOS, caspase-3, p22phox, SOD 1, catalase, GPx and GRd protein expression increased in activated microglial cell cultures, while cell viability and BDNF protein expression decreased, compared to the control group (p <0.05). DHA+PhA 50 significantly prevented the LPS or H₂O₂ effects in all parameters studied. The higher PhA concentration showed an increase in superoxide anion production and COX-2 and p22phox protein expression in activated microglial cultures, compared to control group (p <0.05). There was also a tendency to increase IL-6, TNF- α and iNOS protein expression, in these groups co-incubated with DHA+PhA 100 and DHA+PhA 500, compared to the groups co-incubated with DHA+PhA 50. In contrast, caspase-3, SOD 1, catalase, GPx and GRd protein expression were not modified by the incubation of DHA, regardless of PhA concentration.

CONCLUSIONS

Low PhA-concentrated DHA significantly reduced cognitive deterioration, amyloid genesis, tau protein hyperphosphorylation, inflammation, and oxidative stress in the hippocampus of ApoE^{-/-} mice, compared to ApoE^{-/-}+DHA+PhA 1000 group. It also increased cell survival and reduced the inflammatory process, microglial activation, and oxidative stress in activated Bv-2 microglial cultures, compared

with higher PhA-concentrated DHA. Based on this study's results, it could be proposed that the high amount of PhA in the DHA supplements could be the cause of inconclusive results in previous clinical trials. Therefore, carrying out new clinical trials with a low PhA-concentrated DHA could offer new outlooks in prevention and/or treatment of AD.

IV. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades neurodegenerativas

A lo largo del siglo XX, la esperanza de vida al nacer ha sufrido un gran aumento en todo el mundo y principalmente en países industrializados, donde se ha duplicado. Este aumento se debe a los continuos avances científicos y técnicos, junto con una mejora en la alimentación, las condiciones higiénicas, el acceso al agua potable y el control de las enfermedades infecciosas, entre otros (Garcés y col. 2016). Sin embargo, la mortalidad debida a patologías degenerativas está aumentando significativamente (García González, 2014). Entre las enfermedades degenerativas con una morbimortalidad creciente, tienen especial relevancia las neurodegenerativas, que se desarrollan como consecuencia de diferentes anomalías en el procesamiento de algunas proteínas que intervienen en el ciclo celular. Estas proteínas terminan acumulándose en el sistema nervioso central (SNC), alterando de esta forma la función de las neuronas y produciendo numerosas manifestaciones clínicas, principalmente la demencia (Guerreiro R., 2014; Garcés y col., 2016, Scheltens y col., 2016).

La demencia es una característica común en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas, que conlleva una pérdida importante de capacidad cognitiva e impide la realización de manera satisfactoria de las actividades de la vida cotidiana (Sato y Morishita, 2015; Ransohoff, 2016; Scheltens y col., 2016). La pérdida de capacidad cognitiva más común que se presenta en los ancianos es la pérdida de la memoria (amnesia), la manifiesta el 10% de las personas mayores de 70 años y del 20 al 40% de los mayores de 85 años (Seeley y Mille, 2012). Además de la amnesia, se observan alteraciones de la memoria espacial, del aprendizaje, de los juicios de valor y resolución de problemas (Garcés y col. 2016). En muchos tipos de demencia

también se identifican déficits neuropsiquiátricos y sociales, que culminan en depresión, apatía, alucinaciones, delirios, agitación e insomnio (Seeley y Mille, 2012).

En diciembre de 2013, los estados que forman el G8 manifestaron que la demencia como consecuencia de procesos neurodegenerativos sería una línea prioritaria de investigación. Su objetivo es conseguir una terapia farmacológica eficaz antes del año 2025, para al menos paliar las consecuencias sociales, el impacto físico, psíquico y emocional que tienen para los enfermos que las padecen y sus familias, así como los efectos colaterales negativos en su esperanza y calidad de vida, y sus consecuencias sanitarias y económicas (Scheltens y col., 2016). Las patologías neurodegenerativas con mayor prevalencia son: la enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades neuromusculares (Garcés y col., 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el año 2017 hay más de 30 millones de pacientes en el mundo con Alzheimer, duplicándose esta cifra cada cinco años.

1.1. La Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer lleva el nombre del médico alemán Alois Alzheimer, que la describió por primera vez en 1906 (Alzheimer A., 1906), y es la causa principal de demencia en el mundo suponiendo el 80% de los casos y uno de los grandes retos de la salud en el siglo XXI (Scheltens y col., 2016).

La demencia de tipo Alzheimer es un proceso neurodegenerativo que afecta las áreas cerebrales involucradas en los procesos de memoria, comportamiento y conducta de los seres humanos y por tanto, se caracteriza por la pérdida progresiva

de la memoria y de las capacidades cognitivas, comenzando por una amnesia retrógrada y pudiendo llegar en última instancia, a la muerte (Citron M., 2002).

El factor de riesgo principal es la edad, afectando habitualmente a personas por encima de los 65 años. Sus primeros síntomas suelen estar relacionados con pérdidas de memoria, progresando gradualmente hasta la incapacidad completa. Además, lleva implícitos otros síntomas como son la dificultad de resolver problemas o completar tareas domésticas cotidianas, cometer errores semánticos al hablar o tomar decisiones equivocadas, así como cambios en el carácter y en la personalidad (Garcés y col., 2016). Actualmente no hay un tratamiento eficaz, pero existe medicación cada vez más efectiva para ralentizar su evolución y reducir sus síntomas (Lee y col., 2016).

La EA se manifiesta tras un largo período subclínico que dura varias décadas, lo que plantea la cuestión de que si los cambios patológicos desarrollados a lo largo de la vida, o poco antes de la aparición de síntomas clínicos, son el resultado o la causa de la patología (Norton y col., 2014). Muchos factores relacionados con el estilo de vida incluyendo la inactividad física y mental, el tabaquismo, el bajo nivel educativo y la dieta, además de factores de riesgo como la diabetes, la depresión y la obesidad, tienen un papel relevante en la aparición de la demencia (Arbonés y col., 2003).

2. Patogénesis de la enfermedad de Alzheimer

Los efectos fisiopatológicos de la EA están caracterizados por una atrofia irreversible progresiva y bilateral del volumen cerebral (Du H. y col., 2012). Esto es debido a la aparición de una degeneración neuronal selectiva, con bajos niveles de

algunos neurotransmisores, como la acetilcolina (Ach) (Nussbaum y col., 2003). La degeneración neuronal comienza en regiones mesiales temporales, particularmente en el hipocampo, y más tarde afecta al neocórtex prefrontal; ambas áreas del cerebro asociadas a la cognición y la memoria (Blennow K. y col., 2006).

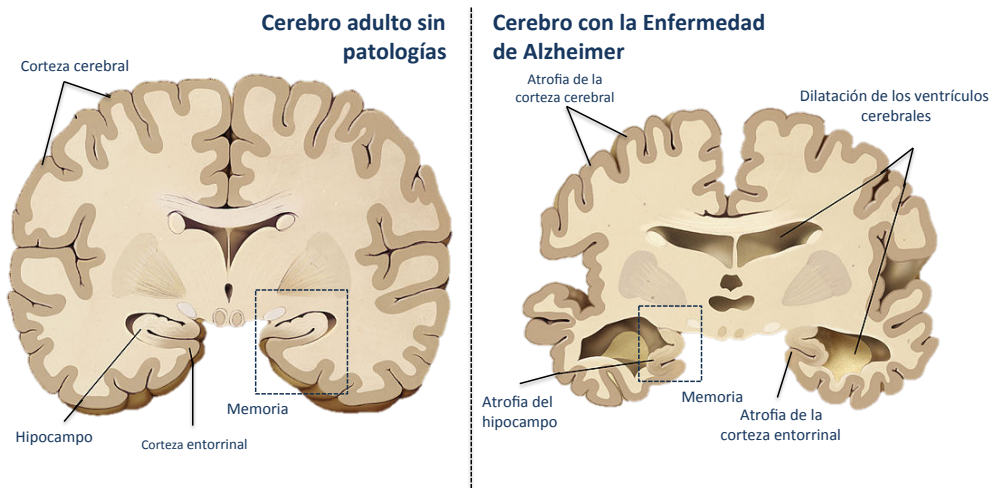


Figura 1. Esquema representativo de un cerebro sano, a la izquierda, y un cerebro afectado por la Enfermedad de Alzheimer en un estadio avanzado, a la derecha, con una atrofia extrema en el hipocampo, corteza y un recrecimiento de los ventrículos cerebrales.

A nivel histopatológico, este proceso de destrucción de las neuronas se asocia a la aparición tanto de depósitos insolubles extracelulares (placas amiloideas) como intracelulares, que se describen a continuación (Selkoe, 1999; Evin y Weidemann, 2002). En pacientes con EA son evidentes además, los procesos inflamatorios (Akiyama H. y col., 2005; Wyss-Coray T. y col., 2006), el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial (Christen Y., 2000; Sayre LM y col. 2007) y la aparición de gliosis reactiva (Canning y col., 1993; Xinyi y col., 2011).

2.1. La hipótesis amiloidea

Alois Alzheimer demostró por primera vez una relación entre los cambios específicos cognitivos, las lesiones neurológicas en el cerebro humano y la historia

clínica de los pacientes con esta patología (Alzheimer A., 1907). Años después, la hipótesis amiloidea atribuye estas observaciones a la formación de depósitos insolubles extraneuronales, que están formados por prolongaciones neurales distróficas y degeneradas, microglía y astrocitos reactivos, pero principalmente por el péptido beta-amiloide (A β), un producto derivado del catabolismo de la proteína precursora del péptido beta-amiloide (APP) (Glenner y Wong, 1984).

- **El péptido beta-amiloide:** es un péptido con un peso molecular de 4 kDa y una secuencia proteica primaria de 40 a 43 aminoácidos, que puede seguir una ruta secretora en su formación (retículo endoplasmático, aparato de Golgi y endosomas), o bien se puede introducir en las células a través de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR). El monómero A β es inocuo, pero puede asociarse en dímeros y oligómeros, que son estructuras estables, solubles y neurotóxicas (Klementieva y col., 2017). Además, estos monómeros, dímeros y oligómeros de A β , pueden también formar fibrillas, unos depósitos insolubles extraneuronales y neurotóxicos en diversas áreas del cerebro, que se depositan formando las placas A β o placas seniles (Selkoe, 1999; Evin y Weidemann, 2002). Éstas inducen localmente la activación microglial, la liberación de citoquinas, astrocitosis reactiva y una respuesta inflamatoria exacerbada (Canning y col., 1993; Akiyama H y col., 2005; Wyss-Coray T. y col., 2006; Xinyi Li y col., 2011; Barage y Sonawane, 2015). Además, producen cambios bioquímicos y estructurales en los axones, dendritas y cuerpos celulares neuronales, que se caracterizan por pérdidas de sinapsis, muerte de neuronas y atrofia cerebral (Du H. y col., 2012).

Se distinguen tres tipos principales de placas seniles: las *placas difusas* (se trata de depósitos de amiloide no fibrilar que no alteran el neuropilo ni inducen una

respuesta glial, por lo que no suelen acarrear un deterioro cognitivo), las *placas amiloideas*, con un centro más o menos denso y las *placas compactas o neuríticas*, de naturaleza tóxica y características de la EA. Estas dos últimas están formadas por el péptido A β principalmente y una acumulación de astrocitos reactivos y microglía activada (Barage y Sonawane, 2015).

El aumento de la concentración cerebral del péptido A β , precede al deterioro clínico, surgiendo 20 años antes de la manifestación de los síntomas (Sperling y col., 2011). Su presencia se correlaciona con la pérdida de conexiones sinápticas en la EA (Lue y col., 1999), afectando principalmente al lóbulo temporal medial, concretamente al hipocampo y la corteza entorrinal, que juegan un papel fundamental en la formación y consolidación de la memoria autobiográfica, declarativa, episódica y en particular la memoria espacial y la orientación (Nussbaum y col., 2003; Blennow y col., 2006; Garcés y col., 2016; Klementieva y col., 2017).

La acumulación del A β , es debida al desequilibrio entre los procesos de formación y de eliminación de los productos de escisión de la APP en el cerebro (Hardy y Selkoe, 2002). La concentración del A β está estrechamente regulada por enzimas degradadoras como la neprilisina, la enzima degradadora de insulina (EDI), la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA1) y el proceso de endocitosis mediado por las células microgliales presentes en la barrera hematoencefálica (BHE), uno de los mecanismos más importantes en la eliminación de este péptido.

También, el receptor LDLR regula el aclaramiento del péptido A β (entre un 10 y un 15%), mediante el transporte del péptido desde el cerebro al líquido intersticial cerebral, luego es transferido al líquido cefalorraquídeo (LCR) y finalmente al torrente sanguíneo a través de la BHE. En este proceso participan dos ligandos: la

Apolipoproteína E (ApoE) y la α 2-macroglobulina (Xinyi Li y Buxbaum, 2011). La tasa de producción y de aclaramiento de A β son 7,6% y 8,3%, respectivamente en cerebros humanos adultos (Bateman y col., 2011). Por lo tanto, una reducción incluso pequeña en la velocidad de aclaramiento de A β , así como un aumento en su producción, darían lugar a su acumulación patológica.

- **La proteína precursora del péptido beta-amiloide:** La APP es una glucoproteína transmembrana de tipo I que actúa como molécula de adhesión intercelular en la formación de sinapsis en el SNC, en la unión neuromuscular y en la migración de los precursores neuronales hacia la corteza cerebral (Kang y col., 1987; Hardy y Selkoe, 2002). La APP posee un dominio extra citoplasmático que interactúa con varios ligandos, para después translocalizarse al núcleo e intervenir en la señalización de rutas que intervienen en la adhesión celular y la plasticidad sináptica. Presenta además varias isoformas, y de acuerdo con su patrón de escisión o procesamiento proteolítico, la vía no amiloidogénica o la vía amiloidogénica, da lugar a diferentes péptidos (Perl, 2010) (Figura 1).

- Vía no amiloidogénica: la APP se escinde por α -secretasas dando lugar a la forma soluble de APP (sAPP α), que es desprendida de la membrana al espacio extracelular. Un fragmento carboxi-terminal de 83 carbonos (C83), que queda unido a la membrana neuronal, es escindido por la γ -secretasa unida a la presenilina 1, por el sitio γ (Weidemann y col. 2002). El sAPP α no forma agregados y tiene varias propiedades neuroprotectoras (Selkoe y Schenk, 2003); parece estar implicado en el desarrollo del sistema nervioso, favorece la sinaptogénesis, la formación de la memoria y la disponibilidad neuroprotectora frente a estímulos excitotóxicos y daño oxidativo.

- Vía amiloidogénica: la APP se escinde en el sitio β por la enzima β -secretasa generando un fragmento soluble extracelular (sAPP β) y un fragmento de membrana carboxi-terminal de 99 carbonos (C99). Los dos enzimas capaces de escindir APP en el sitio β son BACE 1 (*β -site APP-cleaving enzyme-1*) y BACE 2 (*β -site APP-cleaving enzyme-2*) (Dingwall, 2001), siendo BACE 1 la principal responsable de la generación del péptido A β (Stockley y O'Neill, 2007; Holler y col., 2012). Posteriormente, la γ -secretasa escinde al fragmento C99 cerca del límite de la membrana citoplasmática en el sitio γ , produciendo pequeños péptidos A β de entre 39 y 43 aminoácidos (Coulson y col., 2000; Selkoe y Schenk, 2003). La isoforma A β -40 es la más frecuente, seguida de la A β -42, que es de naturaleza hidrófoba, más tóxica y forma agregados y placas con mayor facilidad que la A β -40 (Perl, 2010).

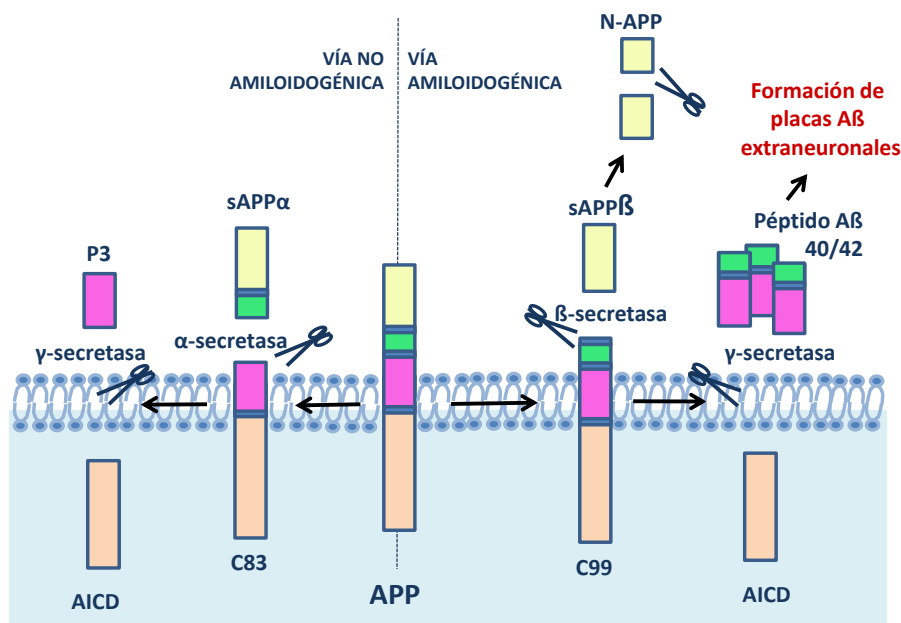


Figura 2. Representación gráfica de la proteólisis de la proteína precursora del péptido β -amiloide (APP) por la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica. sAPP α : fragmento soluble extracelular de la APP generado por la vía no amiloidogénica; sAPP β : fragmento soluble extracelular de la APP generado por la vía amiloidogénica; AICD: fragmento intracelular de la APP; C83 y C99: fragmentos transmembrana de la APP de 83 y 99 aminoácidos respectivamente; P3 dominio extracelular N-terminal de la APP generado en la vía no amiloidogénica; N-APP: fragmento N-terminal de la APP generado en la vía amiloidogénica; A β : péptido β -amiloide.

2.2. La proteína tau

Neuropatológicamente, la EA está caracterizada también por la presencia de ovillos fibrilares intraneuronales (Kopke y col., 1993), originados por el acúmulo de la proteína tau en el neocórtex y áreas límbicas del cerebro (Forman y col., 2004). La proteína tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a los microtúbulos neuronales y participa en el ensamblaje y estabilización de esta red, lo que permite el transporte axonal de proteínas, vesículas y otras sustancias (Khan y Bloom, 2016). En el cerebro, esta proteína se expresa de forma fisiológica en las neuronas, fundamentalmente en el axón, y se han identificado seis isoformas, que derivan de un único gen localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (gen MAPT) (Kuret y col., 2005).

La capacidad de unión de la proteína tau a los microtúbulos se puede regular eficazmente mediante la modulación de la fosforilación de residuos de serina y treonina, dando lugar a la proteína tau fosforilada (p-tau). En la proteína tau, el dominio de unión a los microtúbulos consta de cuatro secuencias repetidas de serina y treonina, seguido de prolina. Estos aminoácidos pueden ser fosforilados por enzimas como la calcio-calmodulina proteína quinasa 2 (CaMKII), la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa B (PKB o Akt) entre otras (Mazanetz y Fischer, 2007, Khan y Bloom, 2016).

La hiperfosforilación de tau reduce su afinidad por los microtúbulos, perdiendo su función fisiológica (Mazanetz y Fischer, 2007). Esta pérdida de su funcionalidad conduce a una alteración patológica de las funciones estructurales y de regulación del citoesqueleto neuronal, favoreciendo el desarrollo de procesos neurodegenerativos y la formación de ovillos neurofibrilares (Kopke y col., 1993;

Roy y col., 2005). Por otro lado, la regulación a la baja de las fosfatasas, que son enzimas que catalizan la defosforilación de la proteína tau, está implicada también en el aumento de la formación de los ovillos neurofibrilares (Tian y Wang, 2002; Barage y Sonawane, 2015; Khan y Bloom, 2016).

2.3. La alteración de la homeostasis del calcio neuronal

La desregulación de la homeostasis del calcio intraneuronal, un segundo mensajero clave en multitud de funciones neuronales, es un factor común a varios trastornos neurodegenerativos. En la EA, las placas amiloideas favorecen la aparición de poros amiloides en las neuronas próximas a los depósitos de A β (Arispe y col., 1993). Estos poros, que son canales selectivos al calcio, permiten su entrada sin regulación y elevan los niveles de este ion en el citosol neuronal (Demuro y col., 2005; Glabe, 2005). El incremento del calcio citosólico favorece la aparición de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, y de forma indirecta aumenta la amiloidogénesis, produciendo un círculo vicioso que conduce a la apoptosis o muerte celular (Wanders y col., 2010; Barage y Sonawane, 2015).

La elevación neuronal de calcio producida por los poros amiloides, origina también la activación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA (N-metil-D-aspartato, receptores ionotrópicos de glutamato) produciendo hiperexcitabilidad neuronal (Klein y col., 2007). El aumento del calcio permite la liberación de vesículas sinápticas y la activación de otras proteínas como la CAMKII, quinasa que fosforila a la proteína tau (Calon y col. 2005; Mazanetz y Fischer, 2007).

Por otro lado, las alteraciones en la concentración del calcio citosólico favorecen la degeneración celular al alterar la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias y el metabolismo energético, aumentando como consecuencia, la producción de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo (Mattson y col., 1992; Pereira y col., 2004; Sanz-Blasco y col., 2008). Las mitocondrias tienen un papel esencial en la vía intrínseca de la muerte celular, principalmente en la muerte neuronal, ya que en las neuronas, la apoptosis por la vía intrínseca es mayoritaria. El incremento del calcio aumenta la permeabilidad mitocondrial consecuencia de la apertura de poros en la membrana de las mitocondrias. A su vez, se libera el citocromo c al citosol neuronal, lo que conlleva de modo irreversible a la activación y liberación de las caspasas. Las caspasas son las proteínas encargadas de ejecutar la apoptosis o muerte celular. De forma directa e indirecta producen cambios morfológicos de la célula durante la apoptosis. Esta familia de proteasas existe como precursores latentes y al activarse, inician la muerte programada destruyendo componentes claves y activando factores que median el daño celular. Las caspasas iniciadoras de la apoptosis, como la caspasa-9 (Cas-9), son activadas por una señal de muerte celular (TNF- α , por ejemplo). Estas activan a su vez a las caspasas ejecutoras como la caspasa-3 (Cas-3), que induce la apoptosis o muerte neuronal (Duchen, 2000, Hiu-Ling y col., 2010).

2.4. El estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce como consecuencia de un desequilibrio persistente entre la producción de especies pro-oxidantes y la capacidad de los sistemas antioxidantes, resultando un exceso neto de las primeras (Sies H, 1986). Como

consecuencia de este desequilibrio se produce un déficit energético, peroxidación lipídica, mutagénesis del ADN, disfunción celular y finalmente, la muerte celular (Murdoch y col., 2006). Existen numerosas evidencias que apuntan al estrés oxidativo como uno de los mecanismos más importantes acontecidos durante la aparición y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EA (Chiurchiù y col., 2016).

- **Los radicales libres:** Químicamente, la oxidación se define como la pérdida de uno o más electrones por un átomo o molécula. Los radicales libres son átomos o moléculas que han perdido al menos un electrón, dejando uno o más electrones desapareados en su última capa u orbital electrónico. El electrón desapareado tiene la propiedad de ser extremadamente inestable y por tanto hace que la molécula sea muy reactiva. Este electrón libre tiende a aparearse rápidamente con otro electrón de cualquier otra especie química para estabilizarse, alterando así, la estructura y función de dicha molécula (Pham-Huy y col., 2008). A pesar de su reducida vida media, estas reacciones se producen frecuentemente en cadena, lo que supone una amplificación del daño (Pham-Huy y col., 2008).

El daño producido por radicales libres puede causar oxidación de lípidos y proteínas, efectos genotóxicos por la oxidación de los ácidos nucleicos, acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis (Querfurth y col., 2010; Gu y col., 2013). El SNC es particularmente sensible al estrés oxidativo, entre otras causas, por su alto contenido de lípidos (mielina, fosfolípidos de membrana, etc.). Por ello, este tejido es muy sensible a los procesos de autooxidación, que originan diferentes productos secundarios de degradación: radicales libres lipídicos, epóxidos, alcoholes y aldehídos, tales como

malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE), ciclopentenonas, y ácidos grasos nitrogenados (NO₂-AG) (Chiurchiù y col., 2016). Los átomos de carbono con dobles enlaces, de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana del cerebro, son muy susceptibles a la pérdida de iones de hidrógeno, favoreciendo la formación de radicales libres lipídicos y la lipoperoxidación (Tsaluchidu y col., 2008). Por otro lado, la EA se caracteriza por depósitos de hierro en el hipocampo y la corteza cerebral, lo que podría servir de catalizador y promover el proceso oxidativo, precisamente en las zonas donde se localizan las lesiones de esta patología (Smith y col., 1997).

- **Especies reactivas de oxígeno:** El oxígeno molecular (O₂) tiene dos electrones en los orbitales moleculares más externos, sin embargo, químicamente es bastante estable. Los efectos perjudiciales del O₂ resultan de su reducción metabólica que conduce a la formación de moléculas con electrones desapareados muy reactivas y tóxicas conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROs). El oxígeno molecular puede ser reducido completamente por cuatro transferencias sucesivas de un electrón en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, proceso que origina las EROs o diferentes productos intermedios: anión superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxilo (HO[•]), radical hidroperoxilo (HO₂[•]) y radical peroxilo (ROO[•]), así como a la especie no radical, peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Este proceso se denomina reducción univalente del oxígeno (Bers, 2001).

En la fosforilación oxidativa mitocondrial, alrededor de un 2% del O₂ empleado por la mitocondria no es reducido completamente a H₂O, y se libera en forma de O₂^{•-} y H₂O₂ (Sawyer y col., 2002). El SNC posee una renovación celular muy restringida junto con un número elevado de mitocondrias activas en sus células, que conlleva un

alto consumo de O_2 y una elevada producción de EROs (Chiurchiù y MacCarrone, 2011). Sin embargo, no sólo se originan por la respiración mitocondrial, sino que también pueden ser generadas en el citosol de muchas células a través de la acción de diferentes enzimas tales como la xantina oxidasa, la glucosa oxidasa y las amino-oxidases. Además, en el retículo endoplásmico, los radicales $O_2^{\bullet-}$ se generan a través de la acción de ciertas enzimas de la familia del citocromo P-450, y en la membrana plasmática por la acción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; NADPH-oxidasa (NOX), un complejo enzimático que utiliza NADPH para reducir O_2 , generando así grandes cantidades de $O_2^{\bullet-}$ (Chiurchiù, 2016). Existen 5 isoformas descritas (NOX 1-5) codificadas por genes distintos (Lambeth, 2004), siendo la NOX 2 la forma predominante en microglía y astrocitos (Fischer y Maier, 2015). Cada subunidad NOX forma un heterodímero con la subunidad transmembrana llamada p22phox, constituyendo un núcleo catalítico heterodimérico (o citocromo b558) donde ocurre la transferencia de electrones del NADPH al oxígeno resultando, como se ha indicado, en la formación de $O_2^{\bullet-}$. La función principal de esta subunidad es la de estabilizar la subunidad NOX y favorecer las uniones entre la subunidad NOX y las subunidades citosólicas p47phox y p67phox (Dahan y col., 2002). Sin la presencia de la subunidad p22phox la actividad de la NADPHox se ve anulada (Sardina y col., 2010; Ushio-Fukai y col., 1996). Esta subunidad se expresa a bajos niveles en situaciones fisiológicas, pero en condiciones patológicas se produce un aumento de su expresión relacionado con un aumento de los procesos neurodegenerativos y el desarrollo de la EA (Gao y col., 2012).

- **Especies reactivas de nitrógeno:** El óxido nítrico (NO^{\bullet}), es una molécula biológica esencial generada por una familia de enzimas NO sintasa (NOS) específicas:

endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS); esta última localizada en las células microgliales (Leiper y Nandi, 2011). Concentraciones elevadas de NO por la sobreestimulación de la iNOS en células gliales que rodean a las placas amiloideas, estarían implicadas en procesos de daño celular relacionados con la inflamación (Zhu y Chu, 2010; Gao y col., 2012). Las EROs pueden reaccionar con el óxido nítrico y favorecer la formación de especies reactivas de nitrógeno (ERNs), tales como el dióxido de nitrógeno (NO₂), el trióxido de dinitrógeno (N₂O₃), el tetraóxido de dinitrógeno (N₂O₄) y el peroxinitrito (ONOO⁻) (Stamler y col., 1992).

- **Antioxidantes endógenos:** Para eliminar estas EROs y ERNs, el organismo posee una serie de sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos, que actúan neutralizando los radicales libres por cesión de un electrón (Chiurchiù y MacCarrone, 2011). Entre los antioxidantes enzimáticos se encuentran: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y el sistema glutatión/ peroxidasa/ reductasa. La SOD cataliza la eliminación de O₂⁻ y la producción de H₂O₂ y O₂. Actualmente hay descritas tres isoformas de esta enzima, según el grupo prostético ligado a la enzima. La SOD 1, que contiene cobre y zinc en su sitio activo y se encuentra en el citoplasma y en el espacio intermembranoso mitocondrial de las células eucariotas (Huang y col., 2016). La SOD 2, que contiene manganeso en su sitio activo y es específica de la matriz mitocondrial (Huang y col., 2016). Y la SOD 3, que se secreta al líquido intersticial en la mayoría de los tejidos (Flynn y Melov, 2013). La catalasa elimina el H₂O₂ dando lugar a agua y oxígeno y se localiza en los peroxisomas, mitocondrias y citosol (Chance B y col., 1979). Por último, el glutatión reducido (GSH), que es una molécula con una gran capacidad antioxidante, la enzima glutatión peroxidasa (GPx) la cual colabora en la acción antioxidante del GSH, y la glutatión reductasa (GRd), que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a

GSH. Es este uno de los principales mecanismos protectores de la célula frente al estrés oxidativo (Huang y col., 2016) y su función tiene un papel fundamental en las enfermedades neurodegenerativas, y concretamente en la EA (Fischer y Maier, 2015).

2.5. La respuesta inflamatoria

La inflamación es una respuesta protectora frente a lesiones tisulares y celulares, con el fin de destruir y eliminar los agentes perjudiciales y los tejidos lesionados, promoviendo así su reparación. Sin embargo, cuando la inflamación es incontrolada, puede pasar a ser crónica y causar un daño exacerbado que conduce a la destrucción de tejidos (Calabrese y col., 2007). Las primeras evidencias del componente inflamatorio de la EA se describieron en estudios epidemiológicos, en los que se demostró una reducción del riesgo de padecer la enfermedad en personas tratadas con antiinflamatorios no esteroideos (Breitner y col., 1994; McGeer, 2007).

En la EA, la respuesta inmune que tiene lugar es inespecífica y se denomina gliosis reactiva, implicando tanto a microglía activada como a astrocitos reactivos. Además, la presencia continuada de neuronas dañadas en esta patología, genera una constante activación de la glía, colaborando a su vez con la degeneración neuronal (Zipp y Aktas, 2006).

La microglía constituye la porción minoritaria de la población total de células gliales dentro del cerebro y, fisiológicamente, se encuentra en estado inactivo, con una morfología muy ramificada. Bajo condiciones patológicas, la microglía se activa y sufre cambios morfológicos, aumentando la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (Hayden and S. Ghosh, 2008; Lee y col., 2009; Okun y

col., 2010). Esto crea un ambiente inflamatorio que promueve neurodegeneración (Amor y col., 2010). Por otra parte, dependiendo del daño causado, los macrófagos periféricos pueden entrar en el SNC y promover aún más la neuroinflamación y la degeneración (Amor y col., 2010). La inflamación exacerbada, creada por la microglía activada de forma sostenida, puede a su vez conducir a un aumento de producción del péptido A β , creando así un círculo vicioso (Amor y col., 2010; Hayward y Lee, 2014).

Existen tres fenotipos distintos de microglía activada. En primer lugar, la *microglía destructiva*, que induce una respuesta inmune primaria. En segundo lugar, la *microglía distrófica o senescente*, que presenta una morfología fragmentada. Este tipo de microglía parece que sufre un proceso de degeneración o de fragmentación citoplásmica llamado citorrexis, que precede a la neurodegeneración y que origina una pérdida de protección microglial. Y por último, la *microglía beneficiosa*, aquella que lleva a cabo una respuesta quimiotáctica y fagocítica hacia los depósitos del péptido A β , reduciéndolos (Streit y col., 2009; Luo y col., 2010; Boche y col., 2013; Streit, 2016).

Por tanto, la microglía desempeña un papel fundamental en la progresión de la enfermedad, ya que tiende a agruparse alrededor de las placas amiloides para eliminar los depósitos del péptido A β , iniciando una actividad fagocítica y liberando mediadores citotóxicos (Akiyama y col., 2000; Niranjana, 2014).

Las citoquinas pro-inflamatorias son péptidos de pequeño tamaño que median la activación, proliferación y migración celular a través de la unión a sus receptores de membrana. Dentro de este grupo de mediadores de la inflamación se incluyen: las interleuquinas (IL) siendo la IL-6 la más representativa, los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones y los factores estimuladores de colonias (Hofman y

col., 1989; Dickson, 1997; Colombo y col., 2012; Hayward y Lee, 2014). Por otra parte, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas (NF κ B) puede inducir la expresión de la fosfolipasa A2 y de COX-2, que están involucradas en la generación de eicosanoides, promoviendo por lo tanto el infiltrado de células inflamatorias y el proceso inflamatorio (Barnes y Karin, 1997; Ransohoff, 2016).

La IL-6 es una glucoproteína secretada por macrófagos, células gliales en el SNC, células T, endoteliales y fibroblastos. Se ha demostrado que el A β induce la producción de la IL-6 en cultivos de astrocitos y microglía (Lee y col., 2009). En neuronas del hipocampo, el incremento de los valores de IL-6 favorecido por la presencia del péptido A β , induce la disfunción sináptica y la atrofia, que desencadena los síntomas cognitivos de esta patología (Walsh y col., 2014). Además, los niveles de IL-6 en plasma y LCR, son un buen indicador de los estadios tempranos de la EA (Wu y col., 2015), ya que esta citoquina se encuentra incrementada 5 años antes de establecerse la enfermedad (Streit y col., 2009).

El TNF- α es una citoquina clave del sistema inmunitario, que inicia y promueve la inflamación y que, a su vez, puede favorecer el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Zheng y col., 2016). El aumento de la concentración sérica de TNF- α debido a una inflamación sistémica, también se ha asociado con una aceleración del deterioro cognitivo en la EA, lo que implica un vínculo claro entre inflamación y neurodegeneración (Hernández-Romero y col., 2012).

2.6. Disfunción colinérgica

Según la hipótesis colinérgica, la deficiencia de Ach es responsable de la pérdida de la memoria y las deficiencias cognitivas más importantes, y actualmente constituye la base de la farmacoterapia del Alzheimer (Bartus y col., 1982). La hipótesis colinérgica se apoya, sobre todo, en que los inhibidores de la acetilcolinesterasa muestran efectos positivos sobre las capacidades cognitivas en pacientes con esta patología (Hansen y col., 2008; Hong-Qi y col., 2012). No obstante, ensayos clínicos basados en la administración a largo plazo de los inhibidores de acetilcolinesterasa a pacientes con deterioro cognitivo leve, no fueron capaces de reducir el riesgo o retrasar la aparición de la EA (Contestabile, 2011). Esto se debe a que la muerte neuronal afecta en una primera etapa a las neuronas colinérgicas que están localizadas en el cerebro basal anterior, y sus axones se proyectan a la corteza cerebral e hipocampo, áreas que modulan la función cognitiva (Bartus y col., 1982). Sin embargo, actualmente se sabe que ésta no es la causa original de la enfermedad, sino más bien otra de las consecuencias de los daños cerebrales producidos por la misma.

En condiciones fisiológicas, la ACh es sintetizada en el interior de la neurona a partir de la colina por la acción de la enzima colinacetiltransferasa. Una vez sintetizada se almacena en vesículas en el interior de la neurona presináptica hasta que se produce el impulso nervioso. La ACh se vierte al espacio sináptico donde se une a los receptores colinérgicos de la neurona postsináptica. En el espacio sináptico hay una enzima que se encarga de regular la concentración de ACh por degradación de la misma conocida como acetilcolinesterasa (Sims y col., 1983; Nilsson y col., 1986).

La deficiencia de proyecciones colinérgicas en la EA se debe a varias causas. En primer lugar, los oligómeros de A β son sinaptotóxicos y además reducen la actividad cortical e hipocampal de la acetilcolintransferasa y la acetilcolinesterasa en un 50%, inhibiendo por tanto la neurotransmisión colinérgica. (Davies y Maloney, 1976, Wilcock y col., 1982; Francis y col., 1993). En segundo lugar, la acumulación de la proteína tau produce una alteración del transporte axonal de proteínas y la pérdida de la función neuronal, lo que favorece el deterioro de las funciones cognitivas en la EA (Bartus y col., 1982). Por último, la pérdida de la función colinérgica en la EA se relaciona con la disminución de factores neurotróficos en el cerebro (Schindowski y col., 2008).

Las neurotrofinas, o factores neurotróficos, desempeñan un papel clave en el mantenimiento, desarrollo y regulación de la función neuronal. Son sustancias que promueven la proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas y la glía y que median en el aprendizaje, la memoria y el comportamiento (Schindowski y col., 2008). La familia de las neurotrofinas incluye el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), entre otros (Lang y col., 2004).

El BDNF es una proteína presente en el hipocampo, corteza, cerebelo, área ventral tegmental y cerebro anterior basal, todas áreas vitales para el aprendizaje, la memoria, la motivación y el conjunto de las actividades mentales requeridas para el análisis de situaciones complejas (Boneva y Yamashima, 2012; Gururajan y van den Buuse, 2014). Juega un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de los sistemas sensorial y simpático, la función colinérgica del sistema nervioso central, la cognición y la formación de la memoria (Rylett y Williams, 1994).

2.7. Componente genético de la Enfermedad de Alzheimer

Los estudios genéticos han identificado dos formas diferentes de presentación de la EA (Barage y Sonawane, 2015):

- **La EA familiar (EAF):** Se caracteriza por una herencia autosómica dominante, es de inicio precoz (antes de los 60 años) y supone entre el 4 y el 8% del total de casos diagnosticados (Ling y col., 2003). Actualmente se ha asociado con mutaciones en tres genes principalmente, que son responsables del 30 al 50% de los casos de EAF:

- Gen de la proteína precursora de amiloide (APP): está causada por mutaciones autosómicas dominantes en el gen que codifica para la APP, que se encuentra en el cromosoma 21 (Rosenberg, 2000). Por ello, los individuos que padecen síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21) desarrollan muy frecuentemente la EAF de aparición temprana (Ling y col., 2003).

- Gen de la presenilina 1 (PSEN1): localizado en el cromosoma 14. (Sherrington y col., 1995; Shen y Kelleher, 2007).

- Gen de la presenilina 2 (PSEN2): localizado en el cromosoma 17. (Sherrington y col., 1995).

Las presenilinas modulan el equilibrio del calcio a nivel del retículo endoplasmático. El efecto principal de estas mutaciones consiste en el aumento de los niveles de A β -42 y con ello las reservas de calcio en el retículo endoplasmático y su liberación al citoplasma, produciendo una desregulación de la homeostasis del calcio y apoptosis neuronal (Bertram y Tanzi, 2008; Barage y Sonawane, 2015).

A pesar que no existen estudios epidemiológicos que evalúen la contribución de estos genes, parece que las mutaciones en estos tres genes explicarían la

enfermedad en la mitad de las familias con patrón autosómico dominante (Goate y col., 1991; Levy-Lahad y col., 1995).

- **La EA esporádica (EAE) o demencia tipo Alzheimer esporádico:** Presenta un patrón de herencia muy complejo y además, es de inicio tardío (después de los 60 años). La EAE es la forma más común, presentándose en el 90% de los casos. Diversos estudios han sugerido que tanto los factores genéticos como los ambientales colaboran en la aparición de ambos tipos de EA (Huang y Mucke, 2012). Además de los tres genes responsables de la forma familiar que también intervienen en la EAE, se ha encontrado un cuarto gen, el gen de la Apolipoproteína E (ApoE) en el cromosoma 19. Mutaciones en este gen se asocian con un incremento en los depósitos de péptido β -amiloide en corteza y factor de riesgo importante (Mahley RW, 2006) que se asocia con cambios sutiles en la estructura y función cerebral. Poseer el alelo $\epsilon 4$ de la ApoE es el principal factor de riesgo genético de la EAE (Ashford, 2004).

Además, existen otros polimorfismos que se relacionan con la EAE, pero que no se han confirmado del todo aún, como son el gen de la α -2 macroglobulina, el gen del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), genes mitocondriales (citocromo-oxidasas I y II), genes de interleuquinas 1A y 1B y el gen de la proteína tau (MAPT), entre otros setenta genes más. El hallazgo de mutaciones en el gen MAPT reduce su capacidad para interactuar con los microtúbulos promoviendo la aparición de neurodegeneración.

2.7.1. La Apolipoproteína E

La Apolipoproteína E es una proteína plasmática transferible de origen hepático y neuronal, que forma parte de las lipoproteínas situándose en su superficie. En su

estado libre de lípidos, la ApoE es un polipéptido de 299 aminoácidos que posee dos dominios separados: la región aminoterminal (entre los aminoácidos 1 a 191) en la cual se encuentra el sitio activo y está plegada como un haz con cuatro hélices antiparalelas, y la región carboxi-terminal (aminoácidos 225-299) que es una hélice α (una cara con residuos polares y otra con residuos apolares), donde se encuentra el sitio de unión a lípidos (Utermann y col., 1977; Zannis y col, 1981; Mahley y col. 2009).

El gen ApoE situado en el cromosoma 19 es polimórfico. Los tres alelos más comunes del gen de Apo E son $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, los cuales producen tres isoformas de la proteína, llamadas E2, E3 y E4. Estos tres alelos diferentes son heredados de forma codominante dando como resultado seis genotipos: E2/2, E3/2, E3/3, E3/4, E4/4, E4/E2. El genotipo E3/E3 es el más común, con una frecuencia poblacional del 77% (Mahley y col., 2009).

2.7.2. Acciones de la Apolipoproteína E

La ApoE, tras ser sintetizada en el hígado, se secreta a la circulación sistémica incorporada a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), VLDL y una subclase de lipoproteínas de alta densidad. En sangre, parte de esta ApoE se transfiere a los quilomicrones. La ApoE regula el transporte de colesterol y lípidos en todo el cuerpo y media en la eliminación de las lipoproteínas del plasma por el receptor de LDLR y otros receptores relacionados presentes en el hígado (Zlokovic, 2013).

Además de su importancia en el metabolismo de los lípidos a nivel sistémico, su presencia es fundamental en el SNC al regular el metabolismo lipídico a nivel cerebral, la función sináptica y presentar un papel fundamental en el mantenimiento

y la protección neuronal (Verghese y col., 2011; Wisdom y col., 2011; Zlokovic, 2013). La ApoE no es capaz de atravesar la BHE, y por ello se sintetiza en células gliales, principalmente en los astrocitos (Kim y col., 2009), aunque en determinadas condiciones fisiológicas y patológicas, la microglía y las neuronas pueden sintetizarla (De Mattos y col., 2001; Aoki y col., 2003). Además de ser un regulador esencial del metabolismo del colesterol en el cerebro, la ApoE tiene un papel muy importante en el aclaramiento del péptido A β , ya que, debido a su afinidad inherente por este péptido, se encarga de su absorción y eliminación, evitando así su acumulación (Herz, 2001; Kuszczuk y col., 2013).

En cerebros de pacientes con la EA, las concentraciones elevadas del péptido A β interfieren con la función transportadora de lípidos de la ApoE en el cerebro (Tamamizu-Kato y col., 2008). A su vez, un desequilibrio en el transporte lipídico en el SNC contribuye al desarrollo de la EA, dando lugar a la generación de un círculo vicioso (Shobab y col., 2005; De Chaves y Narayanaswami, 2008).

Las isoformas de la ApoE actúan de forma distinta en la regulación de la agregación, la absorción, la degradación y el aclaramiento fagocítico de A β en el cerebro. Así mismo, cada isoforma tiene funciones diversas en la regulación del transporte cerebral de lípidos, el metabolismo de la glucosa, la función mitocondrial y la modulación de la plasticidad neuronal (Igbavboa y col., 2002; Verghese y col., 2013; Scheltens y col., 2016). En concreto, la isoforma ApoE4 interfiere con el aclaramiento del péptido A β (Castellano y col., 2011) y facilita su transformación en fragmentos neurotóxicos (Mahley y Huang, 2012). El riesgo de padecer la EA aumenta más de un 50% a lo largo de la vida en los individuos homocigotos de ApoE4 y el 30% en heterocigotos de ApoE4 y ApoE3 (Genin y col., 2011).

2.8. Alteraciones cerebrovasculares en la enfermedad de Alzheimer

Es un hecho bien establecido que las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA, están asociadas con la aparición de la disfunción microvascular, el aumento de la permeabilidad de la BHE y diversos factores de riesgo cardiovascular, como la alteración del metabolismo lipídico o la diabetes mellitus (Bell y col., 2010; Zlokovic, 2011; Cai y col., 2015; Halliday y col., 2016).

En condiciones fisiológicas, las células endoteliales cerebrales de la BHE, que recubren el sistema vascular cerebral, presentan uniones intracelulares estrechas que protegen al SNC del acceso de sustancias tóxicas y pérdida de la homeostasis neuronal (Zlokovic, 2011; Chekhonin y col., 2012). Para llevar a cabo esta función, la BHE requiere un sustrato anatómico llamado unidad neurovascular. La unidad neurovascular comprende: a) las células vasculares: incluyendo las células del endotelio y murales, tales como pericitos de los capilares cerebrales (arteriales y/o venosos) y las células de músculo liso vascular; b) células gliales: astrocitos, microglía y oligodendroglía y c) neuronas (Zlokovic, 2011; Chekhonin y col., 2012). Las células endoteliales de los capilares cerebrales están conectadas formando una membrana celular continua que subyace a la BHE (Zlokovic, 2013). Los pericitos regulan la permeabilidad de la BHE y desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad cerebrovascular a nivel de los capilares del cerebro, evitando la entrada de diversas macromoléculas potencialmente neurotóxicas y vasculotóxicas, como el glutamato o el péptido A β , desde la sangre al SNC (Bell y col., 2010; Zlokovic, 2013).

En condiciones patológicas, como en la EA, se produce una alteración cerebrovascular con degeneración del endotelio capilar cerebral, una reducción de la unión entre las proteínas endoteliales, engrosamiento de la membrana basal de los capilares y degeneración de las pequeñas arterias cerebrales. Todo ello contribuye a la reducción del flujo sanguíneo cerebral y la alteración de la función de la BHE (Cai y col., 2015). Estos cambios microvasculares producen una disminución del suministro cerebral de oxígeno y diversos nutrientes, contribuyendo al daño neuronal y pérdida del volumen cerebral. Además, los depósitos amiloideos vasculares endurecen las paredes del vaso sanguíneo produciendo una angiopatía amiloide cerebral, característica de la EA, comprometiendo aún más la capacidad cognitiva en estos pacientes (Scheltens y col., 2016).

2.8.1. Alteraciones del metabolismo lipídico

La alteración del metabolismo lipídico se ha asociado con muchos trastornos neurodegenerativos tales como la EA, la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, el síndrome de Smith-Lemli-Opitz, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson (Goedeke y Fernández-Hernando, 2014, Sato y Morishita, 2015; Saher y Stumpf, 2015; Leoni y Caccia, 2015). Esto es debido a que niveles elevados de colesterol y triglicéridos en sangre se relacionan de forma directa con eventos vasculares y daños en la integridad de la BHE, incrementando el daño neuronal en pacientes con la EA (Sato y Morishita, 2015).

Numerosos estudios del genoma humano han identificado, además de la ApoE, nuevos genes de riesgo para la EA que pueden afectar directamente al metabolismo lipídico (Hollingworth y col., 2011; Olgiati y col., 2011; Sato and Morishita, 2015), al

sistema vascular cerebral y al aclaramiento vascular del péptido A β (Tanzi, 2012). Concretamente, los genes implicados en la biosíntesis de colesterol (24-dihidrocolesterol-reductasa, DHCR24) y en el flujo de salida de éste de la célula (transportador ABCA1) se han asociado con el desarrollo de los daños neuronales característicos de la EA (Goedeke y Fernández-Hernando, 2014; Sato y Morishita, 2015).

3. El ratón ApoE^{-/-} como modelo de la Enfermedad de Alzheimer

Los ratones deficientes en la ApoE (ratones ApoE^{-/-}) son un modelo experimental idóneo para estudiar la patogénesis de la EA (Genis y col., 1995; Avdesh y col., 2011; Jansen y col., 2014; Lane-Donovan y col., 2016; Leung y Jia, 2016). Fueron desarrollados en un principio para realizar estudios de patogénesis de la aterosclerosis, dado que desarrollan lesiones vasculares muy similares a las que se encuentran en pacientes (Meyrelles y col., 2011). Por tanto, son un modelo animal idóneo para estudiar las consecuencias de un desequilibrio lipídico en la función cerebral (Jansen y col., 2014; Leung y Jia, 2016).

La deficiencia de la ApoE favorece el desarrollo de disbetalipoproteinemia, disfunción microvascular, desintegración neurovascular y alteración en la integridad de la BHE (Wang y col., 2011). Además, la deficiencia de ApoE incrementa la acumulación del péptido A β , que influye directamente en la progresión de la EA (Wang y col., 2011). Esto favorece el inicio de la cascada amiloide y la formación de ovillos neurofibrilares característicos de esta patología. Además, en los ratones ApoE^{-/-}, la expresión de la de la proteína tau fosforilada está aumentada (Rahman y

col., 2005), favoreciendo una mayor peroxidación lipídica, acumulación del péptido A β y el estrés oxidativo en el SNC (Lomnitski y col., 1997; Shea y col., 2002).

Así mismo, se ha observado que una ingestión elevada de grasa agrava el deterioro cognitivo en ratones ApoE^{-/-}. Esto es debido a que al estar inhibidos los mecanismos compensatorios de neuroinflamación y neurogenesis (Janssen y col., 2016), muestran una pérdida significativa de sinapsis y desarrollan la disfunción cognitiva consecuente (Avdesh y col., 2011; Lane-Donovan y col., 2016). Además, este modelo animal alimentado con una dieta rica en grasa presentan una regeneración neuronal anormal después de lesiones en el hipocampo (Genis y col., 1995), un elevado estrés oxidativo, así como la activación de células gliales y procesos inflamatorios exacerbados (Crisby y col., 2004; Rahman y col., 2005). Por último y como consecuencia, presentan un proceso neurodegenerativo con una atrofia cerebral que llega a la muerte (Masliah y col., 1995; Montine y col., 1999; Rahman y col., 2005). Por tanto, el ratón ApoE^{-/-} alimentado con una dieta rica en grasa constituye un modelo relevante para estudiar el desarrollo de la EA (Janssen y col., 2014).

4. Tratamientos de la Enfermedad de Alzheimer

Actualmente no hay ningún método terapéutico o preventivo eficaz y contrastado que evite la aparición o el desarrollo de la EA. Es patente el fracaso terapéutico de los fármacos que activan directamente los receptores colinérgicos y la eficacia parcial de los inhibidores de la acetilcolinesterasa, así como de la memantina (bloquea de forma no competitiva el receptor glutamatérgico NMDA), los inhibidores de la γ -secreteasa, las estatinas y la inmunización activa con A β o pasiva

con anticuerpos (Holstein, 2000; Contestabile, 2011; Garcés y col., 2016). Por esta razón se requiere buscar nuevas perspectivas terapéuticas o preventivas para esta patología, en busca de medicamentos más efectivos para ralentizar su evolución y minimizar sus síntomas, permitiendo alargar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes tras el diagnóstico (Garcés y col., 2016; Lee y col., 2016).

Recientes ensayos clínicos apuntan al ácido docosahexaenoico (DHA), como una posible alternativa terapéutica o profiláctica enfocada en una gran parte de la población con problemas cognitivos leves (Yurko-Mauro y col., 2010), junto con varios factores de riesgo de demencia y de la EA (Yurko-Mauro y col., 2010; Weiser y col., 2016).

5. El ácido docosahexaenoico

El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga de la serie omega-3 ($C_{22}H_{32}O_2$) presente en los alimentos procedentes del medio acuático, incluyendo aceites de algas microscópicas, pescados grasos (especialmente salmón, caballa, sardinas, arenque, etc.) (Weiser y col., 2016). El DHA jugó un papel importante en la evolución humana, debido a que el aporte de éste en la dieta coincidió con cambios estructurales significativos en el encéfalo y un aumento de las habilidades cognitivas (Broadhurst y col., 1998; Crawford y col., 1999).

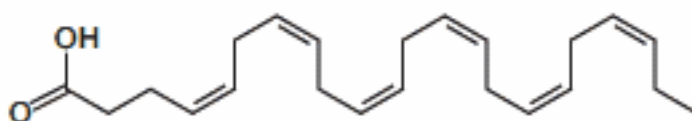


Figura 3. Estructura química del DHA (22:6n-3)

Existe mucha información sobre el papel de la nutrición en el desarrollo cerebral y por lo tanto, en la función del SNC y el rendimiento mental de los seres humanos. El funcionamiento adecuado del cerebro tiene una dependencia del mantenimiento de su composición lipídica óptima (Bryan y col., 2004). Actualmente, el cambio de las dietas modernas hacia la reducción de la ingesta de AGPI n-3 y el aumento del consumo de AGPI n-6, combinado con una menor actividad física, ha tenido un impacto perjudicial en el desarrollo y el envejecimiento cerebral, principalmente en la función cognitiva (Weiser y col., 2016; Bryan y col., 2004).

El cerebro es un órgano rico en lípidos, que consume más del 20% de la energía producida en el organismo pero que supone sólo el 2% de la masa corporal. Más de la mitad de su peso seco está constituido por lípidos con un contenido muy elevado de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-3 (n-3) de cadena larga. Esto sugiere que los AGPI n-3 presentan un papel clave en el desarrollo, maduración y envejecimiento de las estructuras y redes neurales (Weiser y col., 2016).

Entre los lípidos cerebrales se encuentran concentraciones elevadas de palmitato (16:0), ácidos araquidónico (AA, 20:4 n-6) y docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3), pero reducidas de otros AGPI n-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) (Orr y col., 2013; Dyall, 2015; Weiser y col., 2016). Así, el DHA es cuantitativamente el AGPI n-3 más importante del cerebro (Brenna y Diau, 2007; Chen y col., 2013).

Todos los AGPI n-3 se puede sintetizar de forma endógena a partir del ácido α -linolénico (ALA, 18:3 n-3), a través de una serie de reacciones de desaturación, elongación y, en última instancia, reacciones de β -oxidación (Gregory y col., 2011; Dyall, 2015). Sin embargo, la síntesis endógena de EPA, DPA y DHA en cerebro es muy reducida (Eaton y col., 1996; Reddy y Hashimoto, 2001; Demar y col., 2005;

Demar y col., 2006). Por ello, el cerebro mantiene los niveles de estos ácidos grasos mediante los AGPI n-3 procedentes de la dieta principalmente (Ouellet y col., 2009; Chen y Bazinet, 2015). En la actualidad no está claro por qué los fosfolípidos cerebrales necesitan estar enriquecidos específicamente con DHA, pero está demostrado que el enriquecimiento específico de DHA supone una necesidad para la función neuronal correcta (Dyall, 2015).

Aunque el DHA se puede sintetizar *de novo* de forma endógena en el hígado, se podría considerar que es un nutriente esencial, debido a la escasa actividad de las enzimas $\Delta 5$ -desaturasa y $\Delta 6$ -desaturasa, necesarias para su biosíntesis. Además, en humanos la ingesta del precursor del DHA, el ALA, no incrementa las concentraciones de DHA plasmático (Arterburn y col., 2006; Brenna y col., 2009; Lin y col., 2010). También hay que tener en cuenta la competencia que existe entre el DHA y los AGPI n-6 al formar parte de los tejidos periféricos y neurales, como por ejemplo con el ácido linoléico (LA, 18:2 n-6). El LA, presente en elevadas cantidades en los aceites de girasol y soja, se consume en cantidades muy altas en las dietas actuales, lo que exagera la incorporación de AGPI n-6 a los tejidos, en detrimento de los AGPI n-3 (Emken y col., 1994). La relación óptima de AGPI n-6/n-3 es 2:1 o inferior, mientras que en la dieta occidental actual está normalmente en el rango de entre 10:1 y 25:1 (Simopoulos, 2011). En la actualidad se recomienda el consumo de 250 a 500 mg de DHA por día (WHO, 2010; Aranceta y Pérez-Rodrigo, 2012), pero la mayoría de la población no consume suficientes AGPI n-3, siendo la ingesta diaria occidental aproximadamente de 100 mg por día de DHA (Blasbalg y col., 2011; Salem y Eggersdorfer, 2015). Numerosos estudios demuestran que es necesario aumentar la ingesta en la dieta de DHA, para alcanzar y mantener sus concentraciones cerebrales ideales y las funciones beneficiosas neurológicas

relacionadas con este ácido graso (Barcelo-Coblijn y col., 2009; Salem y Eggersdorfer, 2015).

5.1. El DHA en el sistema nervioso central

Más del 90% de los AGPI n-3 en el cerebro, y del 10% al 20% de sus lípidos totales están constituidos por DHA y se concentra principalmente en la materia gris (Brenna y Diau, 2007; Chen y Subbaiah, 2013; Pan y col., 2015). El DHA se incorpora a los fosfolípidos de membrana, desde donde se libera al espacio intracelular, ejerciendo múltiples acciones beneficiosas sobre el SNC (Vandal y col., 2014; Chen y col., 2015). Este ácido graso se almacena principalmente en los fosfolípidos fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, y en cantidades más pequeñas también se encuentra en la fosfatidilcolina (Weiser y col., 2016). La concentración de DHA en el cerebro disminuye con la edad, coincidiendo con una disminución paralela en el volumen total de materia gris (McNamara y col., 2008). Esta disminución puede deberse en parte a los cambios en las enzimas responsables de la acumulación de DHA en los fosfolípidos (Giusto y col., 2002) o a los cambios en su metabolismo (Plourde y col., 2011). Estudios en humanos demostraron que un aumento en la ingesta de AGPI n-3, principalmente de DHA, durante el desarrollo y en la edad adulta, evitaba la pérdida de materia gris en la corteza del cíngulo anterior, la amígdala y el hipocampo (Conklin y col., 2007) y se relacionaba con un incremento de volumen de las regiones cerebrales responsables de la cognición (Raji y col., 2014).

5.2. El DHA y su papel en la Enfermedad de Alzheimer

La relación entre la disminución del DHA cerebral y el desarrollo de la EA está ampliamente demostrada (Grimm y col., 2011; Igarashi y col., 2011). Aún así, el papel del DHA en el envejecimiento y en la EA es un área de investigación emergente y que necesita más trabajos clínicos, dado que los resultados hasta ahora son limitados pero prometedores (Weiser y col., 2016). La utilización del DHA como herramienta en la prevención de la EA está cobrando mucho interés en la actualidad y existe una recomendación generalizada de su consumo para paliar los daños neurológicos producidos por esta patología (Yurko-Mauro y col., 2010, Grimm y col., 2017).

5.2.1. El DHA y su efecto en la cascada amiloidea

En la EA, los agregados extraneuronales de péptido A β presentan múltiples daños en el SNC como hemos citado anteriormente. Por tanto reducir las placas de A β supone un objetivo terapéutico fundamental. El cerebro de estos pacientes presenta una disminución en el contenido de DHA en las balsas lipídicas neuronales de la corteza (Martín y col., 2010), favoreciendo la interacción entre la APP y la β -secretasa y fomentando la amiloidogénesis (Hashimoto y col., 2015). Estudios previos han descrito que el DHA puede reducir la acumulación extraneuronal del péptido A β ya que inhibe la actividad de la β -secretasa (Grimm y col., 2011; Gu y col., 2012; Hashimoto y col., 2015). Por tanto, el aumento de las concentraciones de DHA cerebrales parece reducir la formación de agregados A β , ralentizando la cascada amiloidea y reduciendo los daños neurológicos (Grimm y col., 2011; Gu y col., 2012; Hashimoto y col., 2015).

5.2.2. El DHA y su protección frente a la inflamación y el estrés oxidativo

Con el envejecimiento, tanto en el SNC como en el sistema inmunológico, están exacerbados tanto el estrés oxidativo como los procesos inflamatorios (Vida y col., 2014), lo que aumenta el riesgo de desarrollar un proceso neurodegenerativo como la EA. En este sentido, el DHA ha mostrado efectos en la prevención y resolución de la neuroinflamación y el estrés oxidativo, y en la mejora de la actividad y el número de las sinapsis (Weiser y col., 2016). Esto se debe a que del DHA derivan unos mediadores especializados pro-resolución de la inflamación (SPMs), que se encuentran reducidos en los enfermos con la EA (Wang y col., 2015). Los SPMs, como protectinas, resolvinas serie-D y maresinas, se sintetizan a partir del DHA vía ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa (LOX) y tienen un potente efecto antiinflamatorio (Kiecolt-Glaser y col., 2011; Serhan y col., 2015; Bouwens y col., 2010). Además, el DHA es capaz de estimular a la microglía para fagocitar el péptido A β , reduciendo su acumulación y la inflamación y oxidación asociadas a ésta (Hjorth y col., 2013).

Por otro lado, el DHA puede también promover la reparación y el crecimiento de las neuronas cuando se produce un aumento del estrés oxidativo, controlándolo y reduciendo los procesos apoptóticos y los daños neuronales característicos de esta patología (Darios y Davletov, 2006).

5.2.3. El DHA y la función cognitiva

Existen diversas facetas que constituyen el proceso psíquico de la cognición. Estas incluyen la atención, la memoria (a corto y a largo plazo), la percepción, el lenguaje,

la resolución de problemas, la comprensión, el razonamiento, el cálculo, la lectura y el habla. La capacidad cognitiva de los seres humanos es sin duda la más avanzada en todo el reino animal. Tal diferencia se cree que es debida a una corteza cerebral muy desarrollada, particularmente el córtex prefrontal y parte del sistema límbico, regiones cerebrales muy importantes para la cognición y la memoria (Weiser y col., 2016). Los lóbulos frontales y áreas límbicas del cerebro son particularmente sensibles a la disponibilidad de DHA durante su desarrollo (Goustard-Langelier y Guesnet, 1999). Estas áreas cerebrales intervienen en las funciones cognitivas de orden superior, incluida la atención sostenida, la memoria, la planificación, orientación y la resolución de problemas (Anderson y col., 1998). Por tanto, es esencial mantener una composición lipídica óptima en estas regiones cerebrales, y específicamente de los niveles de DHA, durante el desarrollo y maduración del cerebro, desde la gestación hasta la infancia y adolescencia (Kuratko y col., 2013; Stonehouse, 2014), así como durante el envejecimiento del cerebro adulto (Cederholm y col., 2013; Salem y col., 2015).

El DHA está implicado en procesos de neurogénesis, neurotransmisión y supervivencia celular. Contribuye también a aumentar la fluidez de la membrana celular y mantener el correcto funcionamiento de los receptores de la membrana celular (Fleith y Clandinin, 2005; Belkouch y col., 2016; Kitajka y col., 2004). Además, el crecimiento de neuritas en regiones cerebrales como el hipocampo, requiere la acumulación de lípidos en las nuevas membranas, y el DHA ayuda a organizar las balsas lipídicas de las membranas introduciendo colesterol. (Stillwell y col., 2005; Jin y col., 2012; Belkouch y col., 2016). Este hecho es esencial en procesos como el aprendizaje y la consolidación de la memoria (Calderon y Kim, 2004; Cao y col., 2009).

El DHA facilita también los procesos involucrados en la plasticidad neuronal, que es esencial para llevar a cabo un aprendizaje adecuado y mantener una correcta funcionalidad de la memoria (Boneva y Yamashima, 2012; Gururajan y van den Buuse, 2014).

5.2.4. El DHA y las alteraciones cerebrovasculares

El cerebro es el órgano más perfundido del cuerpo humano, y las enfermedades cardiovasculares, asociadas con el envejecimiento, aumentan el riesgo de desarrollar patologías como la demencia y concretamente la EA (Roher y col., 2012). La reducción del flujo sanguíneo cerebral y las patologías vasculares están estrechamente ligadas al desarrollo de la EA (Roher y col., 2012). En este sentido, los beneficios cardiovasculares del DHA mejoran la perfusión cerebral. Entre estos beneficios se incluyen: la disminución de la presión arterial, la reducción de la vasoreactividad, la disminución de los niveles de colesterol y la síntesis hepática de TG y por último, la reducción de la agregación plaquetaria (Mozaffarian y Wu, 2012). En las etapas finales de la EA, los daños producidos por esta patología son intratables e irreversibles, por lo que debe hacerse hincapié en el uso de terapia profiláctica y precoz del DHA (Janssen y Kiliaan, 2014; Scheltens y col., 2016; Pusceddu y col., 2016).

A pesar de todos estos beneficios demostrados del DHA, existe controversia en los resultados obtenidos en los ensayos clínicos realizados. Esto podría deberse a la presencia de otro ácido graso en los suplementos nutricionales a base de DHA, el ácido fitánico, que presenta un potente efecto neurotóxico.

6. El ácido fitánico

El ácido fitánico ($C_{20}H_{40}O_2$) es un ácido graso saturado de cadena larga ramificada, procedente del fitol. El fitol es un alcohol muy abundante en la naturaleza, componente de la clorofila presente en hojas verdes de plantas y árboles. El sistema digestivo humano no es capaz de escindir el fitol del anillo porfirínico de la clorofila, pero las bacterias del rumen de los rumiantes, así como en el zooplancton marino, sí son capaces de realizar esta acción. En estos animales, el fitol liberado por las bacterias se puede convertir posteriormente en un ácido graso saturado de cadena ramificada, el ácido 3, 7, 11, 15-tetrametil hexadecanoico o ácido fitánico (AF). Por lo tanto, la carne y los productos lácteos de los rumiantes son fuentes ricas de AF (Wanders y col., 2011). Además, el zooplancton es consumido por los animales herbívoros acuáticos, haciendo así que el fitol esté presente en todos los animales del ecosistema marino. Esto da lugar a la presencia de valores considerables de AF en los niveles superiores de la cadena alimentaria marina, como moluscos, peces, ballenas, etc. y en particular en las grasas y aceites derivados de estas especies (Wanders y col., 2010). En los seres humanos, la mayor parte del AF plasmático proviene del ingerido con la dieta (Hellgren, 2010).

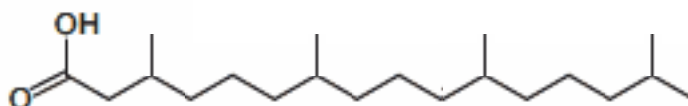


Figura 4. Estructura química del ácido fitánico ($C_{20}H_{40}O_2$)

El AF, a diferencia de otros ácidos grasos, no puede someterse al proceso de β -oxidación, debido a la presencia del primer grupo metilo en la posición 3 de la

cadena carbonada. En su lugar, el AF inicia su metabolización en los peroxisomas mediante el mecanismo de α -oxidación, transformándose en el ácido pristánico (2, 6, 10, 14-tetrametil pentadecanoico) y una molécula de CO₂. El pristánico es un ácido graso que puede sufrir los ciclos secuenciales de la β -oxidación en los peroxisomas y las mitocondrias (Wanders y col., 2010; Wanders y col., 2011). La aparición de trastornos peroxisomales da lugar a niveles elevados de AF en los tejidos y fluidos corporales que desencadenan procesos patológicos, como el síndrome de Zellweger o la enfermedad de Refsum (Wierzbicki, 2007; Van Veldhoven, 2010). Los pacientes con la función de los peroxisomas alterada y metabolismo aberrante de AF, experimentan con frecuencia complicaciones clínicas graves, que varían desde trastornos neurológicos a problemas cardiovasculares (Wanders, 2001; Wierzbicki, 2004). Se ha demostrado, que en condiciones fisiológicas, un aumento de las concentraciones de AF, aunque sea pequeño, tiene numerosos efectos perjudiciales en el SNC (Schonfeld y Wojtczak, 2007; Busanello y col., 2013).

6.1. Efectos neurotóxicos del ácido fitánico

Con el fin de explicar las propiedades tóxicas del AF, se propusieron inicialmente dos mecanismos posibles (Steinberg, 1995). El primero, llamado *hipótesis de la distorsión molecular*, propone que la toxicidad del AF es el resultado de su incorporación a las membranas alterando algunas de sus propiedades, como la disposición de los lípidos y la interacción entre lípidos y proteínas. El AF reduciría la fluidez de las membranas y la plasticidad neuronal, alterando el correcto funcionamiento de las neuronas (Van der Brink y Wanders, 2006; Wanders y col.,

2010). Y el segundo, *la hipótesis anti-metabolito*, basada en que la estructura molecular del AF muestra similitudes con las vitaminas A, E, K, y el geranylgeraniol, por lo que el AF podría actuar como un anti-metabolito con respecto a estos isoprenoides. El hecho de que las graves deficiencias Vitamina E se asocien con procesos degenerativos en retina y tejido neuronal, similares a los producidos por niveles elevados de AF en el organismo, se ha tomado como argumento a favor de esta hipótesis anti-nutriente, aunque la evidencia experimental apoyando a esta teoría es escasa (Wanders y col., 2010).

Actualmente, diversos autores han demostrado que el AF ejerce múltiples efectos en diferentes objetivos celulares (Kitareewan y col., 1996; Lemotte y col., 1996; Ellinghaus y col., 1999; Zomer y col., 2000), y que afecta a la dinámica de los fosfolípidos en las membranas, así como al estado físico de las proteínas de membrana (Schönfeld y Struy, 1999). Además, en el SNC, la incorporación de ácidos grasos de cadena larga ramificada, como el AF, a las membranas neuronales supone una falta de respuesta de los factores neurotróficos, como el BDNF, un aumento de la permeabilidad de los canales de calcio y un incremento de la muerte neuronal (Powers, 2001). El AF se incorpora también a las membranas de la glía, aumentando su permeabilidad al calcio extracelular. Este hecho aumenta la producción de EROs, y favorece la aparición de inflamación en el SNC (Gutknecht, 1988).

Pero el AF, no sólo se incorpora a las membranas celulares, sino también a las membranas mitocondriales alterando su función, hecho que se asocia con varias enfermedades neurodegenerativas como la EA (Schönfeld y Struy, 1999). El AF presenta un efecto protonóforo, ya que desacopla la enzima ATP-sintetasa de la cadena respiratoria de transporte de electrones, reduciendo así la generación de

ATP y deteriorando la función sináptica (Komen y col., 2007; Schonfeld y Wojtczak, 2007; Busanello y col., 2013), incluso con concentraciones muy bajas de AF (μmol) (Schönfeld y Reiser, 2006; Grings y col., 2012). Dado que la neurona constituye un tejido con un alto gasto energético, esta disminución de ATP da lugar a un efecto neurotóxico muy importante (Schönfeld y Bohnensack, 1997; Schönfeld y Reiser, 2016). Como consecuencia de la disminución del transporte de electrones y el aumento de la permeabilidad al calcio de las membranas mitocondriales, aumenta la generación de EROs en las neuronas, el estrés oxidativo en el SNC y los procesos apoptóticos o de muerte neuronal (Zomer y col., 2000; Schönfeld y col., 2006; Röncke y col., 2009; Schönfeld y Reiser, 2016).

En base a los diversos estudios, cuando el tejido neuronal se enriquece con AF, aparecen múltiples perturbaciones directas en la función neuronal, glial y mitocondrial, favoreciendo el desarrollo de procesos neurodegenerativos. Los suplementos nutricionales de DHA presentan un 1% de AF en su composición, y por ello podrían no haber sido efectivos en los ensayos clínicos previo.



V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

7. Hipótesis

La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas de mayor incidencia en la actualidad. La búsqueda de tratamientos eficaces frente a la aparición y el avance de esta patología requiere la búsqueda de nuevas perspectivas terapéuticas. Numerosos estudios experimentales apuntan al ácido docosahexaenoico (DHA) como posible protector de la función cerebral y el proceso neurodegenerativo. Sin embargo, los ensayos clínicos con suplementos de DHA utilizados para la prevención o el tratamiento de la EA no han sido concluyentes. Esta falta de resultados positivos podría deberse en parte, a que los suplementos de DHA utilizados contienen cantidades elevadas de ácido fitánico (AF), un ácido graso con un potente efecto neurotóxico. Por ello, cabría esperar que un DHA con muy baja concentración de AF sería capaz de mejorar la función cognitiva y los efectos neurodegenerativos asociados a la EA.

8. Objetivos

8.1. Objetivo general

Comparar los efectos de un DHA con baja concentración de AF con un DHA con alta concentración de AF sobre los principales parámetros relacionados con el proceso neurodegenerativo en ratones ApoE^{-/-}, como modelo experimental de la EA, en ratones C57BL/6, como grupo de referencia, y en cultivos celulares de microglía de ratón.

8.2. Objetivos específicos

- 1.- Estudiar los parámetros relacionados con el proceso cognitivo y la memoria en ratones alimentados con una dieta enriquecida con un DHA con 50 ó 1000 ppm de AF.
- 2.- Estudiar la actividad de la β -secretasa en el hipocampo de ratones alimentados con una dieta enriquecida con un DHA con 50 ó 1000 ppm de AF.
- 3.- Estudiar la expresión proteica del péptido $A\beta$, la proteína tau, p-tau y el BDNF en el hipocampo de ratones alimentados con una dieta enriquecida con un DHA con 50 ó 1000 ppm de AF.
- 4.- Estudiar la expresión proteica de la IL-6, el TNF- α y la iNOS en el hipocampo de ratones alimentados con una dieta enriquecida con un DHA con 50 ó 1000 ppm de AF. Así mismo, la expresión proteica de la COX-2, la IL-6, el TNF- α y la iNOS se determinará en cultivos de microglía activada incubados con un DHA con 50, 100 ó 500 ppm de AF.
- 5.- Estudiar la expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa y las enzimas antioxidantes SOD 1, catalasa, GPx y GRd en el hipocampo de ratones alimentados con una dieta enriquecida con un DHA con 50 ó 1000 ppm de AF. Así mismo, la expresión proteica de dichos biomarcadores, y la producción del anión superóxido, serán determinados en cultivos de microglía activada incubados con un DHA con 50, 100 ó 500 ppm de AF.
- 6.- Estudiar la expresión proteica de la caspasa-3 en el hipocampo de ratones alimentados con una dieta enriquecida con un DHA con 50 ó 1000 ppm de AF. Así mismo, la expresión proteica de la caspasa-3 y la supervivencia celular se

determinarán en cultivos de microglía activada incubados con un DHA con 50, 100 ó 500 ppm de AF.



VI. MATERIAL Y MÉTODOS

9. Modelo experimental animal

9.1. Diseño experimental

El estudio se llevó a cabo con 54 ratones macho (Taconic Biosciences Inc., Bomholtvej, Dinamarca) de 4 semanas de vida y con un peso inicial de 17 ± 2 g. Se utilizaron dos cepas de ratones: ratones C57BL/6 (*Mus musculus*) y ratones transgénicos ApoE deficientes (ApoE^{-/-}), divididos en 6 grupos de 9 ratones cada uno, tratados con DHA (Natac Biotech, S.L. Madrid, España) con dos concentraciones diferentes de ácido fitánico (AF; Sigma Aldrich Corp., St. Louis, Misuri, EE.UU.), incluidos en la dieta.

- ❖ Ratones silvestres C57BL/6 alimentados con una dieta sintética estándar AIN-93G, óptima para el crecimiento (Reeves y col. 1997), con un 7% de grasa:
 1. Control: grasa de la dieta libre de DHA.
 2. DHA+AF 50: grasa de la dieta con un 10% de DHA; 50 mg de AF/kg DHA.
 3. DHA+AF 1000: grasa de la dieta con un 10% de DHA; 1000mg de AF/kg DHA.
- ❖ Ratones ApoE^{-/-} utilizados como modelo de EA (Avdesh y col., 2011), alimentados con una dieta sintética enriquecida con un 21% grasa:
 4. ApoE^{-/-}: grasa de la dieta libre de DHA.
 5. ApoE^{-/-}+DHA+AF 50: grasa de la dieta con un 10% de DHA; 50 mg de AF/kg DHA.
 6. ApoE^{-/-}+DHA AF 1000: grasa de la dieta con un 10% de DHA; 1000mg de AF/kg DHA.

A continuación, se muestra un esquema de los grupos experimentales (Figura 5).

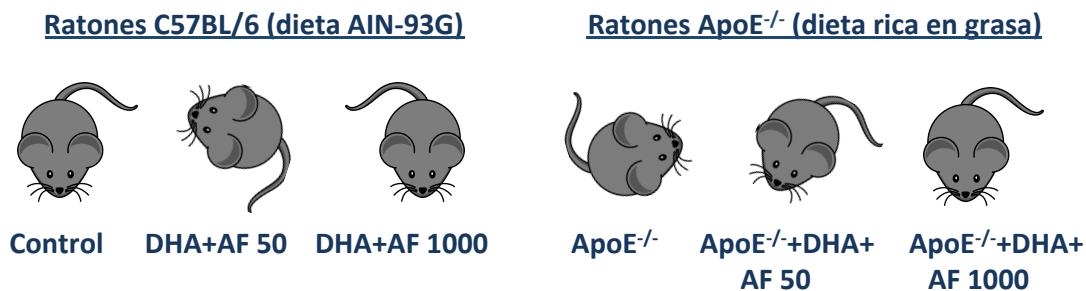


Figura 5. Esquema representativo de los grupos experimentales utilizados en este estudio.

El período de evolución fue de 10 semanas durante las cuales los animales tuvieron acceso libre al agua y una administración de la dieta controlada y pesada cada día, con el fin de conseguir una dosificación del tratamiento y un aporte de calorías y nutrientes uniforme en todos los grupos. A lo largo del periodo de evolución, los animales fueron pesados semanalmente.

9.2. Formulación y elaboración de las dietas

Se formularon y elaboraron dos tipos de dietas sintéticas, en función de las necesidades de cada modelo experimental. En ambas dietas, como fuente de grasa, se utilizó aceite de oliva refinado (Vinos y Aceites Laguna, S.L. Villaconejos, Madrid) suplementado en los grupos tratados con 10% de DHA+AF 50 (50 mg de AF/kg DHA) o DHA+AF 1000 (1000 mg de AF/kg DHA).

Para los ratones C57BL/6 se elaboró una dieta tipo AIN-93G (Reeves y col. 1997) que contenía 70 gramos de grasa por kilogramo de dieta, aproximadamente el 16 % de las calorías aportadas. La elaboración se llevó a cabo siguiendo la composición presente en la Tabla 1, expresada en gramos de producto por kilogramo de dieta.

INGREDIENTES	PESO FRESCO	PESO SECO	PROTEÍNA	GRASA	FIBRA	MINERALES	VITAMINAS	HIDRATO DE CARBONO
CASEÍNA	-	200	200	-	-	-	-	-
L-CISTINA	-	3	3	-	-	-	-	-
GRASA	70	70	-	70	-	-	-	-
CELULOSA MICROCRISTALINA	-	50	-	-	50	-	-	-
AIN-93G-MX	35	35	-	-	-	35	-	-
AIN-93G-VX	10	10	-	-	-	-	10	-
ALMIDÓN	-	529.5	-	-	-	-	-	529.5
SACAROSA	-	100	-	-	-	-	-	100
TBHQ*	0.014	0.014	-	0.014	-	-	-	-
BITARTRATO DE COLINA	2.5	2.5	-	-	-	-	-	-
TOTAL g/kg		1000	203	70	50	35	10	629.5
% de Kcal			20	16				64

Tabla 1. Composición de la dieta de mantenimiento AIN-93G. *TBHQ: terbutil hidroquinona.

Los suplementos mineral (AIN-93G-MX) y vitamínico (AIN-93G-VX), así como todos los productos utilizados para la elaboración de la dieta, procedían de Dyets Inc. (Pensilvania, EE.UU.).

Para los ratones ApoE^{-/-} se elaboró una dieta rica en grasa que contenía 211 g/kg de dieta, aproximadamente el 41 % de las calorías aportadas. La elaboración se llevó a cabo siguiendo la composición presente en la Tabla 2, expresada en gramos de producto por kilogramo de dieta.

INGREDIENTES	PESO FRESCO	PESO SECO	PROTEÍNA	GRASA	FIBRA	MINERALES	VITAMINAS	HIDRATO DE CARBONO
CASEÍNA	-	200	200	-	-	-	-	-
L-CISTINA	-	3	3	-	-	-	-	-
COLESTEROL	-	1	-	1	-	-	-	-
GRASA	210	210	-	210	-	-	-	-
CELULOSA MICROCRISTALINA	-	50	-	-	50	-	-	-
AIN-93G-MX	35	35	-	-	-	35	-	-
AIN-93G-VX	10	10	-	-	-	-	10	-
ALMIDÓN	-	388.5	-	-	-	-	-	388.5
SACAROSA	-	100	-	-	-	-	-	100
TBHQ*	0.014	0.014	-	0.014	-	-	-	-
BITARTRATO DE COLINA	2.5	2.5	-	-	-	-	-	-
TOTAL g/kg		1000	203	211	50	35	10	488.5
% de Kcal			18	41				42

Tabla 2. Composición de la dieta rica en grasa. *TBHQ: terbutil hidroquinona.

En todas las dietas se mantuvo un ratio de ácidos grasos omega 6/omega 3 de 1. El análisis de los ácidos grasos de los aceites utilizados en la elaboración de las dietas, se realizó por triplicado siguiendo el método de Folch y col. (1957), según el procedimiento normalizado UNE EN ISO 5508:1990. Para ello, se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard Mod. 5890 serie II (Hewlett-Packard Pensilvania, EE.UU.), con detector de ionización de llama e inyector automático Hewlett-Packard Mod. 7673. (Hewlett-Packard, Pensilvania, EE.UU.).

9.3. Alojamiento y manipulación

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas sobre “Cuidado y utilización de animales de experimentación”, establecidas por la Unión Europea y recogidos en el Real Decreto 53/2013.

Los animales se mantuvieron las cinco primeras semanas en el animalario de la Facultad de Medicina de la UCM y las siguientes cinco semanas en el animalario de la Facultad de Psicología de la UCM, donde se alojaron en locales cerrados con unas condiciones ambientales controladas, conservando una temperatura constante de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) y una humedad relativa óptima (50-60%). Se mantuvo un sistema de iluminación que modulaba un ciclo de luz-oscuridad de doce horas (8 am–8 pm). Se realizaron controles semanales del peso corporal de los animales.

9.4. Estudios conductuales

Después de 6 semanas de tratamiento, se realizó una batería de pruebas para la determinación de los perfiles cognitivos y conductuales de los ratones en días consecutivos. La duración de las pruebas fue de 4 semanas. Previamente, los animales se sometieron a un entrenamiento durante los 7 días anteriores a las pruebas, para que se habituaran a la manipulación. Dicho entrenamiento comenzó con un acercamiento lento del experimentador, sujetando al animal por la parte proximal de la cola, tomándolo en la palma de la mano unos instantes y devolviéndolo suavemente a su jaula.

Todos los estudios conductuales se realizaron durante las 12 horas del período de oscuridad, en las que los ratones se encuentran más activos y sin que el investigador conociese la pertenencia de los ratones a los grupos experimentales.

Se utilizó una videocámara digital (HDR-CX625B Full, Sony, Madrid, España) para grabar las diferentes pruebas realizadas en cada uno de los animales del estudio.

9.4.1. Laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris evalúa los posibles déficits cognitivos de los ratones en el aprendizaje y memoria espacial, dos tareas que dependen fundamentalmente de la integridad de la función del hipocampo (Morris R., 1984). Los animales fueron entrenados para localizar una plataforma (de 10 cm de diámetro) sumergida en el agua 1 cm, en una piscina circular (70 cm de diámetro y 20 cm de profundidad; Figura 6). El agua era opaca, teñida con leche y su temperatura era controlada frecuentemente para que se mantuviera a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Vorhees y col. 2006). La sala presentaba señales visuales como referencia espacial, que ayudan al animal a orientarse y recordar la situación de la plataforma (Giné y col. 2013).

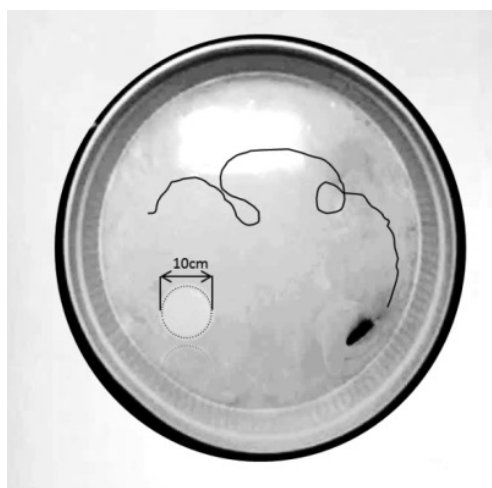


Figura 6. Esquema del equipo utilizado en la prueba del laberinto acuático de Morris.

Toda la prueba se realizó en oscuridad, bajo una luz roja de 60 W, que es invisible para los ratones. Los animales que no encontraron la plataforma en 60 segundos, fueron situados en ella durante 15 segundos, para que aprendieran a localizarla.

Esta prueba consta de tres fases:

1. Primera fase: fase de aprendizaje que duró 5 días, en la que los ratones tienen que aprender a orientarse y localizar dónde se encuentra la plataforma ligeramente sumergida. Para ello, se hicieron 4 ensayos con cada ratón de 5 minutos cada día, con un intervalo entre ensayos de 15 minutos. En cada ensayo, el ratón se mete en el agua por un cuadrante diferente de la piscina, para evitar que aprendan el camino, obligarles a situarse en el espacio y a memorizar la ubicación de la plataforma. Se contabilizó la *latencia* (el tiempo que tardan los ratones en llegar a la plataforma en cada ensayo).
2. Segunda fase: se realizó una prueba de memoria sin plataforma durante 1 minuto por ratón y se grabó en video para analizar posteriormente. En los vídeos se analizan tres parámetros o variables: 1) la *latencia* (el tiempo que tardan los ratones en ir al sitio exacto donde debería estar la plataforma), 2) el *número total de cruces*, es decir, las veces que alcanzarían la plataforma y 3) el *tiempo de permanencia*, es decir, los segundos que se mantiene el ratón en una circunferencia imaginaria de 30 cm de diámetro alrededor del lugar dónde estaría la plataforma.
3. Tercera fase: esta fase duró 3 días más. Se retiraron las referencias espaciales alrededor de la piscina y se colocó de nuevo la plataforma (Figura 7). Esta vez la plataforma no estuvo situada en un sitio fijo, sino que se localizó en diferentes cuadrantes, y además se le colocó una señal visual, que en este caso fue una pelota verde, para que los ratones la localizasen. Se realizaron de nuevo cuatro ensayos de 5 minutos por cada animal y día. La finalidad fue comprobar que ninguno de los ratones tenía dificultades al nadar, que presentaban un aprendizaje no espacial similar y que mostraban la misma motivación por escapar del agua.

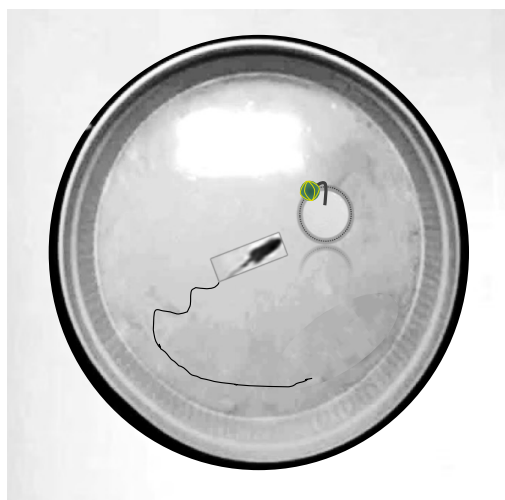


Figura 7. Esquema representativo del laberinto acuático de Morris con una señal visual en la plataforma.

9.4.2. Test de campo abierto

La prueba de campo abierto (Pietropaolo y col., 2008) es uno de los test clásicos en estudios conductuales en el que los animales se exponen a un ambiente nuevo, abierto e iluminado (Crawley, 1989; Walsh y Cummins, 1976). La conducta de los ratones está determinada por su interés y temeridad al explorar los espacios nuevos y su ansiedad en los mismos (Denenberg y col., 1968; Ferchmin y Eterovich, 1970; Ray y Hochhauser, 1969; Widmin y Rosellini, 1990). El equipo usado en este test, ubicado en el animalario de la Facultad de Psicología, estuvo formado por seis cajas de plástico blancas individuales (35 x 35 x 40 cm). Las cajas estaban conectadas a una interfase que permitió que los datos de actividad locomotora horizontal, vertical y total, fueran registrados por un ordenador IBM PC/XT 1562 (IBM, NY, USA), gracias a las 8 células fotosensibles que presentó cada caja (Figura 8). Los datos se analizaron mediante un programa informático (Software ILA Cibertec S. A. Madrid, España).

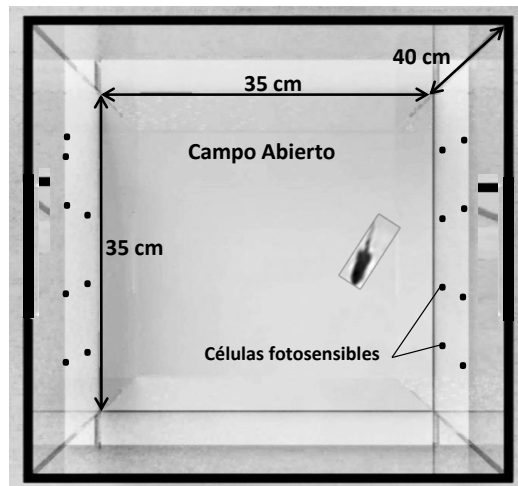


Figura 8. Esquema representativo del equipo utilizado en el test de campo abierto.

El primer día se llevó a cabo una habituación de cada animal a la sala, la caja y la intensidad de luz donde se realizaría el test, durante 15 minutos. A las 24 horas de la habituación, se realizó el estudio de la actividad locomotora registrando los movimientos horizontales y verticales de cada animal durante 30 minutos.

9.4.3. Test de natación forzada

Mediante el test de natación forzada se induce un estado de ánimo en los ratones semejante a la depresión (Porsolt y col., 1977). La inmovilidad exhibida por los animales se ha interpretado de forma clásica como desesperación conductual, aunque estudios recientes han determinado que un aumento del tiempo de inmovilidad de los ratones refleja una mejora en la capacidad de aprendizaje y de la memoria (Campus y col., 2015, West y col., 1990, Enginar y col., 2016).

Los ratones se depositaron individualmente, durante 6 minutos, en un vaso de precipitados (15 cm de alto y 9 cm de diámetro) lleno de agua a 24°C, de forma que no pudiesen tocar el fondo del vaso con sus patas. Se contabilizó el tiempo que se

mantenían inmóviles, sin intentar escapar, realizando solo los movimientos mínimos para mantenerse a flote (Overmier y Seligman, 1967).

9.4.4. Test de suspensión por la cola

El test de suspensión por la cola (Porsolt y col., 1977) es complementario al test de natación forzada y también evalúa el estado de depresión que puedan presentar los animales. Los roedores, suspendidos por la cola, tratan de escapar de esta situación de forma innata. Sin embargo, después de intentos fallidos, experimentan desesperación y se quedan inmóviles (Overmier y Seligman, 1967).

El tiempo que los ratones permanecieron completamente inmóviles, solo con movimientos respiratorios, se evaluó durante 5 minutos. Se considera que la magnitud de la inmovilidad está relacionada con el estado depresivo de los ratones (Porsolt y col., 1978), o al igual que el test de natación forzada, con una mejora en la capacidad de aprendizaje y de la memoria de estos animales.

9.5. Extracción y conservación de las muestras

Una vez realizadas las pruebas de conducta, con 14 semanas de edad y tras 18 horas de ayuno, los animales fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia vía intraperitoneal: Ketamina (Ketolar, Parke-Davis. Pfizer. Dublin, Irlanda) y Xilacina (Rompun, Lab. Bayer, Leverkusen, Alemania) 80-100 mg/kg + 10mg/kg. A continuación, se extrajeron los hipocampos de los ratones que se congelaron a -80°C inmediatamente después de la extracción. Las muestras de sangre se dejaron reposar durante al menos 2 horas en hielo y a continuación se centrifugaron a

2000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El suero obtenido se transfirió a tubos de polipropileno que se congelaron a -80°C hasta su posterior análisis.

9.6. Perfil lipídico, glucosa e insulina séricos

Las concentraciones séricas de colesterol total (CoT), HDL-colesterol (HDL-col), VLDL-colesterol (VLDL-col), triglicéridos (TG) y glucosa se midieron mediante técnicas espectrofotométricas, en un autoanalizador (Vitros Fusion 5.1, Diagnostics OrthoClinical, Johnson & Johnson, Nueva York, EE.UU.).

La concentración de LDL-colesterol (LDL-col) en suero se obtuvo a partir de la fórmula de Friedewald ($LDL\text{-col} = CoT - HDL - (TG/5)$), siendo la concentración de TG inferior a 400 mg/dL. Friedewald y col., 1972).

Los niveles de insulina en suero fueron determinados mediante un inmunoensayo enzimático (Mercodia High range mouse insulin ELISA, Uppasala; Suecia), técnica directa de sándwich, en la cual dos anticuerpos monoclonales están dirigidos contra determinantes antigénicos específicos presentes en la molécula de insulina. Durante la incubación, la insulina presente en la muestra reacciona con los anticuerpos anti-insulina conjugados con una peroxidasa. El conjugado unido se detecta mediante la reacción colorimétrica con el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Los resultados se leyeron en un espectrofotómetro (Reader UVM-340, ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) a una longitud de onda de 450nm. La sensibilidad periférica a la insulina se evaluó basándose en el modelo matemático de la homeostasis (HOMA) (Matthews y col., 1985), calculado como el producto de las concentraciones de insulina (mU/mL) y el nivel de glucosa (mmol/L) en ayunas, dividido entre 22.5.

9.7. Actividad de la β -secretasa BACE-1

La actividad de la enzima β -secretasa BACE-1 del hipocampo de los ratones se analizó mediante espectrometría de fluorescencia con un kit comercial *Beta Secretase Activity Assay Kit* (ab65357, Abcam, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los hipocampos fueron pesados (10mg) y lavados con PBS frío. El tejido se homogenizó con un homogeneizador de vidrio Dounce (Sigma-Aldrich Química. SA, Madrid, España) y 3 volúmenes de un tampón de extracción. Las muestras se dejaron incubar durante 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 13000 rpm y 4°C, durante 4 minutos, para eliminar cualquier material insoluble. A continuación, la concentración proteica de las muestras se analizó mediante la técnica colorimétrica de Bradford con el reactivo azul de Coomassie comercial (Thermo Scientific Inc, Rockford, Illinois, EE.UU.). De esta forma, se añadió la misma concentración de proteínas de cada muestra a una placa de 96 pocillos con el fondo oscuro, completando con el tampón de extracción hasta obtener el mismo volumen en cada pocillo. Para llevar a cabo el análisis, se añadió el tampón de reacción y el sustrato de la β -secretasa a cada pocillo, ambos reactivos incluidos en el citado kit comercial. Finalmente, la placa se incubó a 37°C durante una hora y se leyó la fluorescencia emitida por cada muestra mediante un lector de microplacas de fluorescencia Tecan Ultra Evolution (Tecan, Männedorf, Suiza) a una longitud de onda de excitación/emisión de 335/495 nm. La actividad de la BACE-1 de cada muestra de hipocampo, analizada por duplicado, fue proporcional al nivel de la intensidad de fluorescencia detectada.

10. Modelo experimental celular

10.1. Línea celular y condiciones de cultivo

Para la realización de los estudios *in vitro* se utilizaron células Bv-2, una línea transformada (v-raf/v-mic) de microglía de ratón obtenida a partir de Banca Biológica y *Cell Factory* (Centro di risorse biologiche. IST Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Génova).

Los ensayos celulares se realizaron en una campana de flujo laminar, con material estéril y en condiciones que garantizaran la ausencia de contaminación en el cultivo. Las células se cultivaron en monocapa con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) y penicilina/estreptomicina 1% (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).

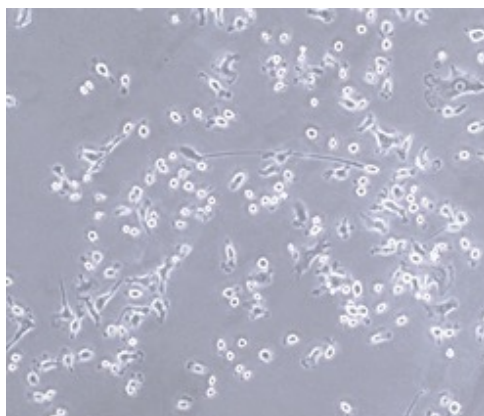


Figura 9. Imagen de un cultivo de células de microglía de ratón Bv-2 en fase 5, en microscopio óptico invertido de contraste de fases.

Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora (Modelo HERACELL 150i, Thermo scientific, Roskilde, Dinamarca) a 37°C en una atmósfera saturada de agua (90% de humedad relativa) con un 5% de CO₂.

Descongelación de las células

La descongelación de las células (2×10^6 células/vial) se realizó en un baño de agua digital (Modelo 601, Nahita, Madrid, España) a 37°C durante un minuto. A continuación se añadió medio completo RPMI 1640 y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos (Centrífuga Beckman, modelo TJ-6 con unidad de refrigeración, Madrid, España). El pellet obtenido se resuspendió en medio completo RPMI 1640 y se sembró en placas P100 estériles de poliestireno de 100mm de diámetro (Corning, Nueva York, EE.UU.).

Mantenimiento de la línea celular

Para llevar a cabo el mantenimiento y/o expansión de la línea celular se realizaron subcultivos o *pases* con una frecuencia de dos días, por la elevada capacidad proliferativa del cultivo. Para ello, en cada pase, se realizaba una tripsinización con 3 ml de tripsina-EDTA (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) durante 5 minutos a 37°C y a continuación se añadían 3 ml de medio completo RPMI 1640 para bloquear los efectos de la tripsina. Inmediatamente después, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió el pellet en el volumen deseado de medio completo RPMI 1640 para sembrar 500.000 células en cada placa P100. Los cultivos celulares se mantuvieron en todos los experimentos con una confluencia máxima de un 60%, para prevenir la activación de la microglía.

Congelación de las células

Para la congelación de células, se tripsinizaron con tripsina-EDTA 0.25% durante 5 minutos y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 1mL de FBS con dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Química, SA, Madrid, España) al 10%, y se traspasaron a un criovial estéril. Este compuesto actúa como un agente lipofílico que facilita la congelación posterior, pero a

temperatura ambiente resulta tóxico, por ello es necesario proceder a la refrigeración de los crioviales rápidamente a una temperatura de -20°C durante 24 horas. Posteriormente, a una temperatura de -80°C durante otras 24 horas y por último se almacenaron las muestras en N_2 líquido. Estos pasos permiten un enfriamiento paulatino de las células, preservando así la integridad de la membrana plasmática.

10.2. Ensayos celulares

Los estímulos empleados para la activación de las células microgliales Bv-2 fueron los siguientes:

- I. Lipopolisacárido (LPS): Uno de los componentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que actúa como un potente activador de las células del sistema inmune (L. Quin y col., 2004).
- II. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): Radical libre de oxígeno que produce estrés oxidativo (Yue Yan-Kun y col., 2014).

Para seleccionar las concentraciones óptimas de trabajo de los estímulos y los tratamientos en los experimentos desarrollados con esta línea celular, se realizó una dosis respuesta. Las concentraciones de LPS utilizadas en el estudio de dosis respuesta fueron: $0.01\mu\text{g/ml}$, $0.1\mu\text{g/ml}$ y $1\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones de H_2O_2 en el estudio de dosis respuesta fueron: 0.06mM , 0.08mM y 0.1mM de. Las concentraciones de los estímulos elegidas para el resto de ensayos celulares fueron aquellas para las que se obtuvo una mayor producción de anión superóxido comparado con el grupo control, pero manteniendo una supervivencia celular $\geq 80\%$. Las concentraciones seleccionadas fueron: $0.1\mu\text{g/ml}$ de LPS y 0.08mM de

H₂O₂. Las células fueron pre-incubadas con el DHA (Aldrich Corp., St. Louis, Misuri, EE.UU.) y el AF (Aldrich Corp., St. Louis, Misuri, EE.UU.) durante una hora antes de incubarse con los estímulos. Las células fueron co-incubadas con DHA combinado con 46, 100 ó 500 ppm de AF. El DHA se incorporó al cultivo en la cantidad necesaria para alcanzar una concentración de 5 µM en medio completo RPMI 1640. Los grupos experimentales de los ensayos realizados *in vitro* utilizando como estímulo LPS fueron los siguientes (Figura 10):

- Control: medio de cultivo.
- LPS: estimulado con 0.1 µg/ml de LPS.
- LPS+DHA+46ppmAF: estimulado con 0.1 µg/ml de LPS y pre-incubado con DHA + 46 ppm de AF.
- LPS+DHA+100ppmAF: estimulado con 0.1 µg/ml de LPS y pre-incubado con DHA + 100 ppm de AF.
- LPS+DHA+500ppmAF: estimulado con 0.1 µg/ml de LPS y pre-incubado con DHA + 500 ppm de AF.

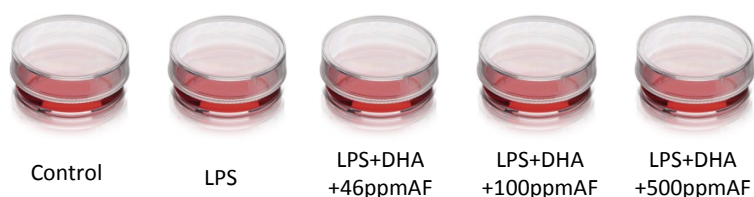


Figura 10. Esquema representativo de los grupos experimentales de células de microglía de ratón estimuladas con LPS.

Los grupos experimentales de los ensayos realizados *in vitro* utilizando como estímulo H₂O₂ se detallan a continuación (Figura 11):

- Control: medio de cultivo.
- H₂O₂: estimulado con 0.08mM de H₂O₂.

- H_2O_2 +DHA+46ppmAF: estimulado con 0.08mM de H_2O_2 y pre-incubado con DHA+ 50 ppm de AF.
- H_2O_2 +DHA+100ppmAF: estimulado con 0.08mM de H_2O_2 y pre-incubado con DHA + 100 ppm de AF.
- H_2O_2 +DHA+500ppmAF: estimulado con 0.08mM de H_2O_2 y pre-incubado con DHA + 500 ppm de AF.

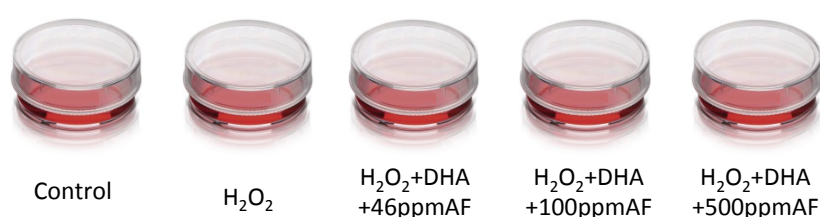


Figura 11. Esquema representativo de los grupos experimentales de células de microglía de ratón estimuladas con H_2O_2 .

10.3. Metodología experimental

10.3.1. Supervivencia celular

Para la determinación de la supervivencia celular en los diferentes grupos experimentales se utilizaron placas de 24 pocillos (Corning, Nueva York, EE.UU.), en las que se sembraron 500.00 células por pocillo, en 400 μ l de medio completo RPMI 1640. Al cabo de dos días, se realizó la pre-incubación de las células con los tres tipos de DHA. Una hora después, se añadió el estímulo y se incubó durante 24 horas. Una vez pasado ese tiempo, se retiró el medio, se lavaron los pocillos con PBS y se añadieron 200 μ l de tripsina-EDTA 0.25% a cada pocillo. Se incubó la placa 5 minutos a 37°C y a continuación se añadieron 200 μ l de medio completo RPMI 1640 para bloquear la acción de la tripsina. La supervivencia celular se

valoró mediante la cámara de Neubauer (Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Alemania). Una alícuota de las células teñidas con el colorante Trypan-Blue 0.4% (Sigma-Aldrich Química. SA, Madrid, España) se introdujo por capilaridad entre el cubreobjetos y la cámara para realizar el recuento de las células presentes en los cuadrantes de la cámara con un microscopio óptico invertido de contraste de fases (Nikon TMS, California, EE.UU.).

El resultado final se expresó como concentración de células por mililitro. Cada condición experimental se realizó por triplicado. Se cuantificó la supervivencia microglial como:

- Número de células vivas (por ml) = Promedio de células vivas x 10000 / 2
- Número total de células vivas = Número de células vivas (por ml) x ml
totales
- % Supervivencia = Número total de células vivas x 100 / Recuento total de células.

10.3.2. Producción de anión superóxido

Para valorar la producción de anión superóxido, se utilizó el método del dihidroetidio (DHE; Invitrogen, Nueva York, EE.UU.), que es un colorante fluorescente que reacciona con el anión superóxido como sonda para su detección. Se utilizaron placas de 48 pocillos (Corning, Nueva York, EE.UU.) en las que se sembraron 25000 células por pocillo, en 200 μ l de medio completo RPMI 1640.

Al cabo de dos días de la siembra se realizó la pre-incubación de las células con los tres tipos de DHA y una hora después se añadió el estímulo. Al día siguiente se añadieron 50 μ l de DHE a cada pocillo y se incubó 30 minutos en oscuridad a 37°C

en la incubadora. Una vez pasado ese tiempo, se lavaron los pocillos con PBS y se observaron en el microscopio electrónico de fluorescencia Leica DMI 3000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) a 40 aumentos (Ex561 nm y Em610 nm,) utilizando los mismos ajustes de imagen en todas las fotos realizadas de las diferentes condiciones experimentales (Gamma de 1, Ganancia de 1 y pseudocolor de 706nm).

El análisis cuantitativo de la producción de anión superóxido se realizó utilizando un sistema de análisis Leica LAS, 4,3 (Leica AG, Wetzlar, Alemania). Este sistema calcula las densidades de fluorescencia en color rojo de las imágenes de los diferentes pocillos de la placa, y se calculan las densidades de fluorescencia medias. Los resultados se refirieron al grupo control en porcentaje.

11. Estudio de la expresión proteica

11.1. Extracción de proteínas del hipocampo

Los cerebros de los ratones fueron diseccionados rápidamente una vez realizado el sacrificio, con ayuda de un bisturí estéril, aislando el hipocampo. Para la extracción de proteínas del hipocampo se utilizó el kit comercial Allprep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (Quiagen, Hilden, Alemania) y se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante, representadas en la figura 12.

El tejido se homogenizó en 400µl de tampón de lisis, con una jeringa de 0,9mm de diámetro, realizando 5 pases a través de ella. Se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 3 minutos, y se transfirieron a la columna de separación de DNA, quedando retenido éste en el filtro. Las proteínas y el ARN fluyeron a través del filtro y se trataron posteriormente con etanol absoluto para transferirlas a la

columna de separación del ARN. En el filtro de la columna quedó retenido el ARN, que se eluyó con diferentes tampones proporcionados por el fabricante. Por otro lado, las proteínas precipitaron con etanol y se diluyeron en otros tampones también proporcionados por el fabricante. Las proteínas se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se analizaron posteriormente mediante Western Blot.

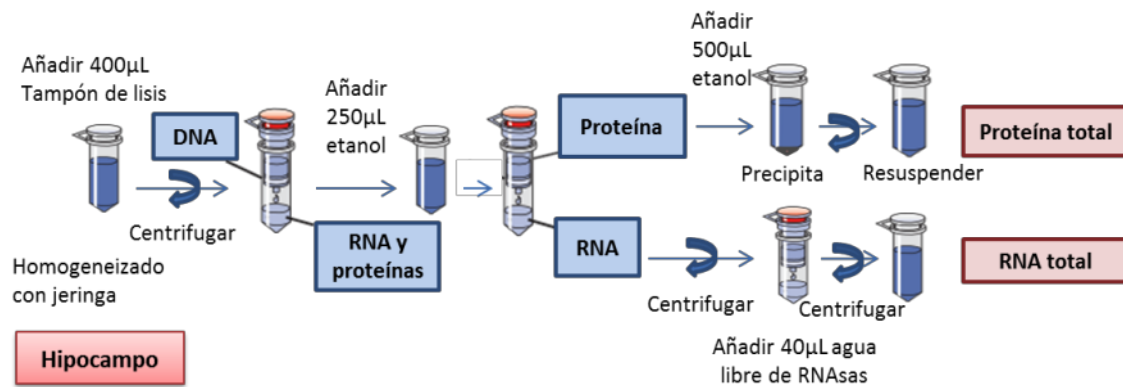


Figura 12. Esquema del procedimiento de extracción de las proteínas del hipocampo.

11.2. Extracción de proteínas de las células Bv-2

Para la extracción de las proteínas totales de las muestras procedentes de los cultivos celulares se utilizaron 10 ml del tampón de homogeneización (Tris 20mM, NaCl 150mM y Tritón x-100 al 1%) al que se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). El procedimiento se realizó en frío. En primer lugar, se lavó la monocapa de células con PBS frío dos veces y se añadió 10 ml de PBS. A continuación, utilizando levantadores de células de plástico lavados con etanol absoluto entre placa y placa, se levantó la monocapa de células. El homogeneizado resultante se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C . El pellet obtenido se resuspendió en 85 µL del

tampón de homogeneizado, se agitó en el vórtex durante 30 segundos para facilitar la ruptura de la membrana plasmática y la extracción de las proteínas, y finalmente se congeló a -20°C .

Al día siguiente, se centrifugó a 12000 rpm durante 3 minutos, para eliminar proteínas asociadas a la membrana plasmática. El sobrenadante se guardó a -80°C después de realizar la cuantificación de las proteínas, para su posterior análisis mediante la técnica Western Blot.

11.3. Cuantificación de proteínas

La concentración de las proteínas del hipocampo y de los cultivos celulares se cuantificó mediante la técnica colorimétrica de Bradford con el reactivo azul de Coomassie comercial (Thermo Scientific Inc, Rockford, Illinois, EE.UU.). En cada ensayo se realizó una curva patrón, con concentraciones crecientes conocidas de albúmina de suero bovino (BSA, Thermo scientific, Rockford, Illinois, EE.UU.). Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Reader UVM-340, ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) a una longitud de onda de 595nm.

11.4. Electroforesis y transferencia

Las proteínas fueron desnaturalizadas con $10\mu\text{L}$ del tampón Laemmli, que contenía dodecilsulfato sódico (SDS) al 20% y β -mercaptoetanol, agentes que desnaturalizan las estructuras terciarias y secundarias proteicas que no están unidas con puentes disulfuro. A continuación, se calentaron durante 5 minutos a 95°C en un termobloque (Dry bath FB15103, Fischer Scientific, Madrid, España),

para una completa desnaturalización, que permitió a las proteínas migrar en un campo eléctrico y separarse según su masa y tamaño.

Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida-SDS compuestos por un gel concentrador, que concentró las proteínas de las muestras y un gel separador que permitió que las proteínas se separasen según su tamaño molecular. El porcentaje de acrilamida del gel separador se elaboró en función de las necesidades de cada tipo muestral y del tamaño de la proteína a analizar. La electroforesis se llevó a cabo bajo condiciones reductoras. Se utilizó un amperaje constante de 50mA (PowerPac HC High-Current Power Supply, Bio-Rad Laboratories, California, EE.UU.).

Tras la separación de las proteínas presentes en cada muestra, se procedió a la transferencia de las mismas a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, California, EE.UU.) mediante el paso de corriente eléctrica. Para ello, se utilizó la técnica de transferencia semiseca a un voltaje constante de 20V (Transfer-Blot turbo transfer system, Bio-Rad laboratories, California, EE.UU.).

Finalizada la transferencia, con el fin de verificar la eficacia del proceso, se realizó una tinción no permanente de la membrana con rojo Ponceau (Sigma Aldrich Química, Madrid, España). Para la inmunodetección, se bloquearon las membranas previamente con leche en polvo al 7,5% (p/v) y PBS con tween-20 al 0,05% (v/v), durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave, de forma que se saturan todos los sitios inespecíficos de unión de proteínas en la membrana. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios, detallados en la tabla 3, disueltos en leche en polvo al 5% (p/v) y PBS con tween-20 al 0,05% (v/v) durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Éstos se unen a la proteína que buscamos de forma específica.

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
ANTICUERPO	PROTEÍNA	DILUCIÓN	REFERENCIA
β-actina	Beta actina	1:10000	A5441, Sigma Aldrich Química, Madrid, España
APP	Péptido precursor de β -amiloide	1:10000	ab32136, Abcam, Reino Unido
Aβ	Péptido β -amiloide	1:1000	ab2539, Abcam, Reino Unido
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro	1:200	sc-20981, Santa Cruz Biotechnology, Alemania
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulina quinasa II	1:5000	ab52476, Abcam, Reino Unido
Cas-3	Caspasa-3	1:1000	ab2302, Abcam, Reino Unido
Catalasa	Catalasa	1:1000	ab76110, Abcam, Reino Unido
COX-2	Ciclooxigenasa 2	1:750	12282 CellSignaling, EE.UU.
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	1:10000	D16H11, Cell signaling technology, EE.UU.
GPx	Glutation peroxidasa	1:1000	ab108427, Abcam, Reino Unido
GRd	Glutation reductasa	1:1000	ab124995, Abcam, Reino Unido
IL-6	Interleuquina 6	1:100	Ab25072, Abcam, Reino Unido
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible	1:300	ab3523, Abcam, Reino Unido
SOD-1	Superóxido dismutasa	1:2500	ab13498, Abcam, Reino Unido
p22phox	Subunidad p22phox de la NADH oxidasa (NOX)	1:500	sc-20781, Santa Cruz Biotech, EE.UU.
p-tau	Proteína tau fosforilada Ser ³⁹⁶	1:250	ab109390, Abcam, Reino Unido
tau	Proteína tau	1:5000	ab32057, Abcam, Reino Unido
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa	1:750	ab3467, Abcam, Reino Unido

Tabla 3. Tabla de anticuerpos primarios utilizados en este estudio.

A continuación, se lavaron las membranas para eliminar el exceso de anticuerpos primarios, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con una peroxidasa (tabla 4).

ANTICUERPOS SECUNDARIOS		
ANTICUERPO	DILUCIÓN	REFERENCIA
Anti-Ig G de ratón	1:5000	NA931; GE Healthcare, Reino Unido
Anti-Ig G de conejo	1:5000	NA934; GE Healthcare, Reino Unido
Anti-Ig G de cabra	1:1000	sc-2020; Santa Cruz Biotech, EE.UU.

Tabla 4. Tabla de anticuerpos secundarios utilizados en este estudio.

11.5. Western blot

El revelado de las membranas se llevó a cabo mediante una técnica basada en el método de detección de la peroxidasa, utilizando el kit de detección quimioluminiscente ECL (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE.UU.). La detección de quimioluminiscencia y su posterior densitometría y cuantificación se realizó utilizando el sistema informático GeneGnome5 (Syngene Bio Imaging; Synoptics Ltd. CB, Reino Unido). Las proteínas constitutivas β -actina y GAPDH se utilizaron como control de carga. Los resultados se expresaron como % de variación frente a los valores del grupo control en unidades densitométricas arbitrarias.

12. Análisis estadístico

Todos los resultados de este estudio se expresaron como la media \pm el error estándar de la media. Las comparaciones de variables individuales se realizaron mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple de medias (test de Newman-Keuls). Un valor de p menor de 0,05 se consideró significativo. Todos los análisis y los gráficos se realizaron utilizando el programa Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc. CA, EE.UU.).



VII. RESULTADOS

13. Efectos del DHA con baja concentración de AF en ratones ApoE^{-/-} como modelo experimental de la Enfermedad de Alzheimer

13.1. Efectos del DHA+AF 50 sobre las alteraciones cognitivas en comparación con el DHA+AF 1000 en ratones ApoE^{-/-}

13.1.1. Laberinto acuático de Morris

En el laberinto acuático de Morris se evaluó la memoria espacial a largo plazo y el proceso de aprendizaje de los diferentes grupos de ratones, midiendo el tiempo que tardan en llegar nadando a una plataforma ligeramente sumergida en el agua del laberinto.

En la fase I, los ratones ApoE^{-/-} necesitaron un tiempo de aprendizaje significativamente mayor que los ratones Control, y estas diferencias se hicieron máximas en el cuarto y quinto día de la prueba, como se observa en la Figura 13A. Los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 presentaron una capacidad de aprendizaje mayor que los ApoE^{-/-} y los ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000. Estas diferencias se mantienen hasta el último día de la prueba, siendo los ratones ApoE^{-/-} y los ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 los grupos con menor capacidad de aprendizaje (Figura 13A). Por otro lado, los ratones de los grupos Control, DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 no presentaron diferencias significativas entre ellos, en el tiempo de aprendizaje a lo largo de los 5 días de la prueba (Figura 13B).

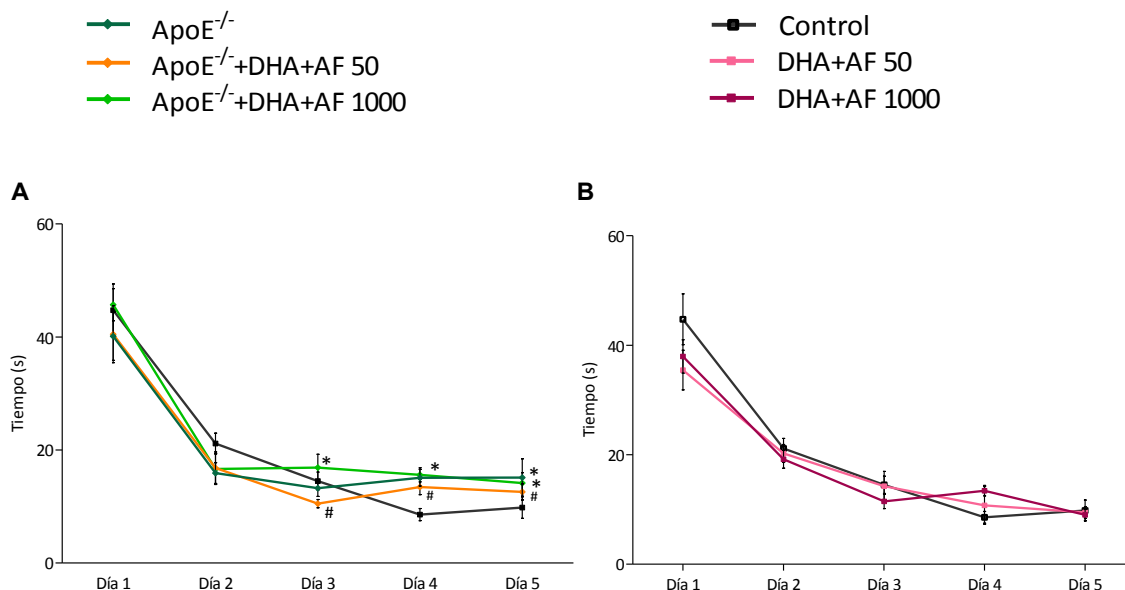


Figura 13. Tiempo de latencia en segundos en cada día de entrenamiento del test del laberinto acuático de Morris de A) ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000, y B) ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, Los datos están expresados como la media.

En la segunda fase del test, al comprobar la memoria espacial a largo plazo, el tiempo de latencia aumentó significativamente en los ratones ApoE^{-/-} frente a los ratones del grupo Control, y disminuyó en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 hasta normalizar con el Control (Figura 14A). La latencia no varió de forma significativa en los grupos DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 en comparación al Control.

En cuanto al número de cruces realizados por los ratones sobre el lugar de donde se había retirado la plataforma, se observó que los ratones ApoE^{-/-} cruzaron sobre ella menos veces que los ratones del grupo Control. No obstante, en los ratones ApoE^{-/-} la administración de DHA+AF 50 produjo un ligero aumento del número de cruces, hasta casi igualarlo con el grupo Control. En el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 no se observó este aumento. Por otro lado, este parámetro no se modificó en los ratones DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 respecto al grupo Control (Figura 14B).

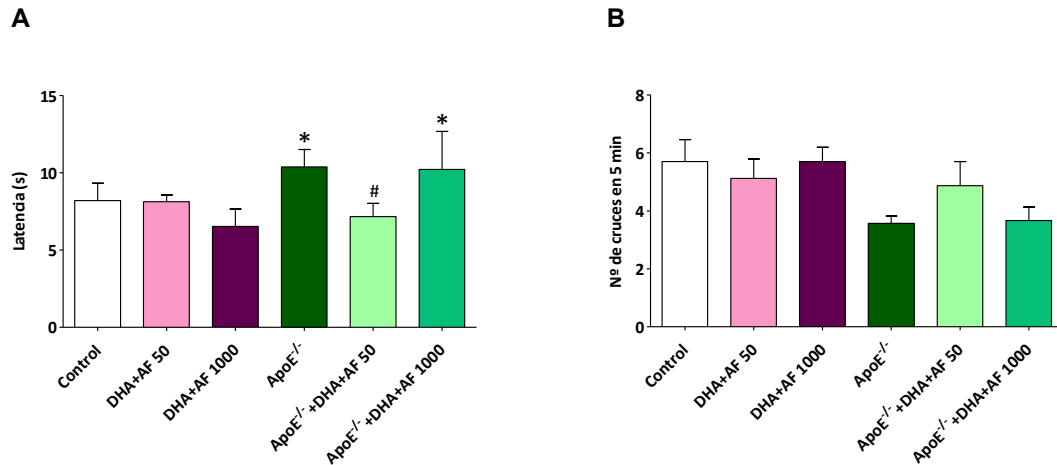


Figura 14. A) Tiempo de latencia en segundos y B) número de cruces sobre el lugar de la plataforma en los 5 minutos del test del laberinto acuático de Morris de los ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000 en 6 minutos de prueba. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-}.

La figura 15 representa el tiempo de permanencia de los animales en un anillo imaginario alrededor del lugar donde estuvo situada la plataforma. Los ratones del grupo ApoE^{-/-} permanecieron en dicho anillo una media de 11 segundos, un tiempo significativamente menor al del grupo Control. Este tiempo de permanencia aumentó de forma significativa hasta normalizar con el Control en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, en comparación con el grupo ApoE^{-/-}. Sin embargo, los ratones del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 presentaron valores similares a los ratones ApoE^{-/-}. Por otro lado, los ratones de los grupos Control, DHA+AF 50 y DHA+AF 1000, permanecieron en dicho anillo alrededor de 15 segundos de media, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 15).

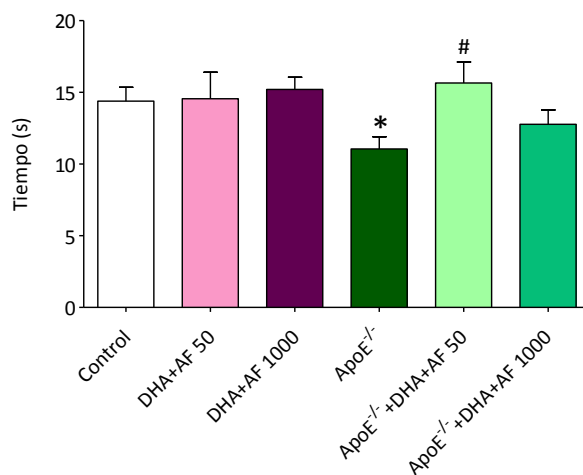


Figura 15. Tiempo de permanencia en segundos, durante el minuto de la prueba del laberinto acuático de Morris, de los ratones ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs ApoE^{-/-}.

En la tercera fase del test, en la que se retiran las referencias espaciales de la piscina, se contabilizó de nuevo el tiempo de latencia para descartar trastornos no asociados a la memoria espacial. En esta fase, todos los grupos estudiados tuvieron un aprendizaje no espacial similar, mostraron la misma motivación por escapar del agua y no presentaron ninguna dificultad al nadar (Figura 16).

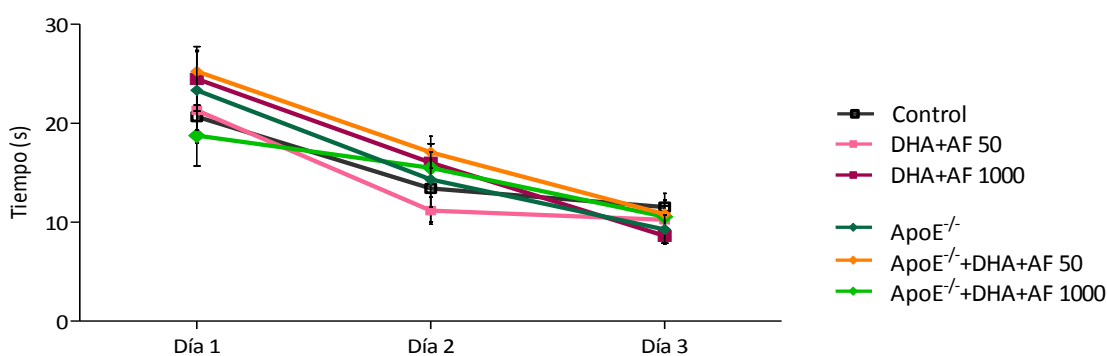


Figura 16. Tiempo de latencia en segundos, durante el minuto de la prueba del laberinto acuático de Morris, de los ratones ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs ApoE^{-/-}.

13.1.2. Test de campo abierto

Todos los grupos de ratones ApoE^{-/-} presentaron una disminución en la actividad espontánea de exploración con un menor número de movimientos tanto horizontales como verticales, en comparación con el grupo Control (Tabla 5). Esta marcada hipoactividad en el test de campo abierto fue similar de los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 fue similar a los valores de actividad del grupo ApoE^{-/-} (Figura 17).

	Control	DHA+AF 50	DHA+AF 1000	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-} +DHA+AF 50	ApoE ^{-/-} +DHA+AF 1000
Horizontal	1481.9±61.8	1665.6±74.5	1497.3±59.2	1195.0±102.7*	1159.7±57.7*	1197.0±78.9*
Vertical	470.0±57.2	450.1±31.0	403.9±46.9	190.9±17.6***	173.2±17.8***	216.4±15.3***

Tabla 5. Movimiento horizontal y vertical de los ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; ***p<0.001 vs Control.

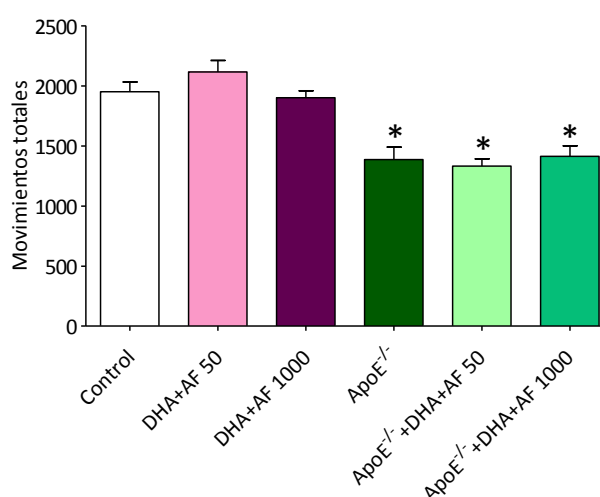


Figura 17. Movimientos totales de los ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.001 vs Control.

La actividad de los ratones en períodos de 5 minutos tuvo también un patrón de comportamiento diferente entre ApoE^{-/-} y los ratones silvestres. La actividad locomotora fue menor en los ApoE^{-/-}, ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 en los primeros 15 minutos de la prueba, que en los ratones Control, DHA+AF 50 y DHA+AF 1000, tendiendo a igualarse a partir de los 15 minutos (Figura 18). No hubo diferencias significativas de este parámetro entre los grupos DHA+AF 50 y DHA+AF 1000, ni los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000.

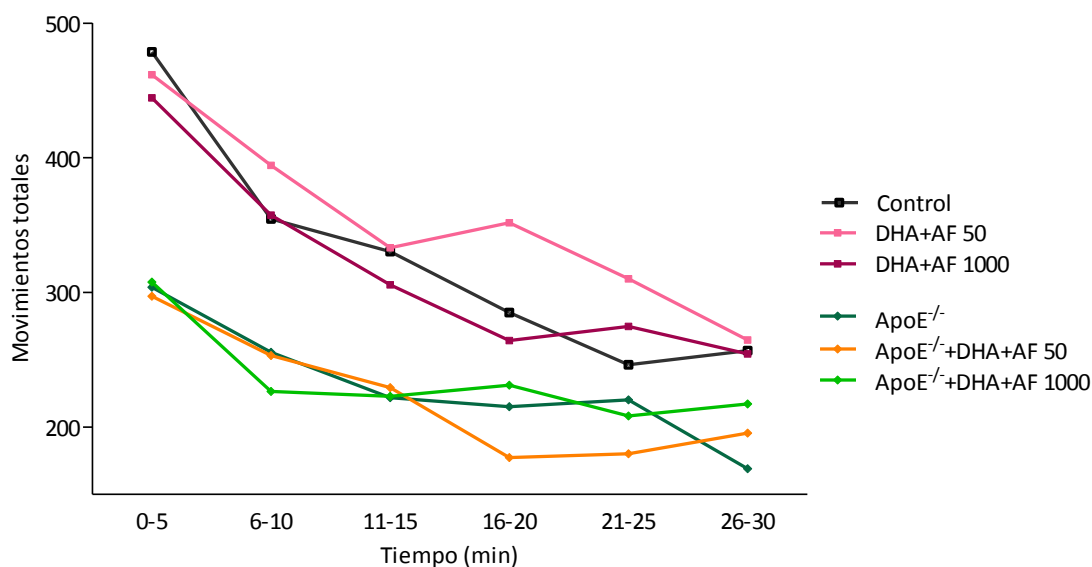


Figura 18. Número de movimientos en función del tiempo de los ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media.

13.1.3. Test de natación forzada y de suspensión por la cola

La inmovilidad exhibida por los animales en el test de natación forzada y en el test de suspensión por la cola se interpreta como desesperación conductual. En cuanto a la prueba de natación forzada, no hubo diferencias en el tiempo que los ratones

permanecieron inmóviles o realizando solamente los movimientos necesarios para mantenerse a flote entre los grupos del estudio (Figura 19).

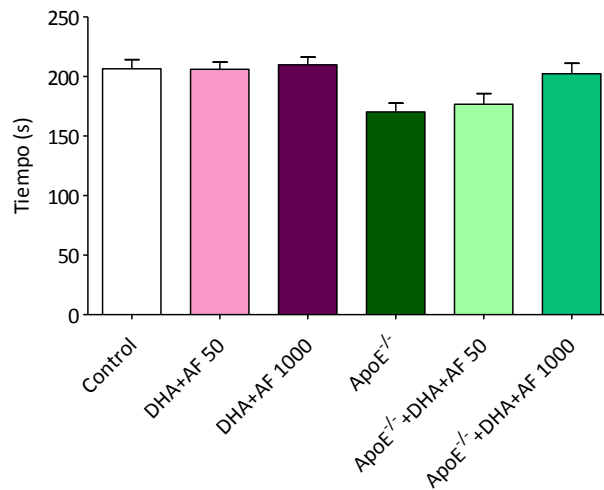


Figura 19. Tiempo de inmovilidad, en segundos durante los 4 últimos minutos del test de natación forzada, de los ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media.

En el test de suspensión por la cola, el grupo ApoE^{-/-} presentó un tiempo de inmovilidad significativamente menor que el del grupo Control, y este parámetro fue normalizado en los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. El grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 aumentó también significativamente el tiempo de inmovilidad en comparación con el grupo ApoE^{-/-}, pero sin llegar a normalizar con el Control. Los grupos DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 presentaron un tiempo de inmovilidad similar al Control (Figura 20).

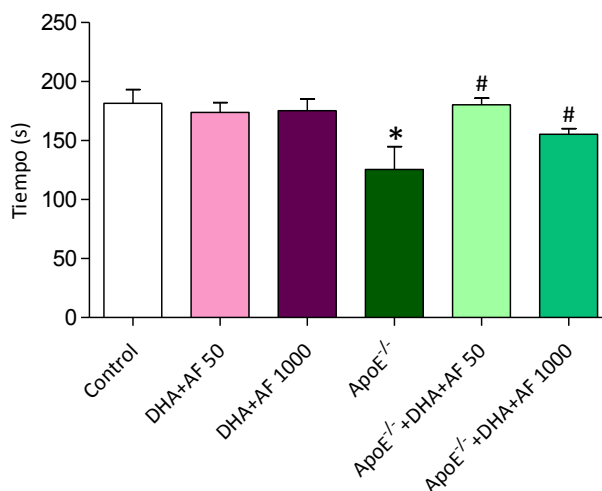


Figura 20. Tiempo de inmovilidad, en segundos, durante los 4 últimos minutos del test de suspensión por la cola, de los ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.01 vs ApoE^{-/-}.

13.2. Efectos del DHA+AF 50 sobre el peso corporal de los ratones ApoE^{-/-}

El peso corporal final fue comparable en todos los grupos experimentales sin diferencias significativas entre ellos y manteniendo un incremento de peso corporal similar a lo largo de las 10 semanas de evolución del estudio (Tabla 6).

(g)	Control	DHA+AF 50	DHA+AF 1000	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-} +DHA+AF 50	ApoE ^{-/-} +DHA+AF 1000
Peso corporal	30.11±0.92	29.58±0.53	27.81±0.52	30.48±1.73	28.58±0.45	29.32±0.76
Incremento peso corporal	10.15±0.88	11.11±0.50	8.71±0.51	10.02±0.76	8.45±0.66	9.01±0.96

Tabla 6. Peso corporal final e incremento de peso en gramos de los ratones ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media.

13.3. Efectos del DHA+AF 50 sobre las concentraciones séricas de lípidos en ratones ApoE^{-/-}

La concentración sérica tanto de colesterol total, como de LDL-col fue significativamente mayor en los ratones del grupo ApoE^{-/-} respecto a los valores obtenidos en el grupo Control. Los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 no presentaron diferencias significativas de colesterol total ni LDL-col frente al ApoE^{-/-}. Pero la concentración de colesterol total y LDL-col en suero no varió de forma significativa en los grupos DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 frente al Control (Tabla 7).

Los niveles séricos de HDL aumentaron significativamente en el grupo ApoE^{-/-} en comparación el Control. Los grupos de ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 presentaron unos niveles séricos de HDL-col similares al grupo de ratones ApoE^{-/-}. Sin embargo, la concentración de HDL disminuyó en los ratones DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 en comparación con el Control (Tabla 7).

En la tabla 7 se refleja además que los niveles séricos de VLDL-col y TG, tras aplicar la fórmula de Friedman, fueron similares en los ApoE^{-/-}, ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, DHA+AF 50, DHA+AF 1000 y el Control, pero fueron significativamente más altos en los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, en comparación con el resto de grupos experimentales estudiados (Tabla 7).

Por lo tanto, ante estos resultados lipídicos se supone que los ratones de los grupos ApoE^{-/-} y ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 desarrollaron una hiperlipidemia aislada, mientras que los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 presentaron una dislipemia mixta.

(mg/dl)	Control	DHA+AF 50	DHA+AF 1000	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/+} DHA+AF 50	ApoE ^{-/+} DHA+AF 1000
Colesterol total	138.7±22.3	85.33±3.4*	77.25±5.4*	570.4±7.9***	473.4±23.3*****	502.6±15.7*****
LDL-col	54.40±16.8	29.40±11.2	36.77±14.2	361.0±62.3** *	314.3±48.4*****	304.9±48.6*****
HDL-col	89.33±3.2	61.67±4.7**	62.00±5**	77.57±3.9	70.22±3.3*	80.57±5.4
VLDL-col	12.80±1.2	14.53±1.2	16.20±1.1*	10.14±0.9	13.36±1.4	21.40±2.0####
TG	64.00±6.1	65.17±3.3	77.29±5.1*	59.00±3.4	60.38±4.1	107.0±10.2*****

Tabla 7. Valores séricos (mg/dl) de colesterol total, LDL-col, HDL-col, VLDL-col y TG en ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; **p<0.01 vs Control; ***p<0.001 vs Control; #p<0.05 vs ApoE^{-/-}; ##p<0.01 vs ApoE^{-/-}; ###p<0.001 vs ApoE^{-/-}; \$p<0.05 vs ApoE^{-/+}+DHA+AF 50; \$\$p<0.01 vs ApoE^{-/+}+DHA+AF 50; \$\$\$p<0.001 vs ApoE^{-/+}+DHA+AF 50.

13.4. Efectos del DHA+AF 50 sobre las concentraciones séricas de glucosa, insulina e índice homa

La concentración de glucosa en sangre no varió significativamente entre los grupos de ratones estudiados. No obstante, el grupo ApoE^{-/+}+DHA+AF 50 mostró una tendencia a reducir los niveles plasmáticos de glucosa frente a los ratones ApoE^{-/-}, aunque las diferencias no fueron significativas (Tabla 8).

(mg/dl)	Control	DHA+AF 50	DHA+AF 1000	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/+} DHA+AF 50	ApoE ^{-/+} DHA+AF 1000
Glucosa	163.6±8.07	161.8±6.92	165.8±9.36	154.8±9.22	134.3±7.00	152.4±9.76
Insulina	12.30±0.76	11.84±1.01	11.81±0.84	10.13±0.64	10.72±0.46	11.15±0.65
Índice HOMA	5.27±0.48	4.66±0.27	4.80±0.51	3.92±0.49	3.19±0.32	4.20±0.39

Tabla 8. Concentración plasmática (mg/dl) de glucosa, insulina e índice HOMA en ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs ApoE^{-/-}.

Además, la concentración de insulina plasmática no presentó diferencias significativas entre los grupos de ratones estudiados y tampoco en el índice HOMA de resistencia a la insulina (Tabla 8).

13.5. Efectos del DHA+AF 50 sobre la actividad enzimática de la BACE-1 en el hipocampo de ratones ApoE^{-/-}

La actividad enzimática de la β -secretasa BACE-1 aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, en comparación con los grupos Control, ApoE^{-/-}, y el grupo de ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Asimismo, dicha actividad enzimática fue ligeramente mayor en el grupo DHA+AF 1000 respecto al grupo Control. El resto de grupos experimentales no vieron modificada la actividad de BACE-1 respecto al grupo Control (Figura 21).

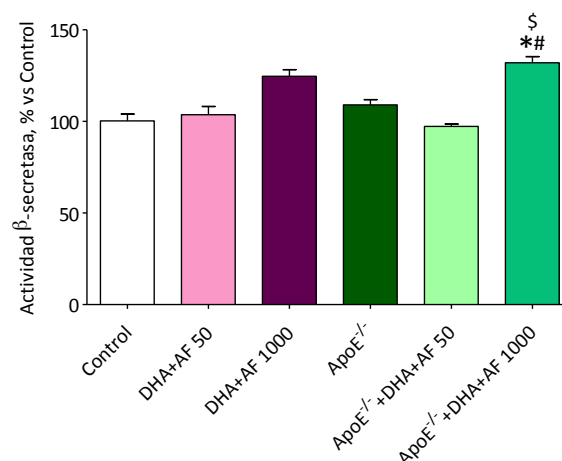


Figura 21. Actividad enzimática de la β -secretasa BACE-1 de los ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media.

13.6. Efectos del DHA+AF 50 sobre la expresión proteica de los biomarcadores de las alteraciones producidas en el hipocampo de ratones ApoE^{-/-} como modelo de la Enfermedad de Alzheimer

13.6.1. Péptido β - amiloide y proteína precursora

La expresión proteica de la APP aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo Control. La expresión de esta proteína disminuyó en los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 respecto a los ApoE^{-/-}. Aunque, los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 presentaron un aumento significativo de la expresión de la APP en comparación con los ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Por el contrario, los grupos DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 no revelaron diferencias en la expresión de la APP en comparación con el Control (Figura 22A).

La expresión del péptido A β aumentó en el hipocampo de ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo Control al igual que sucedió con la APP, y este parámetro se normaliza hasta casi los valores del grupo Control en los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000. No hubo diferencias significativas entre los grupos DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 en comparación con el Control (Figura 22B).

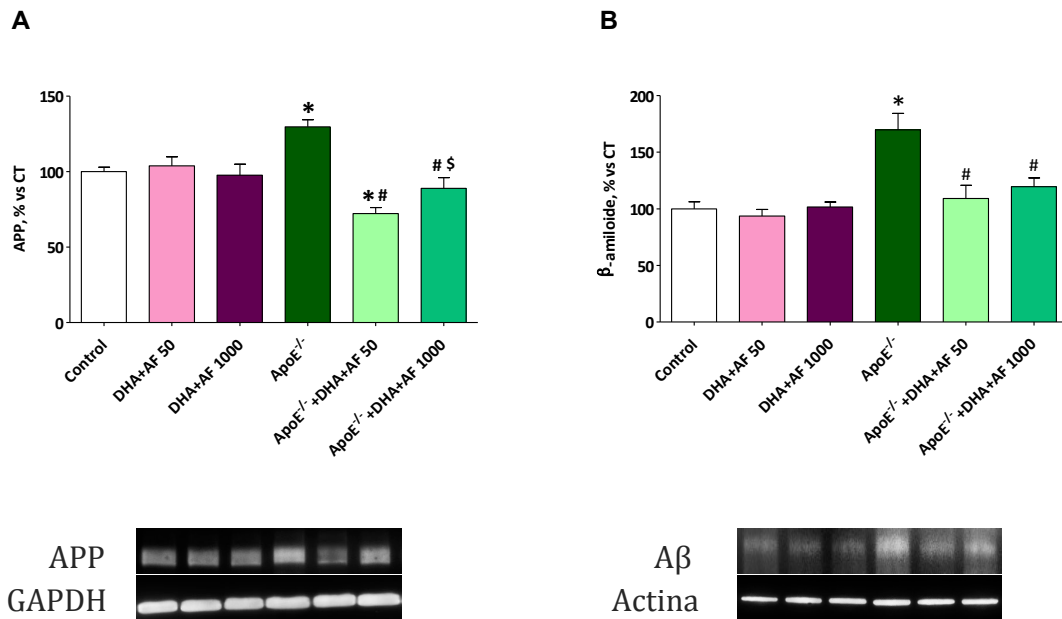


Figura 22. Expresión proteica de: A) La proteína APP y B) El péptido A β , en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. *p<0.001 vs Control; #p<0.001 vs ApoE^{-/-}; \$p<0.05 vs ApoE^{-/-}+DHA+AF 50.

13.6.2. Proteína tau total y tau fosforilada

La expresión proteica de tau total fue similar en todos los grupos experimentales, existiendo una ligera tendencia a disminuir en los grupos DHA+AF 50, DHA+AF 1000, ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 (Figura 23A). Se valoró también la expresión proteica en hipocampo de la proteína tau fosforilada en la serina 396 (p-tau^{S-396}), como indicador de la hiperfosforilación de tau característica de la EA. La expresión proteica de la p-tau^{S-396} aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto al Control. En los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, la expresión de p-tau^{S-396} disminuyó significativamente hasta valores similares al grupo Control. No hubo diferencias significativas entre la expresión proteica de p-tau^{S-396} en el hipocampo

de ratones DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 en comparación con el Control (Figura 23B). El ratio entre p-tau^{S-396} y tau total reveló un aumento significativo de dicha relación en el grupo ApoE^{-/-} comparado con el grupo Control, así como una disminución en los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 respecto al grupo de ratones ApoE^{-/-}. Los grupos DHA+AF 50 y DHA+AF 1000, presentaron valores del ratio p-tau^{S-396}/tau total similares al Control (Figura 23C).

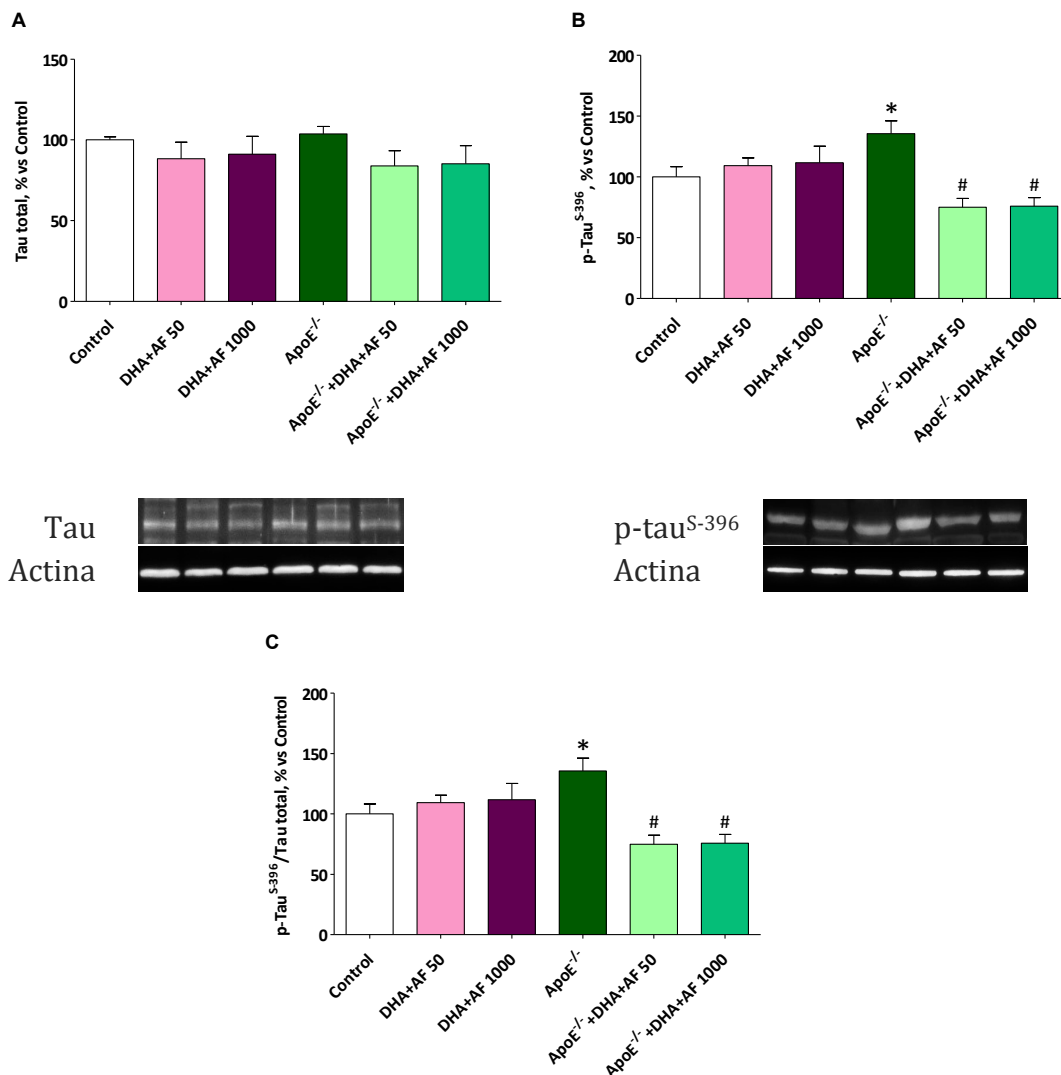


Figura 23. Expresión proteica de A) tau total, B) p-tau y C) el ratio p-tau/tau total, en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media.

13.6.3. Quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II

La expresión proteica de la CaMKII aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto a los animales Control. La administración de DHA+AF 50 previno dicho aumento en los ratones ApoE^{-/-}, pero no así en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, que presentó un aumento de la expresión de CaMKII en comparación con el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. La expresión de dicha proteína disminuyó en el grupo DHA+AF 50 y no varió en el grupo DHA+AF 1000 en comparación con el Control (Figura 24).

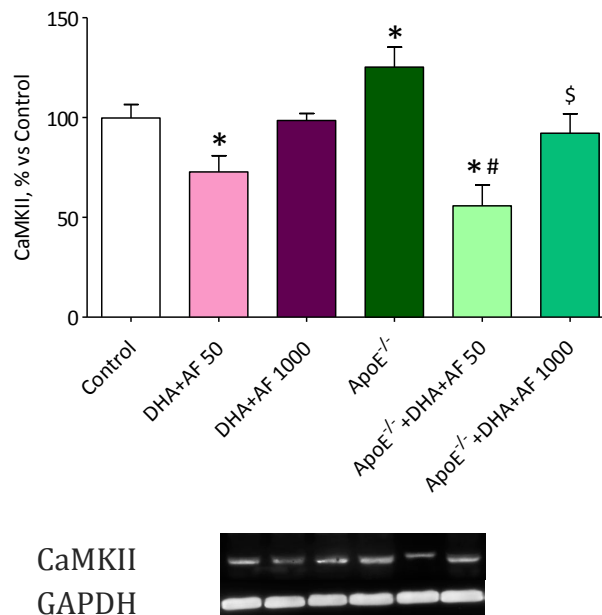


Figura 24. Expresión de la quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II (CaMKII) en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; ## $p < 0.01$ vs ApoE^{-/-}; \$ $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-}+DHA AF 50.

13.6.4. Factor neurotrófico derivado del cerebro

La expresión proteica de BDNF disminuyó en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo Control y sólo el grupo de ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, pero no

el grupo de ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, normalizó dicha expresión con el grupo Control. La expresión de BDNF en los grupos DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 fue similar a los valores del Control (Figura 25).

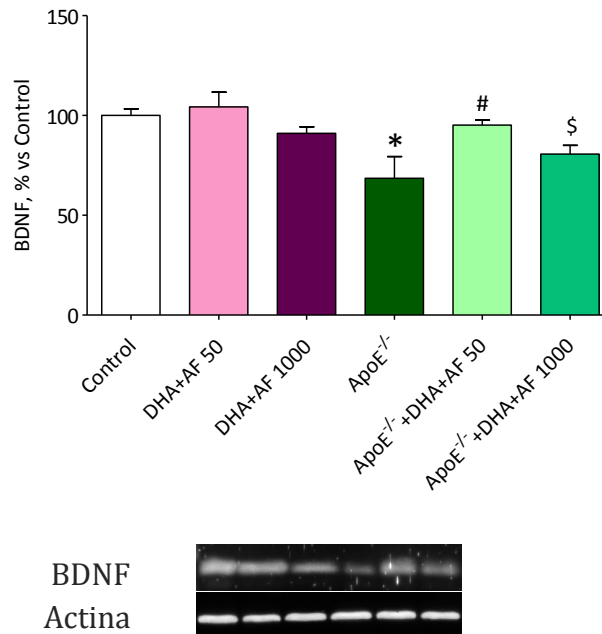


Figura 25. Expresión proteica del BDNF en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.01 vs Control; #p<0.05 vs ApoE^{-/-}; \$p<0.05 vs ApoE^{-/-}+DHA+AF 50.

13.6.5. Interleuquina-6 y factor de necrosis tumoral-α

La expresión proteica de IL-6 aumentó en el hipocampo de ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo Control y disminuyó significativamente en los grupos de ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, DHA+AF 50 y DHA+AF 1000. Los animales del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 presentaron una tendencia a disminuir la expresión de IL-6 en comparación con los ApoE^{-/-}, pero un aumento en comparación con el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 (Figura 26A).

La expresión proteica de TNF- α aumentó en el hipocampo de ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo Control y disminuyó significativamente en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Los animales del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 mostraron un aumento de la expresión de TNF- α en comparación con el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Esta expresión no se vio modificada en los ratones DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 respecto al Control (Figura 26B).

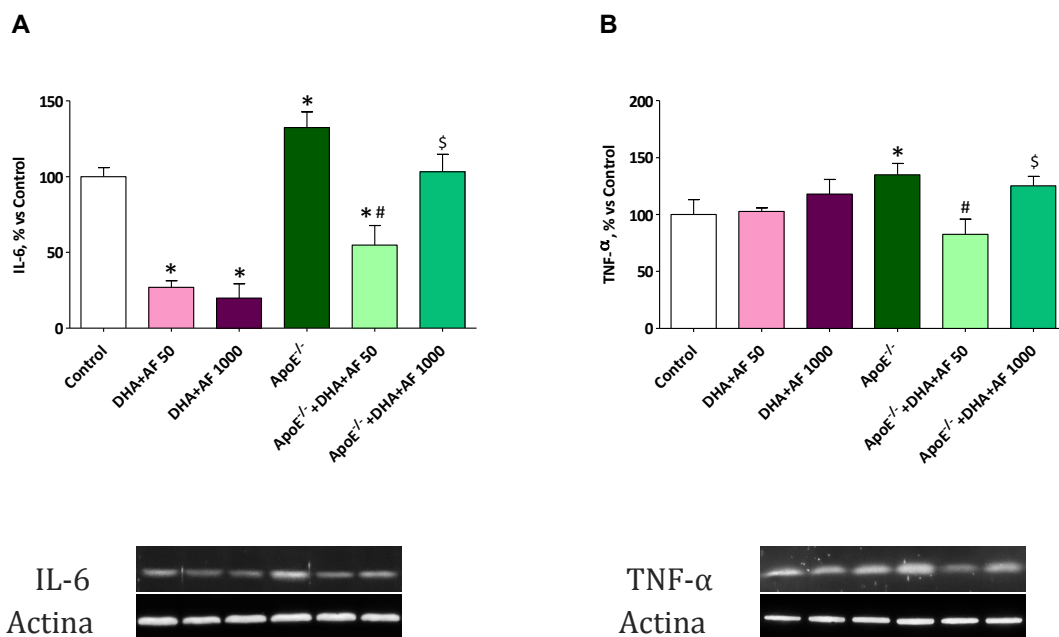


Figura 26. Expresión proteica de: A) IL-6 y B) TNF- α en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. *p<0.01 vs Control; #p<0.01 vs ApoE^{-/-}; \$\$ p<0.01 vs ApoE^{-/-}+DHA+AF 50.

13.6.6. Óxido nítrico sintasa inducible

La expresión proteica de iNOS aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo Control. Los animales de los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 evidenciaron una disminución

significativa de la expresión de dicha enzima respecto a los ratones ApoE^{-/-}. Por último, la expresión de esta proteína fue similar en los ratones DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 en comparación con el grupo Control. (Figura 27).

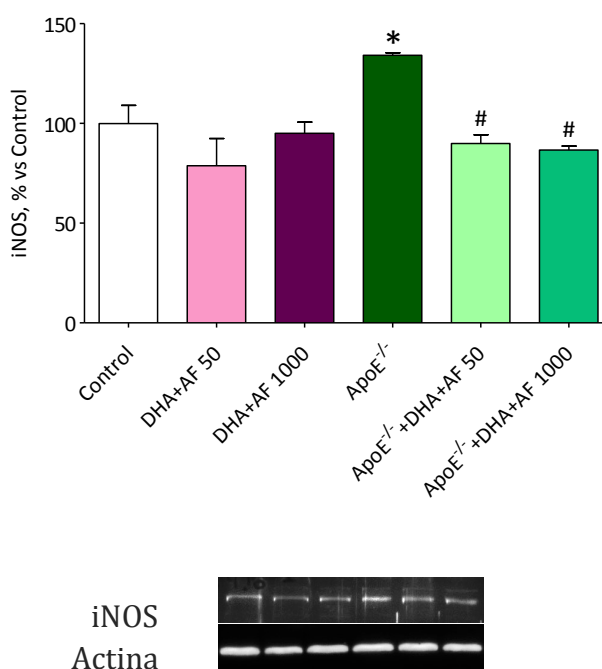


Figura 27. Expresión proteica de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.01$ vs ApoE^{-/-}

13.6.7. Subunidad p22-phox de la NADPH oxidasa

La expresión proteica de la p22-phox aumentó significativamente en el grupo ApoE^{-/-} respecto a los ratones Control. Los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 presentaron una disminución significativa de la expresión de esta subunidad en comparación con los ratones ApoE^{-/-}, hasta unos valores

similares a los ratones Control. No hubo diferencias significativas entre los grupos de ratones Control, DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 (Figura 28).

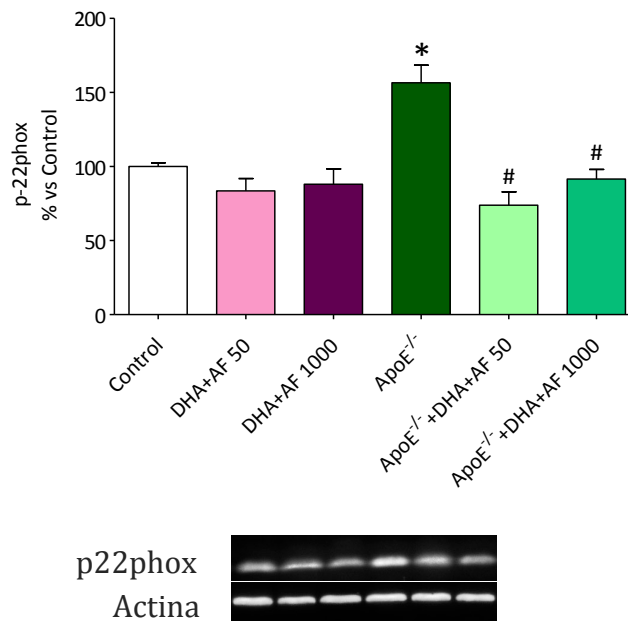


Figura 28. Expresión proteica de p-22phox en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-}; \$ $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-}+DHA+AF 50.

13.6.8. Superóxido dismutasa 1

La expresión proteica de SOD 1 aumentó significativamente en el hipocampo de ratones ApoE^{-/-} con respecto al grupo Control. Los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 revelaron una disminución significativa de la expresión de SOD 1 en comparación con el valor de los ratones ApoE^{-/-}. Los grupos DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 presentaron una reducción de la expresión de SOD 1 aproximadamente al 50% del valor del grupo Control (Figura 29).

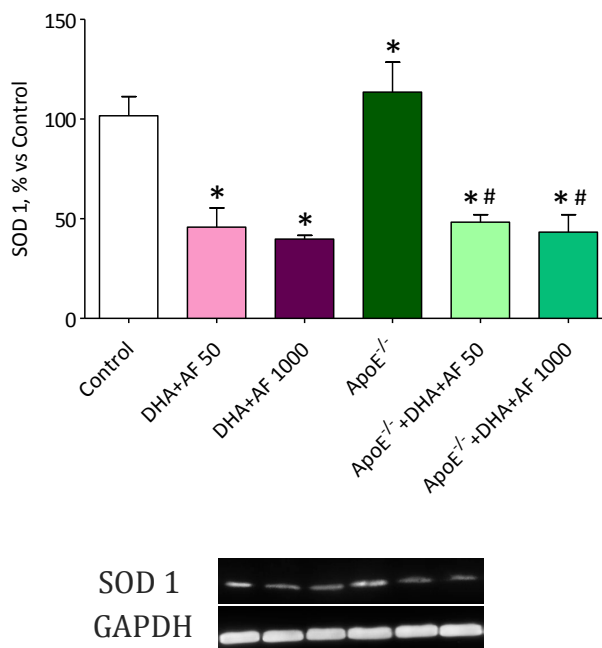


Figura 29. Expresión proteica de SOD 1 en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-}; \$ $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-}+DHA+AF 50.

13.6.9. Glutación peroxidasa y glutation reductasa

La expresión proteica de la enzima antioxidante GPx fue similar en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} y los ratones Control. Los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 mostraron una disminución de la expresión hipocampal de dicha enzima en comparación con los ratones ApoE^{-/-}. El grupo DHA+AF 50 presentó una disminución en la expresión de GPx respecto al Control. En cambio, los ratones DHA+AF 1000 no mostraron cambios en la expresión de GPx en comparación con el Control (Figura 30A).

Los valores de la expresión proteica de la GRd no manifestaron modificaciones en ningún grupo experimental (Figura 30B).

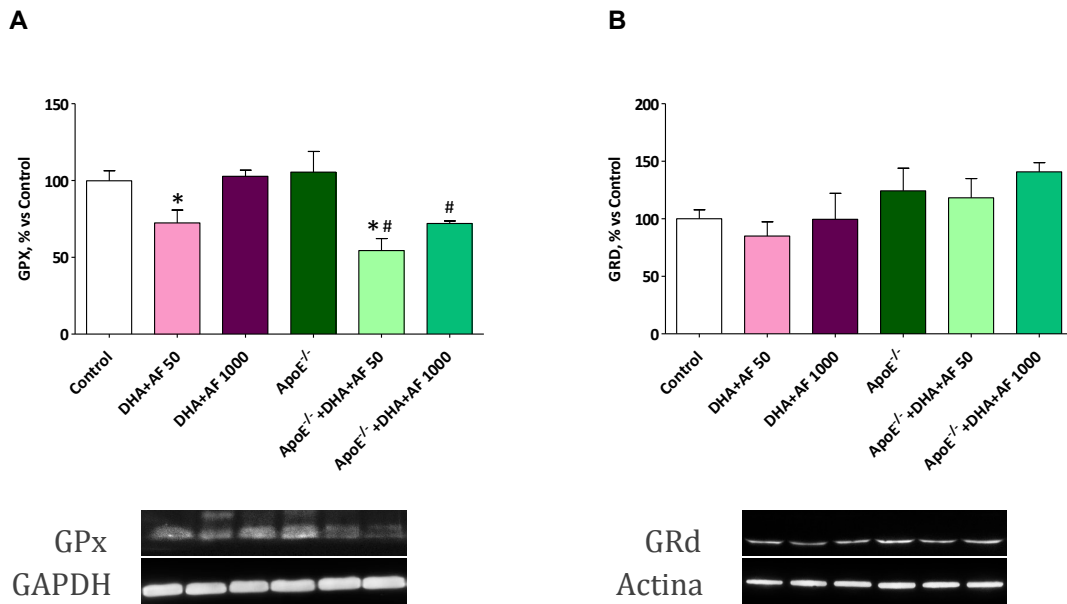


Figura 30. Expresión proteica de: A) GPX y B) GRD en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-}; \$ $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-}+DHA+AF 50.

13.6.10. Catalasa

La expresión proteica de la enzima catalasa aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} en comparación con el grupo Control. Los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 presentaron una disminución en la expresión de la catalasa en comparación con el grupo ApoE^{-/-}. Además, el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, mostró una expresión de esta enzima significativamente mayor que el grupo de ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Los grupos DHA+AF 50 y DHA+AF 1000 presentaron una marcada reducción de los valores de expresión proteica de la catalasa en hipocampo en comparación con el grupo de ratones Control (Figura 31).

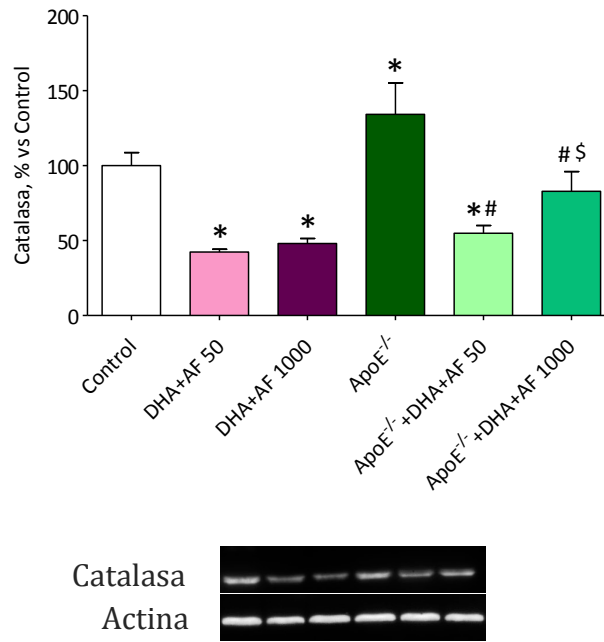


Figura 31. Expresión proteica de la catalasa en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs ApoE^{-/-}; \$ p<0.05 vs ApoE^{-/-}+DHA+AF 50.

13.6.11. Caspasa-3

La expresión proteica de Cas-3 aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto al Control. El grupo de ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 mostró valores significativamente menores de Cas-3 en comparación con los ratones ApoE^{-/-}. La expresión de esta proteína inductora de la apoptosis aumentó en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} en comparación con los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50.

Se observa además, una disminución de los valores de Cas-3 en el hipocampo de los ratones DHA+AF 50 respecto al Control, pero no en el de los ratones DHA+AF 1000, que presentó una expresión similar al Control (Figura 32).

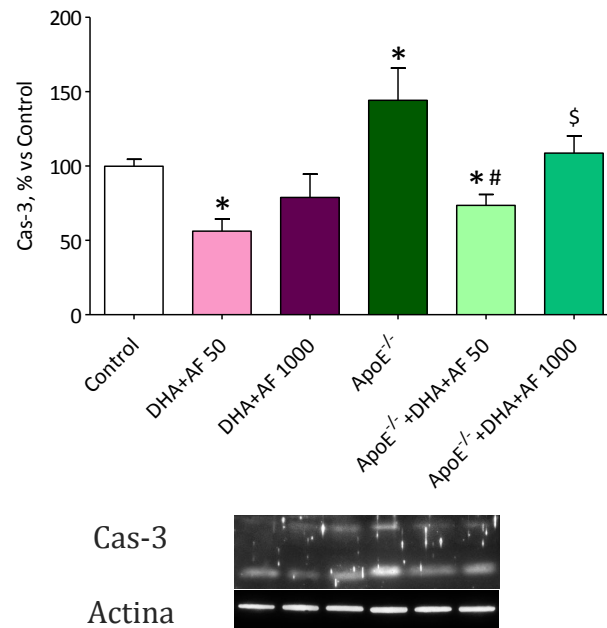


Figura 32. Expresión proteica de Cas-3 en el hipocampo de ratones C57BL/6 (Control), ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 50, ratones C57BL/6 tratados con DHA+AF 1000, ratones ApoE^{-/-}, ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 50 y ratones ApoE^{-/-} tratados con DHA+AF 1000. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-}; \$ $p < 0.05$ vs ApoE^{-/-}+DHA+AF 50.

14. Efectos de la incubación con DHA y concentraciones crecientes de af en la microglía activada de ratón

14.1. Supervivencia celular

Los cultivos de células Bv-2 de la microglía de ratón estimulados o activados *in vitro* con LPS y H₂O₂, mostraron una disminución significativa de la supervivencia celular comparado con los grupos de células Control. La co-incubación de las células estimuladas con DHA+AF 50 aumentó significativamente la supervivencia celular llegando a valores similares a los del Control. El aumento progresivo de la

concentración de AF produjo una disminución de la supervivencia celular, llegando incluso, en los grupos LPS+DHA+AF 500 y H₂O₂+DHA+AF 500, a obtenerse valores similares a los grupos LPS y H₂O₂ (Figura 33).

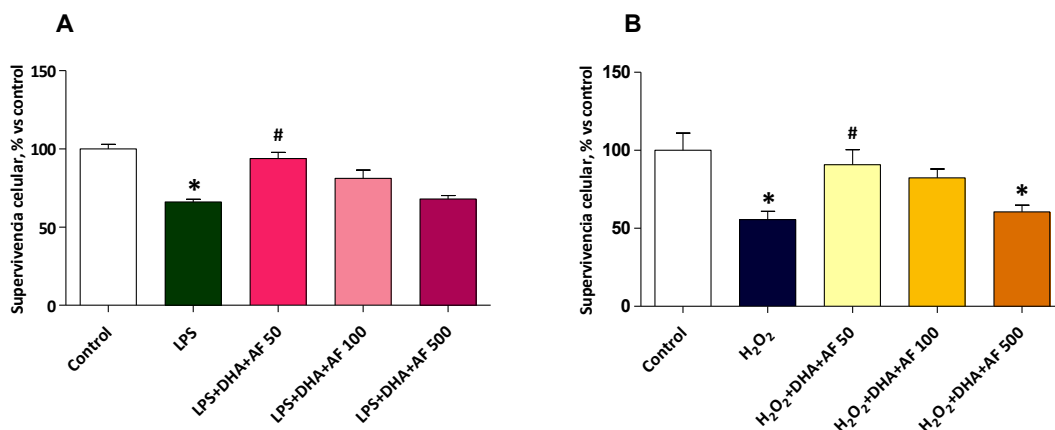


Figura 33. Supervivencia celular de: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs LPS o H₂O₂; \$p<0.05 vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.

14.2. Producción de anión superóxido

La producción de O₂⁻ por las células Bv-2 de la microglía aumentó significativamente con ambos estímulos (LPS y H₂O₂) respecto a los grupos de células Control. Las células LPS+DHA+AF 50 disminuyeron la producción de O₂⁻, incluso por debajo de los niveles de las células Control. La co-incubación de las células Bv-2 con LPS y DHA+AF 100 o DHA+AF 500 aumentó ligeramente la producción de O₂⁻ con respecto al grupo LPS+DHA+AF 50.

La co-incubación con H₂O₂ y DHA+AF 50 también disminuyó la producción de O₂⁻ en comparación con el grupo H₂O₂, hasta llegar a niveles similares a los producidos por el grupo Control. La co-incubación con DHA+AF 100 de las células Bv-2 estimuladas con H₂O₂ presentó una tendencia a aumentar la producción de O₂⁻ con

respecto al grupo H₂O₂+DHA+AF 50. El grupo H₂O₂+DHA+AF 500 aumentó significativamente su producción en comparación con el grupo H₂O₂+DHA+AF 50 (Figura 34).

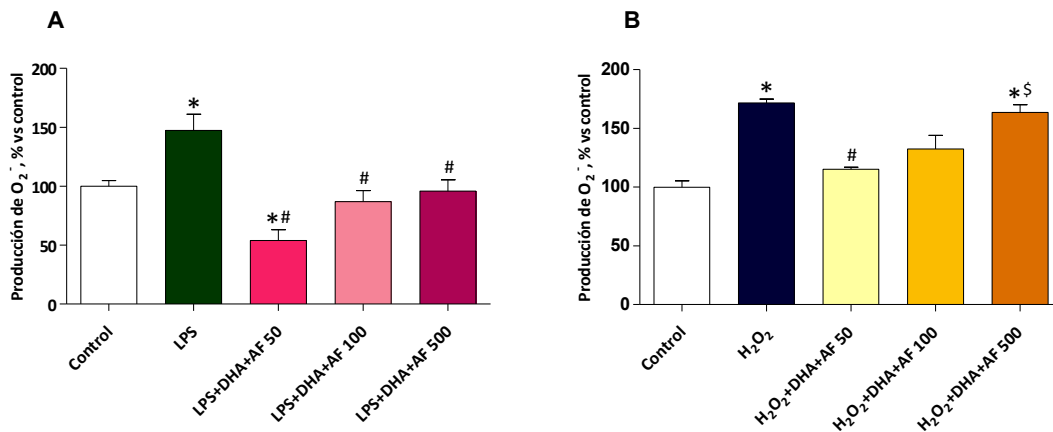


Figura 34. Producción de O₂⁻ en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs LPS o H₂O₂; \$p<0.05 vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.

A continuación se muestran microfotografías de fluorescencia representativas de la producción de O₂⁻ en las células Bv-2, en los distintos grupos experimentales (Figura 35 y 36).

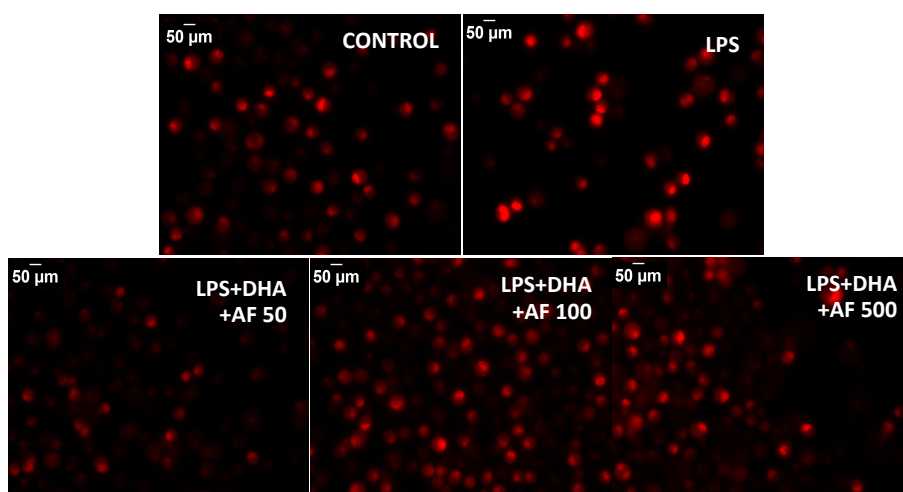


Figura 35. Microfotografía de fluorescencia representativas de la producción de O₂⁻ en células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas 24 h con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500.

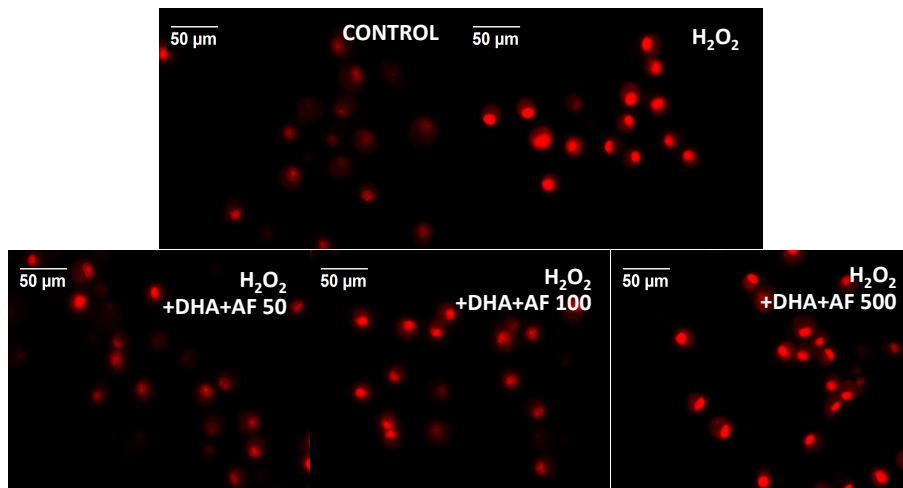


Figura 36. Microfotografía de fluorescencia representativas de la producción de O_2^- en células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H_2O_2 y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500.

14.3. Efectos del DHA+AF 50, DHA+AF 100 Y DHA+AF 500 sobre la expresión proteica microglial de biomarcadores de neurodegeneración

14.3.1. Factor neurotrófico derivado del cerebro

Se valoró la expresión proteica de BDNF como factor neuroprotector que actúa aumentando la viabilidad y plasticidad neuronal. La expresión proteica de BDNF disminuyó significativamente en las células microgliales activadas con LPS en comparación con el Control. Los grupos LPS+DHA+AF 50, LPS+DHA+AF 100 y LPS+DHA+AF 500 aumentaron su expresión hasta normalizar con los valores Control. La expresión proteica de BDNF no varió significativamente en las células estimuladas con H_2O_2 con respecto al grupo Control. La incubación con DHA+AF 50 o DHA+AF 100 aumentó significativamente la expresión de BDNF en las células Bv-2 activadas con H_2O_2 respecto al Control. Sin embargo, la expresión de BDNF

disminuyó de forma significativa en el grupo H_2O_2 +DHA+AF 500 con respecto al resto de grupos co-incubados con H_2O_2 . (Figura 37).

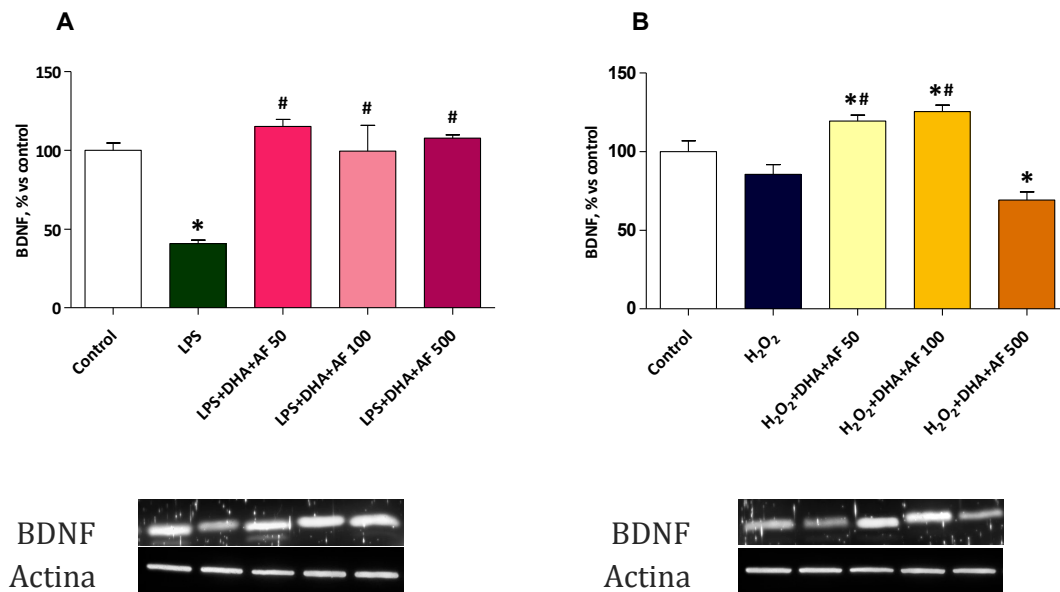


Figura 37. Expresión proteica de BDNF en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H_2O_2 y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs LPS o H_2O_2 ; \$ $p < 0.05$ vs LPS+DHA+AF 50 o H_2O_2 +DHA+AF 50.

14.3.2. Interleuquina-6, factor de necrosis tumoral- α y ciclooxigenasa 2

La expresión proteica de IL-6 y TNF- α aumentó significativamente respecto al grupo Control en las células Bv-2 activadas con LPS o H_2O_2 . La incubación de las células microgliales con DHA+AF 50, DHA+AF 100 o DHA+AF 500 redujo la expresión de estas citoquinas proinflamatorias en las células estimuladas tanto con LPS como con H_2O_2 . No hubo diferencias significativas entre los grupos LPS+DHA+AF 50, LPS+DHA+AF 100 y LPS+DHA+AF 500, ni entre los grupos H_2O_2 +DHA+AF 50, H_2O_2 +DHA+AF 100 y H_2O_2 +DHA+AF 500 (Figura 38 Y 39).

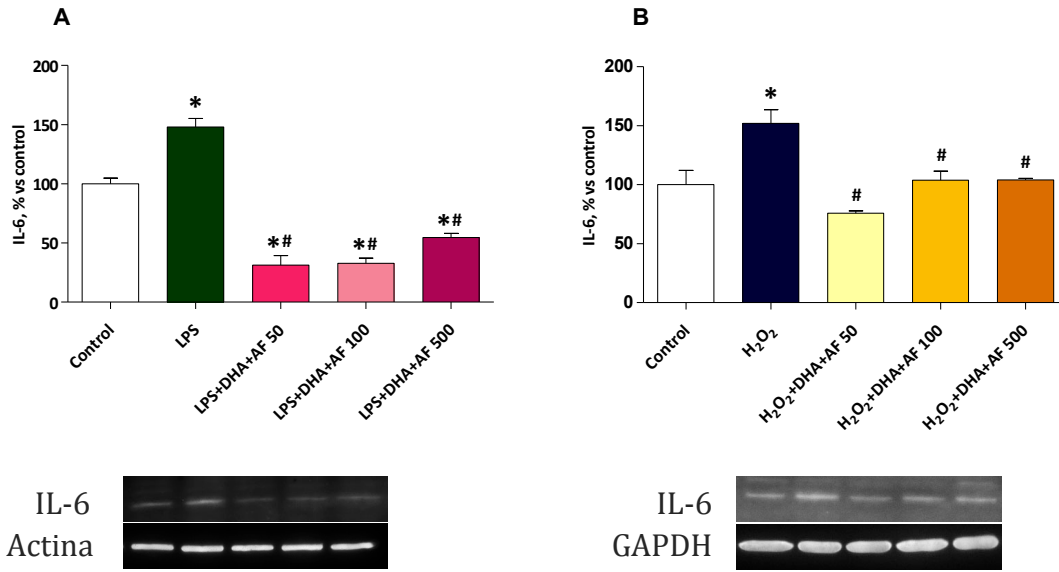


Figura 38. Expresión proteica de IL-6 en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs LPS o H₂O₂; \$p<0.05 vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.

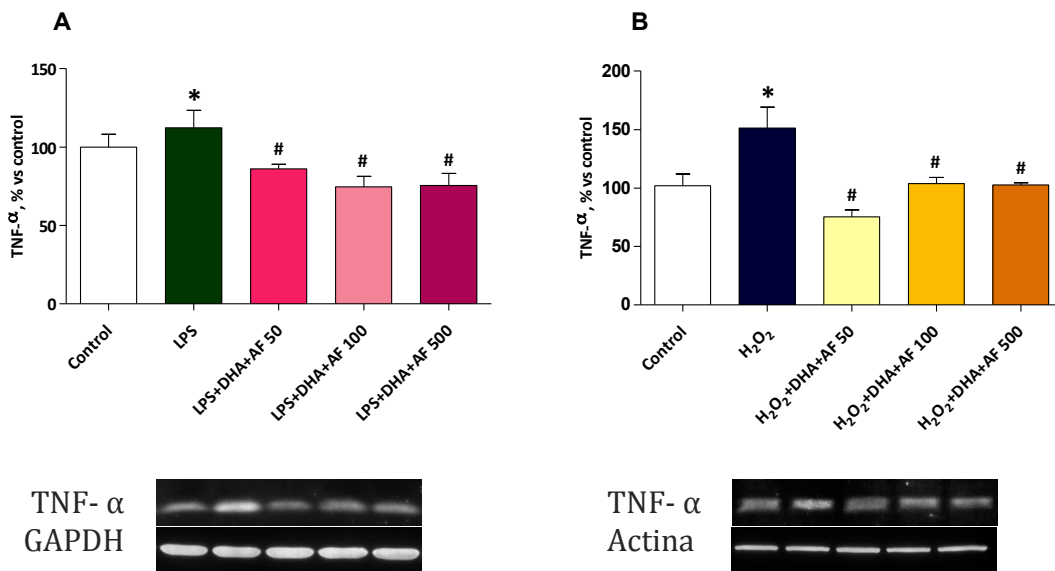


Figura 39. Expresión proteica de TNF-α en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs LPS o H₂O₂; \$p<0.05 vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.

Además, la expresión proteica de la enzima COX-2 aumentó significativamente con los dos estímulos (LPS o H₂O₂) en la línea celular Bv-2 en comparación con el Control. La co-incubación con DHA+AF 50 normalizó dicha expresión en ambos casos. La co-incubación con DHA+AF 500 aumentó significativamente la expresión de la COX-2 con ambos estímulos, respecto al grupo tratado con DHA+AF 50. La co-incubación con DHA+AF 100 presentó unos niveles de expresión intermedios entre DHA+AF 50 y DHA+AF 500 con los dos estímulos (Figura 40).

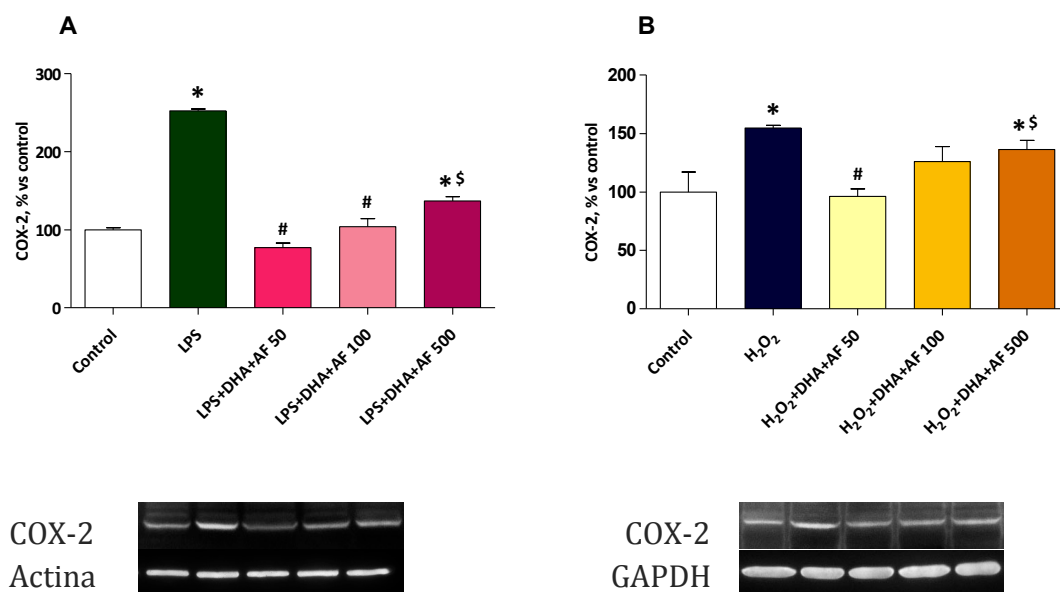


Figura 40. Expresión proteica de la COX-2 en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs LPS o H₂O₂; \$ $p < 0.05$ vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.

14.3.3. Óxido nítrico sintasa inducible

La expresión proteica de la iNOS aumentó significativamente con ambos estímulos (LPS o H₂O₂) en las células Bv-2 con respecto al grupo Control. La co-incubación de las células Bv-2 estimuladas con LPS o H₂O₂, y con los tres tipos de DHA (DHA+AF

50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500) disminuyó significativamente la expresión proteica de la iNOS respecto al grupo de células estimuladas. No hubo diferencias significativas entre los tres grupos de DHA presentes en este estudio (Figura 41).

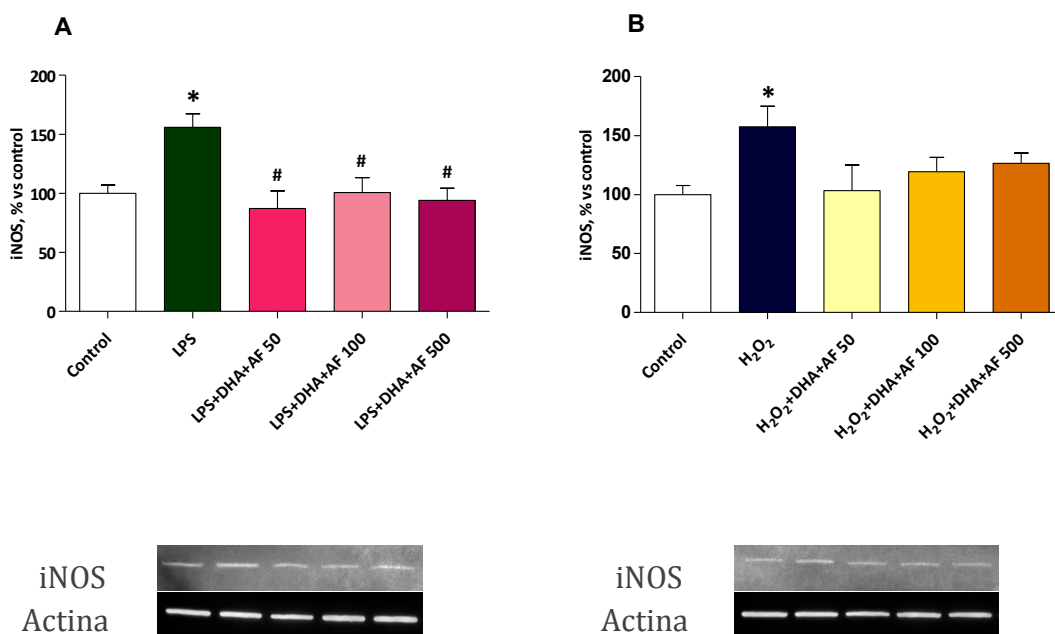


Figura 41. Expresión proteica de la iNOS en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs LPS o H₂O₂; \$p<0.05 vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.

14.3.4. Subunidad p22phox de la NADPH oxidasa

La expresión proteica de la p22phox aumentó significativamente en las células Bv-2 microgliales activadas con LPS. La co-incubación con DHA+AF 50 y LPS disminuyó ligeramente los valores de la p22phox. Los grupos LPS+DHA+AF 100 y LPS+DHA+AF 500 presentaron valores similares a los del grupo LPS (Figura 42A). Además, la expresión de la p22phox sufrió un aumento significativo en el grupo de células Bv-2 estimulado con H₂O₂ en comparación con el grupo Control. La

expresión proteica de la p22phox disminuyó significativamente al co-incubar las células estimuladas con H₂O₂ con DHA+AF 50. En cambio, las células H₂O₂+DHA+AF 500 presentaron un aumento en la expresión de esta subunidad hasta valores similares al grupo H₂O₂. El grupo H₂O₂+DHA+AF 100 mostró una expresión de p22phox intermedia (Figura 42B).

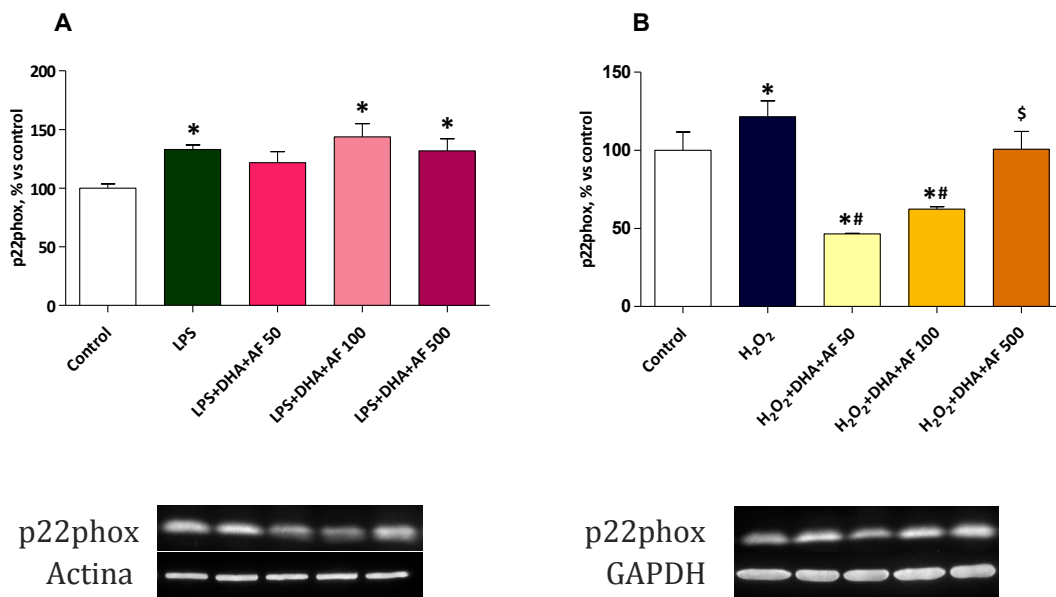


Figura 42. Expresión proteica de la p22phox en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs LPS o H₂O₂; \$p<0.05 vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.

14.3.5. Superoxido dismutasa 1

Los cultivos de células microgliales estimulados con LPS y H₂O₂ mostraron un aumento significativo de la expresión proteica de SOD 1 respecto al grupo de células Control. Los grupos LPS+DHA+AF 50, LPS+DHA+AF 100 y LPS+DHA+AF

500 mostraron una disminución de los niveles de SOD 1 respecto al grupo Control y al grupo LPS (Figura 43A).

La incubación de células Bv-2 con DHA+AF 50 activadas con H₂O₂ disminuyó la expresión de SOD 1, en comparación con el grupo H₂O₂. Los grupos H₂O₂+DHA+AF 100 y H₂O₂+DHA+AF 500, mostraron un aumento significativo de la expresión de la SOD 1 respecto al grupo H₂O₂+DHA+AF 50 (Figura 43B).

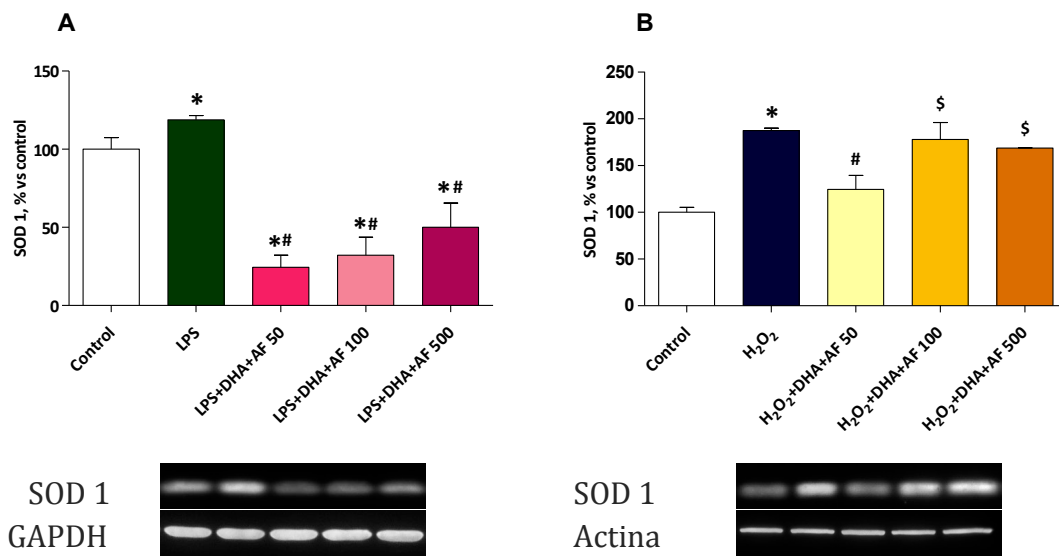


Figura 43. Expresión proteica de la SOD 1 en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs LPS o H₂O₂; \$p<0.05 vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.

14.3.6. Glutation peroxidasa

La expresión proteica de la enzima GPx fue similar en las células Bv-2 incubadas con LPS, LPS+DHA+AF 500 y el grupo Control. La co-incubación de LPS con DHA+AF 50 fue capaz de disminuir la expresión proteica de esta enzima en las células microgliales de ratón (Figura 44A).

La expresión de la GPx aumentó con H₂O₂ en las células Bv-2 con respecto al grupo Control. La co-incubación con DHA+AF 50 y DHA+AF 100 y H₂O₂ disminuyó significativamente la expresión proteica de GPx respecto al grupo H₂O₂. Sin embargo, el grupo H₂O₂+DHA+AF 500 no mostró diferencias significativas con el grupo H₂O₂. La co-incubación de las células con H₂O₂ y DHA+AF 50 disminuyó de forma significativa la expresión de la GPx en este tipo celular en comparación con los grupos que presentaban un contenido de AF más elevado (Figura 44B).

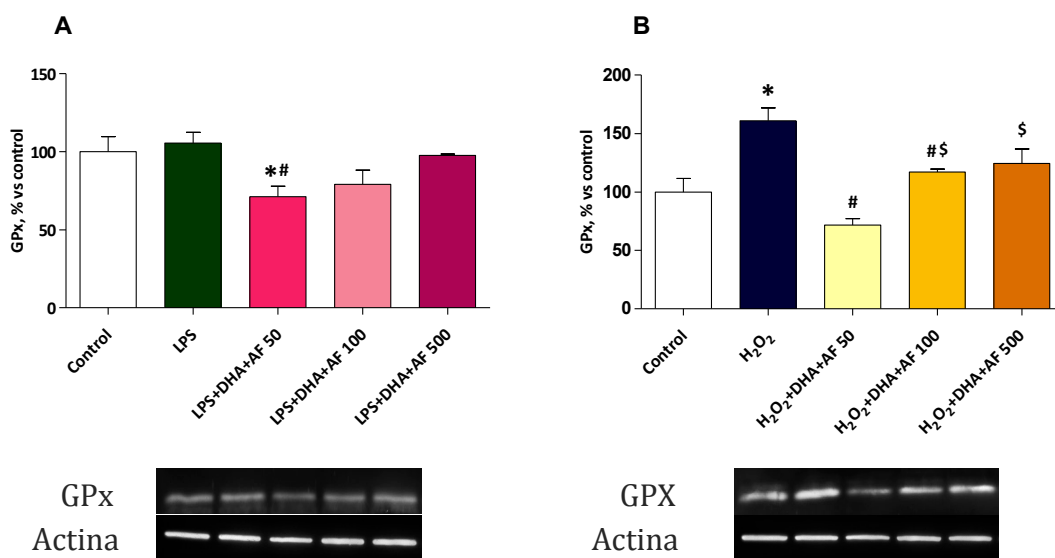


Figura 44. Expresión proteica de la GPx en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs LPS o H₂O₂; \$ $p < 0.05$ vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.

14.3.7. Glutation reductasa

La expresión proteica de GRd aumentó significativamente en las células Bv-2 estimuladas tanto con LPS como con H₂O₂, respecto al grupo Control.

La expresión de este enzima disminuyó significativamente en los grupos LPS+DHA+AF 50, LPS+DHA+AF 100 y LPS+DHA+AF 500, en comparación con el

grupo LPS. A pesar de esto, su expresión aumentó significativamente en el grupo LPS+DHA+AF 500 en comparación con los otros dos grupos con menor concentración de AF (Figura 45A).

Asimismo, la expresión de este enzima también disminuyó en los grupos H₂O₂+DHA+AF 50, H₂O₂+DHA+AF 100 y H₂O₂+DHA+AF 500, en comparación con el grupo H₂O₂, siendo los valores de la expresión proteica de GRd significativamente más bajos en el grupo H₂O₂+DHA+AF 50 (Figura 45B).

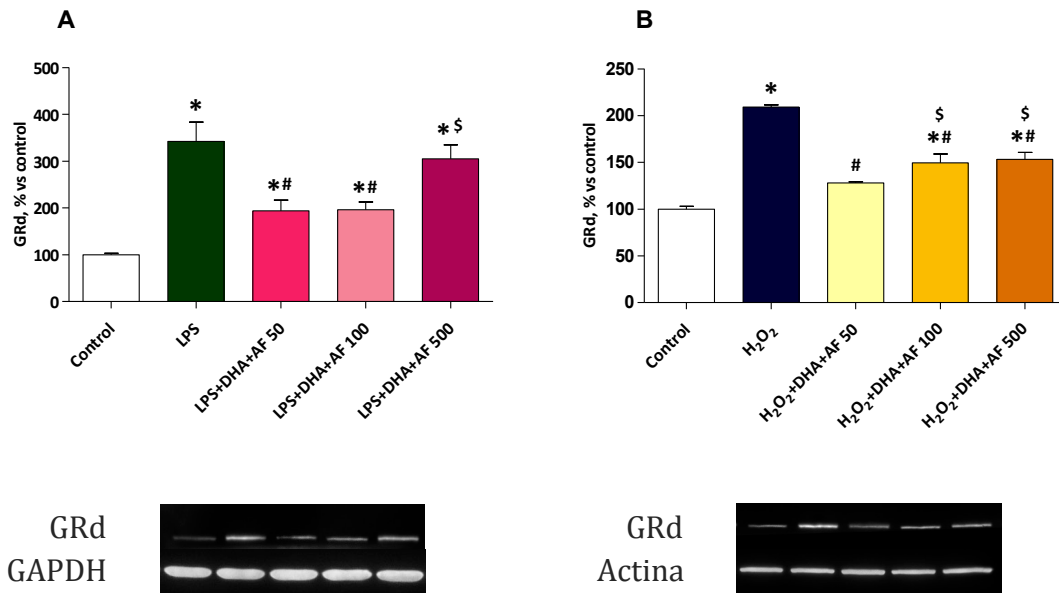


Figura 45. Expresión proteica de la GRd en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media ± el error estándar de la media. *p<0.05 vs Control; #p<0.05 vs LPS o H₂O₂; \$p<0.05 vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.

14.3.8. Caspasa-3

La expresión de la Cas-3 aumentó significativamente en las células microgliales Bv-2 de ratón activadas con LPS o H₂O₂, respecto al Control.

La co-incubación con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500, disminuyó de forma significativa la expresión de la Cas-3 frente a los grupos estimulados con LPS o H₂O₂. No hubo diferencias significativas entre los grupos de células co-incubados con DHA y las tres concentraciones diferentes de AF (Figura 46).

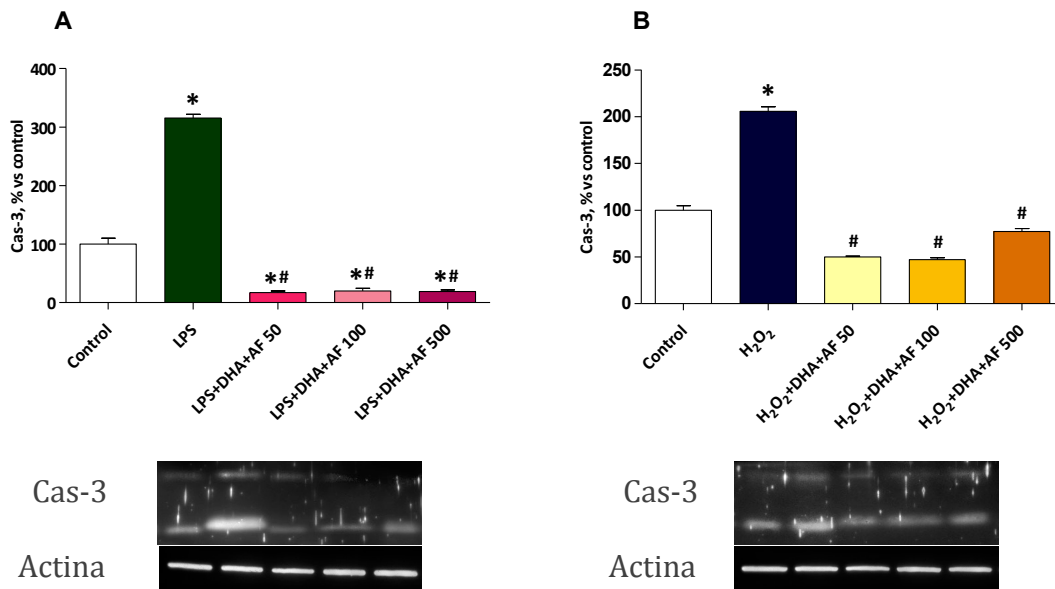


Figura 46. Expresión proteica de cas-3 en: A) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con LPS y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500 y B) células Bv-2 Control, células Bv-2 activadas con H₂O₂ y co-incubadas con DHA+AF 50, DHA+AF 100 y DHA+AF 500. Los datos están expresados como la media \pm el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs LPS o H₂O₂; \$ $p < 0.05$ vs LPS+DHA+AF 50 o H₂O₂+DHA+AF 50.



VIII. DISCUSIÓN

15. El DHA+AF 50 mejora las alteraciones cognitivas en comparación con el DHA+AF 1000 en ratones ApoE^{-/-}

En el presente estudio se ha comprobado el efecto del DHA con dos concentraciones diferentes de AF sobre la actividad motora, el estado de ansiedad y la capacidad cognitiva de los ratones ApoE^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasa, como modelo de la Enfermedad de Alzheimer.

15.1. El DHA+AF 50 mejoró la memoria y el aprendizaje de los ratones ApoE^{-/-} comparado con el DHA+AF 1000

La memoria espacial a largo plazo y la capacidad de aprendizaje de los animales fueron evaluadas mediante el test del laberinto acuático de Morris. En la fase I de esta prueba, los ratones ApoE^{-/-} necesitaron un tiempo de aprendizaje significativamente mayor que los ratones del grupo Control. Además, en la fase II, los ratones ApoE^{-/-} presentaron un mayor tiempo de latencia, es decir, tardaron más tiempo en llegar al lugar donde se encontraba la plataforma, y una disminución del tiempo de permanencia y número de cruces con ése lugar, frente a los ratones Control. Estos resultados indican una pérdida de memoria espacial de los ratones ApoE^{-/-} en comparación con el grupo Control, sugiriendo la existencia de un deterioro cognitivo precoz en los ratones ApoE^{-/-} debido al desarrollo de procesos neurodegenerativos (Knouff y col., 1999; Janssen y col., 2016). De hecho, se ha demostrado que los ratones ApoE^{-/-} muestran una pérdida significativa de

sinapsis con la edad y disfunción cognitiva (Avdesh y col., 2011; Lane-Donovan y col., 2016; Marotolli y col., 2017).

Por otra parte, la capacidad de aprendizaje de los ratones del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 fue mayor en comparación con los ratones ApoE^{-/-} y los ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000. Asimismo, los tres parámetros analizados en la fase II del laberinto, la latencia, el tiempo de permanencia y el número de cruces fueron normalizados en los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 respecto a los valores obtenidos en el grupo Control. El DHA está implicado en diferentes procesos muy relevantes del SNC, como es la neurogénesis, la neurotransmisión y la fluidez de las membranas neuronales y gliales, además de actuar como señal de la transducción mediante la activación de receptores de la membrana celular (Kitajka y col., 2004; Fleith y Clandinin, 2005). Varios estudios en diferentes modelos animales, han demostrado que la deficiencia de DHA en la dieta produce un incremento de la relación de AGPI n-6/n-3 en cerebro y favorece el desarrollo de deficiencias en capacidades cognitivas, como el aprendizaje y la memoria (Moriguchi y col., 2000; Champoux y col., 2002). Estos efectos podrían deberse, en parte, a que el DHA es esencial para el crecimiento de las neuritas y la mielinización axonal (Novak y col., 2008). Además, en una gran cohorte de sujetos de edad avanzada (N = 3660; ≥ 65 años), se observó que niveles plasmáticos elevados de DHA se relacionaban con una mejora de las funciones cognitivas, menor número de infartos cerebrales y mayor conservación de la materia blanca analizada mediante resonancia magnética (Vermeer y col., 2003; Virtanen y col., 2013). De este modo, los resultados obtenidos en el presente estudio se podrían deber al efecto del DHA que podría estar facilitando el crecimiento de las neuritas, sobre todo en el hipocampo,

mediante la formación de proteínas pre y post-sinápticas que permiten la transmisión de señales entre neuronas y facilitan procesos como la creación de nuevos recuerdos, el aprendizaje y la memoria.

No obstante, entre los diferentes ensayos clínicos existe cierta discrepancia en la efectividad del DHA, ya que, aunque se ha demostrado en sujetos sanos, cuya dieta fue suplementada con DHA, que mejora la memoria episódica, semántica y procedimental (Yurko-Mauro y col., 2015) y favorece el incremento de la actividad cerebral, medida por resonancia magnética (McNamara, 2010; Cederholm y col., 2013), no ocurre lo mismo en los individuos que sufrían una patología neurodegenerativa, como la EA (Oster y Pillot, 2010; Casai y col., 2015), o incluso en pacientes con un deterioro cognitivo leve o un trastorno cognitivo asociado a la edad (Cederholm y col., 2013). Esta discrepancia encontrada en las diferentes investigaciones y ensayos clínicos, podría deberse a la presencia del AF en los suplementos de DHA.

En el presente estudio, la capacidad cognitiva de los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 se vio mermada en comparación con el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, requirieron más tiempo para aprender a encontrar la plataforma mediante las referencias espaciales en la fase I del laberinto acuático de Morris. Así mismo, el grupo de ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, presentó una menor memoria espacial en la segunda fase de la prueba, en comparación con los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Este efecto negativo, podría deberse a la presencia del AF que, como se ha mencionado anteriormente, posee una marcada toxicidad en el SNC (Wanders y col., 2010).

Se ha propuesto que el AF afecta a la dinámica de los fosfolípidos en las membranas, así como al estado físico de estas proteínas de membrana (Schönfeld y Struy, 1999). En estudios con astrocitos del hipocampo de rata, se ha demostrado que el AF produce alteraciones de la homeostasis del calcio citosólico, desenergización de las mitocondrias por su efecto protonóforo y mayor producción de EROs (Schönfeld y Reiser, 2016). El efecto pro-oxidante del AF se observó en mitocondrias aisladas de cerebro de rata, donde se propuso que el AF podría estar interfiriendo con la cadena respiratoria de las mitocondrias a nivel del complejo I, y desplazando lípidos en las membranas mitocondriales y neuronales (Schönfeld y Reiser, 2006). Dado que la neurona constituye un tejido con un alto gasto energético, la disminución de ATP por parte de las mitocondrias da lugar a un efecto neurotóxico muy importante, inducido por el AF (Schönfeld y Bohnensack, 1997; Schönfeld y Reiser, 2016). Como consecuencia de la disminución del transporte de electrones y el aumento de la permeabilidad al calcio de las membranas mitocondriales y el estrés oxidativo en el SNC, aumentan también los procesos apoptóticos o de muerte neuronal (Zomer y col., 2000; Röncke y col., 2009; Schönfeld y Reiser, 2016), lo que podría explicar la merma de capacidad cognitiva de los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, en comparación con los ApoE^{-/-}+DHA+AF 50.

Además, otros estudios han revelado que existe una competición entre los diferentes ácidos grasos procedentes de la dieta por formar parte de los fosfolípidos de las membranas celulares del SNC (Cribb y col., 2017, Chilton y col., 2017). Por ello se podría pensar, que un aumento del consumo de AF podría favorecer el incremento de la concentración de AF en los fosfolípidos de las

membrana neuronales, en detrimento de otros ácidos grasos, como por ejemplo el DHA y reducir sus efectos beneficiosos, como ocurre en el presente estudio.

Por último, en la tercera fase del laberinto acuático de Morris, en la que se retiran las referencias espaciales y se añade una señal visual en la plataforma, los seis grupos de ratones presentaron el mismo tiempo en llegar a la plataforma. De este modo, los resultados obtenidos en la fase I y II del laberinto acuático de Morris se deberían principalmente a la capacidad de aprendizaje y la memoria espacial a largo plazo de los ratones. En vista de los resultados, quedarían descartados problemas visuales o motores y posibles diferencias en la motivación por escapar del agua entre los diferentes grupos experimentales.

15.2. El DHA+AF 50 no modificó la actividad locomotora espontánea en ratones ApoE^{-/-}.

En la prueba de campo abierto, los tres grupos de ratones ApoE^{-/-} mostraron una hipoactividad motora marcada con un menor número de movimientos, tanto horizontales como verticales en comparación con los Controles. Este hallazgo concuerda con estudios previos en los que se describió una reducción en la actividad locomotora de los ratones ApoE^{-/-} utilizando diferentes pruebas de comportamiento (Grootendorst y col., 2001; Zhou y col., 2016). Además, otros autores han descrito que los ratones ApoE^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasa, desarrollan síntomas similares a la EA, incluyendo la hipoactividad (Galloway y col., 2008). En estos ratones, la hipoactividad se relaciona con los

trastornos asociados a la EA, como la aparición de ansiedad y un estado similar a la depresión (Meng y col., 2015).

La intervención con DHA, independientemente de su concentración de AF, no tuvo efectos significativos sobre el nivel de actividad determinada mediante la prueba de campo abierto, en ratones ApoE^{-/-} ni en ratones C57BL/6. Esto podría deberse a que el DHA, como ya se ha mencionado, facilita el crecimiento de las neuritas, favoreciendo como el aprendizaje y la memoria (Cao y col., 2009), sin tener ningún efecto sobre la actividad de estos animales. Existen también algunas controversias con respecto a la efectividad del DHA para regular la actividad locomotora del animal. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado una mejora en la actividad motora después del tratamiento con DHA en un modelo experimental de accidente cerebrovascular (Hong y col., 2014), mientras que el DHA no fue efectivo para revertir los déficits locomotores inducidos por un modelo de enfermedad de Parkinson (Ozsoy y col., 2011).

15.3. El DHA+AF 50 mejoró el estado de ansiedad, depresión y aprendizaje comparado con el DHA+AF 1000 en ratones ApoE^{-/-}.

Para profundizar en el estudio del estado de ansiedad y la capacidad cognitiva, se utilizó la prueba de natación forzada y la prueba de suspensión por la cola. En los resultados de la prueba de natación forzada, no se observaron cambios significativos entre los diferentes grupos experimentales, en el tiempo que los ratones permanecieron inmóviles o realizando solamente los movimientos

necesarios para mantenerse a flote. No obstante, los ratones ApoE^{-/-} mostraron en la prueba de suspensión por la cola, un tiempo de inmovilidad significativamente menor que el observado en el grupo Control. La inmovilidad en este tipo de pruebas (natación forzada o suspensión por la cola), fue interpretada por primera vez por Porsolt y col. como un estado de desesperación conductual relacionado con un estado de depresión, aunque también puede interpretarse como la falta de voluntad para mantener el esfuerzo en estrategias de escape, cuando se presenta una situación estresante pero ineludible (Porsolt y col., 1977; Demontis y col., 2017). Recientemente, se ha propuesto que la inmovilidad de los ratones en los test de natación forzada o suspensión por la cola, se puede interpretar como inhibición progresiva de las estrategias de evasión, originada por una experiencia previa repetida del animal ante la imposibilidad de escape de situaciones estresantes (Cabib y col., 2012). De hecho, otros investigadores encuentran pruebas convincentes de que la causa de la inmovilidad es el aprendizaje realizado en los ensayos previos y la consolidación en la memoria de estos test y, por tanto, se podría considerar la inmovilidad como un indicador de la capacidad de aprendizaje de los animales (West, 1990; Campus y col., 2015; Enginar y col., 2016). En nuestros resultados, los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, incrementaron el tiempo de inmovilidad en la prueba de la suspensión por la cola, en comparación con el grupo ApoE^{-/-}, lo que podría deberse al efecto del DHA mejorando la capacidad de aprendizaje, la consolidación de la memoria y la adaptación a una situación de la que no hay salida.

En resumen, los resultados obtenidos en las pruebas conductuales muestran que el DHA+AF 50 protege frente al deterioro cognitivo y el detrimento de la memoria y

la capacidad de aprendizaje en comparación con el DHA+AF 1000 en ratones ApoE^{-/-}. Esto apoyaría la teoría de que el AF interfiere con los efectos beneficiosos del DHA en el SNC, disminuyéndolos y participando en el desarrollo del proceso neurodegenerativo.

16. El DHA+AF 50 mejora el perfil lipídico en ratones ApoE^{-/-}

La concentración sérica, tanto de colesterol total como de colesterol-LDL, fue significativamente mayor en los tres grupos de ratones ApoE^{-/-} que en el grupo de ratones Control. Estos resultados coinciden con lo indicado por diferentes autores (Zhang y col., 1992; Setälä y col., 1992; Zhou y col., 2011) que encuentran niveles mayores de colesterol total y LDL en los ratones ApoE^{-/-} que en los silvestres, y este aumento es aún más significativo cuando los ratones ApoE^{-/-} son alimentados con una dieta rica en grasa (Plump y col., 1992; Janssen y col., 2016).

Los niveles séricos de colesterol total y LDL-col disminuyeron significativamente en los grupos ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 o ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 en comparación con los ratones ApoE^{-/-} e incluso con el grupo control. Otros autores utilizando suplementos de grasa de pescado en pacientes dislipémicos, indican que los ácidos grasos ω 3 aumentan ligeramente el colesterol total y el LDL-col por activar el receptor nuclear PPAR γ y facilitar el aclaramiento de las VLDL y su transformación en IDL y LDL, sin afectar a la eliminación de estas últimas (Ouguerram y col., 2006; Hurt-Camejo, 2017). No obstante, estos resultados podrían deberse a que los estudios mencionados utilizan aceites de pescado o extractos de este tipo de aceite,

que además de DHA, contienen cantidades elevadas de AF (Wanders y col. 2011), y es conocido su efecto hiperlipemiente (Steinberg y col., 1998).

No hubo diferencias significativas en los niveles de HDL-col en suero entre los ratones ApoE^{-/-} y el Control, esto concuerda con lo indicado por otros autores en este tipo de ratones utilizando dietas ricas en grasa (Meyrelles y col., 2011; Zhou y col., 2011). En los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 o ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 tampoco hubo variaciones en los niveles séricos de HDL-col, frente a los ratones ApoE^{-/-}. No obstante, algunos estudios en humanos hipercolesterolémicos encuentran, ligeros aumentos de HDL-col (alrededor del 5%) en los sujetos suplementados con 1-2 g de ácidos grasos ω 3 (Jacobson y col., 2012).

Por otro lado, los niveles séricos de VLDL y TG hallados tras aplicar la fórmula de Friedman, no variaron significativamente en los ratones ApoE^{-/-} en comparación con el Control. Tampoco el consumo de DHA+AF 50 incluido en la dieta influyó en estos valores. Sin embargo, las concentraciones séricas de VLDL y TG fueron significativamente más altas en los ratones del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, en comparación con los ratones ApoE^{-/-} y los del grupo Control. Otros autores afirman que sí existe una reducción de los triglicéridos en sujetos a que se les administra suplementos de ácidos grasos ω 3. Esto se debería a que el DHA aumenta de la actividad de la lipoproteín lipasa endotelial, producida por la activación de los receptores nucleares PPAR γ , que origina un aumento del aclaramiento de las VLDL y los quilomicrones, aunque este efecto es más relevante en la situación hiperinsulinémica postprandial y sobre los quilomicrones (Jacobson y col., 2012; Hurt-Camejo, 2017). En el presente estudio, las determinaciones séricas en los ratones se realizaron en ayunas, por lo que el efecto sobre las VLDL podría haber sido menos relevante. Además, hay estudios previos en ratones que indican que el

aumento de un 1% de fitol en la ingesta, un precursor del AF, produce un aumento significativo de triglicéridos en suero (Atshaves y col., 2004). El AF y otros ácidos grasos de cadena ramificada, se introducen en los fosfolípidos de las membranas e intervienen en la modificación de los niveles celulares de los lípidos (Van der Brink y Wanders, 2006), por lo que el contenido elevado de AF en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, también podría intervenir en el incremento de las concentraciones séricas de triglicéridos y VLDL en estos animales.

Por otro lado, el peso corporal final y el incremento de peso de los ratones ApoE^{-/-} fue similar al de los ratones Control, sin diferencias significativas entre ellos y manteniendo un incremento de peso corporal uniforme en todos los grupos experimentales, pese a que los tres grupos de ratones ApoE^{-/-} han sido alimentados con una dieta con mayor contenido calórico y de grasa que la dieta de los ratones C57BL/6. Estos resultados concuerdan con estudios recientes que indican que la presencia de la ApoE es esencial para la diferenciación de los adipocitos y la acumulación de triglicéridos en el tejido adiposo (Slim y col., 2017). Además, este menor aumento de peso relativo de los animales ApoE^{-/-} frente a los Controles, se podría asociar también a una mayor movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo y la activación de diferentes genes implicados en la β -oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético (Huebbe y col., 2015).

17. El DHA+AF 50 redujo la amiloidogénesis en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} comparado con el DHA+AF 1000

La expresión proteica de la APP y del péptido A β aumentaron significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasa, en comparación con los controles. Se ha descrito que una de las funciones de la ApoE en el SNC, es el transporte y aclaramiento del péptido A β (Wang y col., 2011). Además, está demostrado que la deficiencia de la ApoE favorece la acumulación del péptido A β en el hipocampo y neocórtex prefrontal, colaborando con la formación de las placas seniles extraneuronales que contribuyen a la progresión de la EA (Yeh y col., 2016). En la EA, los agregados extraneuronales del péptido A β limitan la plasticidad neuronal y promueven la pérdida de memoria (Hjorth y col. 2013). Como se describió previamente en el presente estudio, los ratones ApoE^{-/-} presentaron una pérdida de memoria y dificultades de aprendizaje que parecen estar mediados por un aumento de la expresión de A β en el hipocampo. Así mismo, se ha comprobado que la alimentación con una dieta rica en grasa, como sucede en el presente estudio, puede acelerar la acumulación cerebral del péptido A β en los ratones ApoE^{-/-} (Crisby y col., 2004), principalmente en el hipocampo (Simons y col., 1998; Janssen y col., 2017).

Nuestros resultados también mostraron que la expresión proteica de la APP y del péptido A β disminuyeron en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, en comparación con los niveles encontrados en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}. No obstante, el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, mostró una expresión hipocampal de

APP significativamente mayor que el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y también una mayor tendencia a acumular el péptido A β . Además, la actividad de la β -secretasa, enzima que favorece la vía amiloidogénica de la proteólisis de la APP, fue significativamente mayor en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, frente al resto de grupos experimentales, en los que no hubo variaciones. Estudios previos han mostrado que las concentraciones elevadas de DHA en el cerebro reducen los procesos de amiloidogénesis en este tejido (Lebbadi y col., 2011). Además, la composición de la membrana plasmática de las neuronas se encuentra alterada en los pacientes con la EA, con una gran disminución del contenido en DHA en las balsas lipídicas de las neuronas de la corteza (Martín y col., 2010). Esta disminución de la concentración del DHA aumenta la interacción entre la APP y la β -secretasa (Fabelo y col., 2014). Por lo tanto, el DHA puede inhibir la formación y la acumulación de agregados A β (Grimm y col., 2011). También se ha comprobado que el DHA puede estimular la activación de la microglía para fagocitar el péptido A β en el SNC (Hjorth y col., 2013). En nuestras condiciones, una mayor concentración de AF en el DHA aumenta la amiloidogénesis en los ratones ApoE^{-/-}. Este efecto del AF, podría deberse a que modifica la dinámica de los fosfolípidos en las membranas, así como el estado físico de las proteínas de membrana (Schönfeld y Struy, 1999), y compite con otros ácidos grasos de cadena larga procedentes de la dieta, en la formación de los fosfolípidos de las membrana celulares (Cribb y col., 2017, Chilton y col., 2017). La producción de A β a partir de la APP vía β -secretasa se reduce cuando las balsas lipídicas de la membrana están inalteradas y pueden actuar para separar la APP de dicha enzima (Martín y col., 2010; Gu y col., 2012; Hashimoto y col., 2015).

Los estudios en células gliales del hipocampo de rata confirmaron también la marcada toxicidad neuronal del AF, al producir alteración de las balsas lipídicas, de la homeostasis del calcio citosólico, efecto protonóforo y desenergización de las mitocondrias y mayor producción de EROs (Wanders y col., 2010; Schönfeld y col., 2016). En este sentido, se ha comprobado que la disfunción mitocondrial y su consiguiente estrés oxidativo incrementa la expresión y actividad de β -secretasa, mediante la activación de c-jun quinasa N-terminal (JNK) y quinasa p38 MAP, promoviendo de este modo la formación del péptido A β (Tamagno y col., 2005). Por todo ello, los resultados del presente trabajo indicaron que el DHA bajo en AF disminuyó la acumulación del péptido A β en el hipocampo de ratones ApoE^{-/-} y este efecto positivo se redujo al aumentar el contenido en AF en el DHA.

18. El DHA+AF 50 aumenta la expresión del BDNF en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} y en cultivos de microglía activada comparado con el DHA+AF 1000

En el presente estudio, la expresión proteica del factor de crecimiento BDNF disminuyó en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo Control. También, diversas investigaciones indican que la expresión proteica del BDNF se encuentra muy reducida en el hipocampo y la corteza cerebral de los pacientes con la EA (Wu y col., 2004; Liu y col., 2007; Hachisu y col., 2015), lo que concuerda con el resultado en los ratones ApoE^{-/-}.

El BDNF está implicado en un amplio espectro de procesos adaptativos relacionados con la regulación y el desarrollo cerebral, participando en la promoción de la supervivencia neuronal, el desarrollo de neuritas y la síntesis de neurotransmisores (Tan y col., 2016), así como, la plasticidad neuronal, fundamental para un aprendizaje y memoria adecuados (Boneva y Yamashima, 2012; Gururajan y Van den Buuse, 2014), funciones que se vieron afectadas en estos ratones ApoE^{-/-}, como hemos indicado apartados anteriores.

Por otra parte, en el hipocampo de los ratones del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, la expresión proteica del BDNF aumentó significativamente frente a los ratones ApoE^{-/-}, e incluso se observó una tendencia a elevar los valores del BDNF frente al Control, aunque no llegó a ser significativa. Resultados similares a los de nuestro estudio, se encontraron en ratas sometidas a una lesión cerebral traumática, en las que, el aumento del estrés oxidativo y el deterioro del aprendizaje, se asoció a la disminución de la expresión del BDNF. La suplementación de la dieta con DHA, contrarrestó los efectos de la lesión y normalizó los niveles del BDNF (Wu y col., 2004). Por otra parte, en otros estudios realizados también en ratas, la privación de AGPI-n3 en la dieta durante 15 semanas, produjo un aumento de la depresión y una disminución en los niveles cerebrales del BDNF (Rao y col., 2007; Rathod y col., 2015).

Por otro lado, en nuestro estudio realizado con cultivos de células Bv-2 de microglía de ratón, la expresión proteica del BDNF, disminuyó significativamente en los lotes activados frente al Control. Pero los lotes activados, LPS+DHA+AF 50, LPS+DHA+AF 100 y LPS+DHA+AF 500, aumentaron dicha expresión hasta normalizar con los lotes Control. Esto concuerda con estudios previos, que han

demostrado que la expresión proteica del BDNF aumenta de forma significativa en células microgliales humanas (CHME3) estimuladas con el péptido A β y co-incubadas con DHA (Hjorth y col., 2013).

No obstante, en nuestros lotes de microgía activada, la expresión del BDNF disminuyó de forma significativa, al aumentar la concentración de AF en el medio de cultivo. Así, en el grupo H₂O₂+DHA+AF 500 disminuyó la expresión proteica del BDNF en comparación con los grupos H₂O₂ y H₂O₂+DHA+AF 50.

Así mismo, el aumento de AF en el DHA de la dieta que consumieron los ratones del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, produjo una reducción significativa de la expresión del BDNF en el hipocampo en comparación al grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Esto podría deberse, en parte, a que los oligómeros del péptido A β son factores clave en la inhibición de la expresión del BDNF, como se ha demostrado en ratones transgénicos APP/PS1, utilizados también como modelo animal de la EA (Xia y col., 2017). Esto concuerda con nuestros resultados, antes comentados, en los que el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, también mostró una expresión de APP significativamente mayor que el grupo de ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y también una mayor tendencia a acumular A β . De este modo, la agregación de A β podría ser la causa de una disminución de la expresión del BDNF durante el desarrollo y progresión de la EA en este ratón transgénico ApoE^{-/-} (Xia y col., 2017). Por lo que, en nuestras condiciones, se demuestra por primera vez que este efecto positivo del DHA en el aumento de la expresión del BDNF, podría verse limitado cuando aumentamos su contenido de AF.

19. El DHA+AF 50 reduce la hiperfosforilación de la proteína tau en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} comparado con el DHA+AF 1000

La expresión proteica de tau fosforilada en serina 396 (p-tau) aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} en comparación con el Control, así como la relación p-tau/tau total. Sin embargo, la expresión de la proteína tau total, no mostró diferencias significativas con los Controles. Otros autores también han encontrado resultados similares y han demostrado que la carencia de la ApoE favorece el aumento de la fosforilación de la proteína tau (Genis y col., 1995). En condiciones patológicas, se ha observado un aumento anormal en los niveles de proteína tau hiperfosforilada en el citosol neuronal de cerebros con la EA (Kuret y col., 2005). Los procesos de hiperfosforilación de la proteína tau conllevan una pérdida de su función en el citoesqueleto y la polimerización de varias unidades de esta proteína formando los ovillos neurofibrilares característicos de la EA (Kopke y col., 1993; Mazanetz y Fischer, 2007). Además, está demostrado que la acumulación del péptido A β , como se observó en los ratones ApoE^{-/-} del presente estudio, desencadena una cascada patológica que incluye una lesión neurítica y la formación de ovillos neurofibrilares de la proteína tau (Glöckner y col., 2011; Jones y col., 2017). Todo ello conduce a una disfunción y muerte neuronal (Selkoe, 1999; Chen y col., 2000; Jones y col., 2017).

La expresión proteica de p-tau y la relación tau total/p-tau disminuyó significativamente en el hipocampo de los ratones del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y

del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, en comparación con el grupo ApoE^{-/-}. Por lo que se observó el efecto protector del DHA en la formación de los ovillos neurofibrilares. Sin embargo, la expresión proteica de p-tau en los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, fue mayor significativamente que en los ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Este efecto negativo del AF, que favoreció la hiperfosforilación de tau, puede deberse a que el AF induce una serie de actividades tóxicas en las células gliales y neuronales que incluyen disfunción mitocondrial, desregulación de la homeostasis del calcio intracelular y alteración de la vía de señalización inositoltrifosfato-Ca²⁺ (IP3- Ca²⁺). Todo ello afectaría a la fosforilación de la proteína tau, al aumentar la expresión y actividad de la quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo II (CaMKII) (Schönfeld y Reiser, 2016). La CaMKII, una de las proteinquinasas cerebrales más abundantes, está regulada por las concentraciones de calcio intraneuronal y está involucrada en la fosforilación de la proteína tau (Mazanetz y Fischer, 2007; Khan y Bloom, 2016).

En nuestros resultados, la expresión proteica de la CaMKII en el hipocampo, también aumentó significativamente en el grupo ApoE^{-/-} respecto a los animales Control. Sin embargo, la expresión proteica de CaMKII en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, disminuyó significativamente en comparación con el grupo de los ratones ApoE^{-/-}. Posiblemente como consecuencia de la disminución de esta quinasa en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, también se observó esta disminución de la expresión de p-tau y la relación p-tau/tau total, en comparación con los ratones ApoE^{-/-}, comentada anteriormente. Además, la expresión de la CaMKII aumentó significativamente en el hipocampo del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 en comparación con el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Este resultado apoyaría la hipótesis de que el aumento de expresión de la CaMKII y la hiperfosforilación de

tau en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}, se debería al incremento de las concentraciones de AF en el cerebro. La pérdida de la funcionalidad de la proteína tau conduce a una alteración patológica en las funciones estructurales y de regulación del citoesqueleto neuronal que afectan a la actividad neuronal normal, como el mantenimiento de una morfología adecuada, el transporte axonal y la función sináptica. Todo ello favorece el desarrollo de procesos neurodegenerativos de forma inevitable (Roy y col., 2005).

Por otra parte, esta hiperfosforilación de la proteína tau producida por enzimas, como la CaMKII y otras quinasas, puede ser inhibida por el BDNF (Liu y col., 2003; Liu y col., 2007; Hachisu y col., 2015). Por lo que la disminución de la expresión de p-tau en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, podría también deberse, en parte, al aumento significativo de la expresión de BDNF en este grupo frente a los ratones ApoE^{-/-}. Aunque, a pesar de los estudios realizados hasta la fecha, aún no se han establecido plenamente las condiciones fisiológicas y fisiopatológicas relativas a la anormal hiperfosforilación de proteínas tau (Barage y Sonawane, 2015; Khan y Bloom, 2016). La inhibición de las quinasas responsables de hiperfosforilación de tau, según Khan y Bloom, sería una estrategia farmacológica interesante para bloquear la formación de ovillos fibrilares intraneuronales de la proteína tau (Khan y Bloom, 2016).

De este modo, el aumento de la fosforilación de tau en los ratones que consumieron mayor concentración de AF, que bien podría ser debida al aumento de la expresión del péptido A β , la CaMKII o la disminución del BDNF, sería una de las explicaciones a la merma de capacidad cognitiva de estos ratones, discutida anteriormente en el presente trabajo.

20. El DHA+AF 50 reduce la inflamación en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} y en cultivos de microglía activada comparado con el DHA+AF 1000

La expresión proteica de las principales citoquinas pro-inflamatorias, IL-6 y TNF- α , así como la enzima iNOS, aumentaron significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo Control. Pero disminuyeron significativamente en los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, respecto al grupo ApoE^{-/-} e incluso frente al grupo Control. En el envejecimiento del cerebro, y especialmente durante un envejecimiento patológico como en la EA, existe un proceso de inflamación crónica sostenida. Los pacientes con la EA y placas amiloides, y que no muestran signos de demencia, tienen muy pocos signos de neuroinflamación y neurodegeneración (Janssen y Kiliaan, 2014; Scheltens y col., 2016), sugiriendo que el componente inflamatorio de la EA es al menos parcialmente responsable de la neurodegeneración. Estos estudios coinciden con nuestros resultados, en los que los ratones ApoE^{-/-} presentaron un déficit de memoria espacial a la vez que un aumento en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias descritas. En este sentido, diferentes estudios en el ratón ApoE^{-/-} confirmaron una correlación positiva entre la reducción de la actividad de la ApoE, el aumento de acúmulos del péptido A β , la presencia intraneuronal de ovillos neurofibrilares de p-tau y el incremento del proceso inflamatorio (Masliah y col., 1995; Montine y col., 1999; Rahman y col., 2005). Además, los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 mejoraron sus capacidades cognitivas a la vez que se redujo el componente inflamatorio en el hipocampo.

Está demostrado también que el contenido de DHA es muy bajo en las células del córtex frontal y del hipocampo de los pacientes con la EA, frente a los sujetos control de su misma edad y que la expresión de derivados antiinflamatorios del DHA, se reduce significativamente en el cerebro de estos pacientes (Fabelo y col., 2014). En consecuencia, aumenta el proceso inflamatorio en el cerebro afectado por esta patología (Serhan y col., 2015). Por otro lado, la suplementación con DHA, aumenta su concentración en los fosfolípidos de diferentes regiones cerebrales en modelos animales de EA y reduce el proceso inflamatorio (Hashimoto y col. 2006; Bascoul-Colombo y col. 2016).

En varios estudios se ha demostrado que existe un aumento de la expresión proteica de las citoquinas pro-inflamatorias en células gliales que rodean las placas extraneuronales del péptido A β en los cerebros con la EA (Zhu y Chu, 2010; Gao y col., 2012; Dhaunsi y col., 2016). En este sentido, hemos observado que la expresión de IL-6, TNF- α , COX-2 e iNOS en los cultivos celulares de microglía de ratón, aumentados significativamente en los lotes activados frente al Control, se redujeron en los grupos co-incubados con el DHA de baja concentración en AF. Estos resultados se corresponden con los de diferentes estudios previos realizados con varios tipos de células, incluyendo células de la microglía (Bouwens y col., 2010; Kiecolt-Glaser y col., 2011; Wang y col., 2015, Heras-Sandoval y col., 2016). Estos autores demostraron la capacidad del DHA para reducir la intensidad del proceso inflamatorio y para facilitar la fagocitosis del péptido A β por la microglía humana (Hjorth y col., 2013).

Sin embargo, al comparar los grupos de ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 50, el incremento de AF en el DHA, produjo un aumento significativo de

la expresión de estas citoquinas pro-inflamatorias en el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000. De nuevo, estos resultados concuerdan con la menor capacidad de aprendizaje y memoria espacial de estos ratones que consumieron un DHA con mayor concentración de AF. Asimismo, en nuestro estudio *in vitro*, la expresión de la COX-2 aumentó significativamente en los grupos de microglía activada y co-incubada con el DHA de mayor contenido en AF, frente a los grupos con DHA con menor concentración de AF. Además, este aumento de la expresión de la COX-2, se relacionó con la tendencia de aumentar la expresión de TNF- α e IL-6 en los grupos de microglía activada co-incubados con el DHA de alto contenido en AF. Todos estos resultados podrían deberse a que el AF, e igualmente su derivado el ácido pristánico, ejercen una fuerte actividad citotóxica en las células cerebrales, que se manifiesta por la desregulación del calcio, la despolarización mitocondrial, la muerte celular y la promoción de la amiloidogénesis y la fosforilación de tau (Rönicke y col., 2009; Roca-Saavedra y col., 2017). Diversos autores describen además que la microglía se activa por estos acúmulos del péptido A β y la proteína p-tau induciendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, principalmente la IL-6 y el TNF- α (Cagnin y col., 2001). Todo ello, favorece la exacerbación de un proceso inflamatorio y origina un importante daño neuronal característico de la EA (Amor y col., 2010; Fernandez y col., 2013; Doens y Fernández, 2014), siendo el grado de deterioro cognitivo inversamente proporcional al alcance de la activación microglial (Yokokura y col., 2011).

Por otro lado, para que el DHA presente este efecto antiinflamatorio que ya se ha comentado, es necesaria la formación de mediadores pro-resolución de la inflamación (SPMs). Éstos son derivados del DHA, y se encuentran muy reducidos en el cerebro de los pacientes con la EA, en los que la inflamación es elevada en

diferentes regiones del cerebro (Rao y col., 2007; Wang y col., 2015). Los SPMs se sintetizan vía ciclooxigenasa y lipoxigenasa a partir del DHA presente en las membranas celulares y tienen características anti-inflamatorias e incluyen: protectinas, resolvinas serie-D y maresinas (Lalancette-Hébert y col., 2011; Serhan y col., 2015). En este sentido, un aumento del consumo de AF podría favorecer el incremento de la concentración de AF en los fosfolípidos de las membranas neuronales, en detrimento de otros ácidos grasos, como por ejemplo el DHA. Esto podría deberse a la existencia de una competición entre los diferentes ácidos grasos procedentes de la dieta por formar parte de los fosfolípidos de las membranas celulares, como han descrito varios autores (Cribb y col., 2017, Chilton y col., 2017). Este hecho, disminuiría la síntesis de SPMs y el efecto antiinflamatorio del DHA, como se observó en los resultados del presente estudio. Por todo ello, hemos comprobado que un aumento de la concentración de AF en el DHA, interfirió en el efecto antiinflamatorio del DHA, tanto *in vivo* como *in vitro*.

21. El DHA+AF 50 reduce el estrés oxidativo en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} y en cultivos de microglía activada comparado con el DHA+AF 1000

La expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa, un biomarcador del estrés oxidativo, aumentó de forma significativa en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}, en comparación con el grupo Control. Varios estudios han demostrado que la deficiencia de la ApoE se asocia con una mayor peroxidación lipídica y estrés oxidativo en el cerebro (Lomnitski y col., 1997; Shea y col., 2002) y

que una excesiva actividad de la NADPH oxidasa está implicada en los procesos neurodegenerativos (Gao y col., 2012). Además, las placas del péptido A β pueden activar directamente a la NADPH oxidasa en la microglía, incrementando la producción de anión superóxido (Gao y col., 2012). Por lo tanto, no es sorprendente que la sobreactivación de esta enzima, debido a la continua presencia del péptido A β , se haya relacionado con la neurodegeneración crónica en pacientes con la EA (Qin y col., 2006).

El suplemento con DHA, de la dieta los ratones de los grupos ApoE^{-/+} DHA+AF 50 y ApoE^{-/+}DHA+AF 1000, redujo significativamente la expresión proteica de la subunidad p22phox, hasta valores similares al grupo Control. En este sentido, los resultados concuerdan con los descritos en diferentes estudios, en los que el DHA ha mostrado un efecto positivo en la prevención o el control del estrés oxidativo (Weiser y col., 2016; Belkouch y col., 2016). Posiblemente, una de las causas de estos efectos beneficiosos del DHA, sea la reducción de la amiloidogénesis y la inflamación (Barage y Sonawane, 2015; MacLeod y col., 2015), ya comentados anteriormente; pues el acúmulo del péptido A β puede activar directamente a la NADPH oxidasa, favoreciendo un aumento en la producción del anión superóxido por las células microgliales (Gao y col., 2012).

Adicionalmente, en los cultivos de células Bv-2 activadas, la sobreexpresión de la subunidad p22phox estuvo acompañada de un aumento significativo de la producción del anión superóxido, respecto a los grupos Control. Tanto la expresión proteica de la subunidad p22phox, como la producción del anión superóxido, disminuyeron significativamente con el DHA con baja concentración de AF. Sin embargo, al aumentar la concentración de AF, también aumentaron de forma

significativa ambos parámetros, reduciendo el efecto antioxidante del DHA. Numerosos estudios han demostrado que el AF aumenta la generación de EROs en las células neurales (Rönicke y col., 2009). Esto se debe a que el AF ejerce una fuerte actividad citotóxica en las células cerebrales, que se manifiesta por la desregulación del calcio neuronal y la despolarización mitocondrial, favoreciendo el estrés oxidativo (Rönicke y col., 2009; Schönfeld y Reiser, 2016; Chaudhary y Parvez, 2017). Además, las mitocondrias cerebrales responden a concentraciones muy bajas (micromolares) de AF con una intensa disminución de su capacidad de retención de calcio (Schönfeld y col., 2006; Chaudhary y Parvez, 2017). La perturbación de la disposición de los lípidos de la membrana interna mitocondrial, por la incorporación de AF, aumenta también la permeabilidad pasiva a los protones (Gutknecht, 1988; Roca-Saavedra y col., 2017). Como consecuencia de la disminución del transporte de electrones, aumenta la generación de EROs y la muerte celular (Grings y col., 2012; Schönfeld y Reiser, 2016; Chaudhary y Parvez, 2017). Además, los estudios en astrocitos del hipocampo de rata, confirmaron la marcada toxicidad del AF, debido a que producía alteraciones en la homeostasis del calcio citosólico, desenergización de las mitocondrias y mayor producción de EROs (Wanders y col., 2010, Roca-Saavedra y col., 2017). La inducción del estrés oxidativo por AF también se observó en las mitocondrias aisladas de cerebro de rata (Schönfeld y Reiser, 2006) y se atribuyó en gran medida a la interferencia de AF con la cadena respiratoria a nivel del complejo I.

Por otro lado, la expresión proteica de los enzimas antioxidantes SOD 1, catalasa, GPx y GRd, aumentaron en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} frente al grupo Control. Posiblemente, esto se debe a que el aumento del estrés oxidativo producido en los ratones por la ausencia de la ApoE, ya comentado, favorece la

expresión de los enzimas antioxidantes estudiados. En este sentido, en diferentes investigaciones se ha comprobado que los niveles más altos de peroxidación lipídica en los cerebros de los pacientes con EA, van acompañados de un aumento en la expresión proteica de SOD 1, catalasa, GPx y GRd (Lovell y col., 1995; Schuessel y col., 2004; Davis y Pennypacker, 2016).

Paralelamente a los resultados anteriores, en los animales que consumieron DHA en su dieta, tanto en los grupos de ratones ApoE^{-/-} como en los C57BL/6, se redujo la expresión de las enzimas antioxidantes SOD-1, catalasa, GPx y GRd, en comparación con el grupo Control. Esto podría deberse a una menor necesidad de estos enzimas, al disminuir el estrés oxidativo con el suplemento de DHA. Sin embargo, al elevar el contenido de AF en el DHA, la expresión de la catalasa y la GPx aumentaron significativamente en el hipocampo de los ratones del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, en comparación con el grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Además, se observó una tendencia a incrementar la expresión proteica de la SOD 1 en los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000, frente a los ratones del grupo ApoE^{-/-}+DHA+AF 50. Resultados similares encontramos en nuestro estudio *in vitro*, en el que la expresión de los enzimas antioxidantes SOD 1, catalasa, GPx y GRd disminuyeron en los lotes de células microgliales activadas y co-incubadas con el DHA bajo en AF, frente a los grupos activados. Además, existe una tendencia dosis dependiente a aumentar la expresión de estos enzimas antioxidantes en las células activadas, al aumentar la concentración de AF en el medio. Este aumento, pudo deberse a un mecanismo compensatorio, por el incremento de las EROs y ERNs, producido por el AF, como encuentran en su estudio Chaudhary y Parvez, (2017) en el SNC. Además, diferentes autores han indicado que el aumento de EROs en el tejido cerebral, intenta ser compensado por el aumento de expresión de los enzimas

antioxidantes: SOD 1, catalasa, GPx y GRd (Flynn y Melov, 2013; Davis y Pennypacker, 2016). De hecho, los niveles bajos de antioxidantes pueden promover un aumento de la actividad de la COX y la lipoxigenasa, enzimas que catalizan una rama de la cascada de transformación del ácido araquidónico en tromboxanos, aumentando así los procesos inflamatorios en el cerebro (Chiurchiù y col., 2016). Por todo ello, cabría esperar que los suplementos de DHA con baja concentración de AF, tengan una capacidad antioxidante en el SNC más elevada que un DHA con mayor concentración de AF; puesto que el AF, en modelos animales de la EA, presenta un efecto neurotóxico y pro-oxidante.

22. El DHA+AF 50 reduce la apoptosis en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} y en cultivos de microglía activada comparado con el DHA+AF 1000

La expresión proteica de la cas-3 aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo Control. La cas-3 se vincula con la aparición de procesos apoptóticos y muerte neuronal. Asimismo, esta proteína está relacionada con la disfunción mitocondrial y la generación de EROs, a través de la interrupción de la cadena de transporte de electrones (Ricci y col., 2003). Estos resultados se apoyan en los encontrados *in vitro* del presente estudio. Las células microgliales activadas presentaron un incremento significativo de la expresión proteica de la cas-3, junto con una disminución en la supervivencia celular frente a los lotes Control. Estos resultados están en consonancia con los publicados por varios investigadores, que afirman que el aumento de la acumulación del péptido

A β , la hiperfosforilación de la proteína tau, el aumento de procesos inflamatorios y el estrés oxidativo, conducen a un aumento de apoptosis, terminando en los pacientes con EA en la atrofia cerebral (Lehner y col., 2011; Du H. y col., 2012; De la Monte y Tong, 2014; Barage y Sonawane, 2015).

En el presente estudio, la expresión proteica de la cas-3 disminuyó de forma significativa en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}+DHA+AF 50 y ApoE^{-/-}+DHA+AF 1000 en comparación con los ratones ApoE^{-/-}. Así mismo, en el estudio *in vitro*, la expresión proteica de la cas-3 disminuyó en los grupos activados y co-incubados con DHA, en comparación con los grupos estimulados sin DHA. Esto podría deberse a que el DHA promueve la supervivencia celular a través de la inhibición de la cas-3, protegiendo a las neuronas de la neurodegeneración (Janssen y Kiliaan, 2014). Se ha comprobado además, que durante el estrés oxidativo, el DHA activa la síntesis de neuroprotectina D1 (NPD1) y de proteínas anti-apoptóticas Bid, Bad y Bax, y disminuye la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bcl-2 y la cas-3 (Mukherjee y col., 2007). Además, el DHA también aumenta el BDNF, y tanto el DHA como el BDNF afectan a las vías de señalización de la Akt (protein kinase, PKB) y ERK/MAPK/CREB, para promover en última instancia la plasticidad neuronal y neurogénesis, y evitar la muerte neuronal, fundamental para el aprendizaje y la memoria (Boneva y Yamashima, 2012; Gururajan y van den Buuse, 2014). El DHA también mitiga la pérdida de estructuras intracelulares en los modelos de neurodegeneración, ayudando a mantener los axones sanos y la integridad de estructuras sinápticas necesarias para la correcta función cognitiva, reduciendo de esta forma el proceso apoptótico (Calon y col., 2005; Dyllal y col., 2010).

Sin embargo, la supervivencia celular disminuyó al aumentar la concentración de AF en los cultivos. Como ya se ha mencionado, el AF aumenta la formación de EROs (Chaudhary y Parvez, 2017; Roca-Saavedra y col., 2017), lo que activa de forma directa la apoptosis por la vía intrínseca y favorece la liberación y activación de casp y la apoptosis (Nagai, 2015; Roca-Saavedra y col., 2017). Esta muerte neuronal inducida por el aumento de la concentración de AF en el SNC, favorecería a su vez la formación de un mayor número de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, y aumentaría la inflamación y el estrés oxidativo en el hipocampo, agravando así la patología de la EA. Por todo ello, se ha comprobado, por primera vez, que el DHA con baja concentración de AF, disminuyó la muerte neuronal en el hipocampo, así como los demás mecanismos patológicos propios de la EA, y que este efecto del DHA se redujo al aumentar el contenido en AF.

En resumen, los datos obtenidos en nuestro estudio aportan evidencias de que la presencia del AF en los suplementos de DHA, podría reducir o atenuar los efectos beneficiosos del DHA en el SNC, e incluso podría favorecer el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas por su potente efecto neurotóxico. Los beneficios de la administración de un DHA con baja concentración de AF se observaron al mejorar el déficit cognitivo en nuestro modelo experimental de la Enfermedad de Alzheimer, así como reducir los procesos de amiloidogénesis, hiperfosforilación de tau, inflamación, oxidación y apoptosis. Del mismo modo, el DHA con baja concentración de AF presentó un efecto anti-inflamatorio, anti-oxidante y anti-apoptótico en cultivos de microglía Bv-2 activada. Por lo tanto, se podría proponer que la cantidad elevada de AF en los suplementos de DHA podría

ser causa de los resultados poco concluyentes obtenidos en los ensayos clínicos previos.

En la siguiente figura (Figura 47) se muestra un esquema que representa los efectos beneficiosos del DHA con baja concentración de AF, y cómo el aumento de la concentración de AF, en los suplementos de DHA, podría reducirlos, en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}.

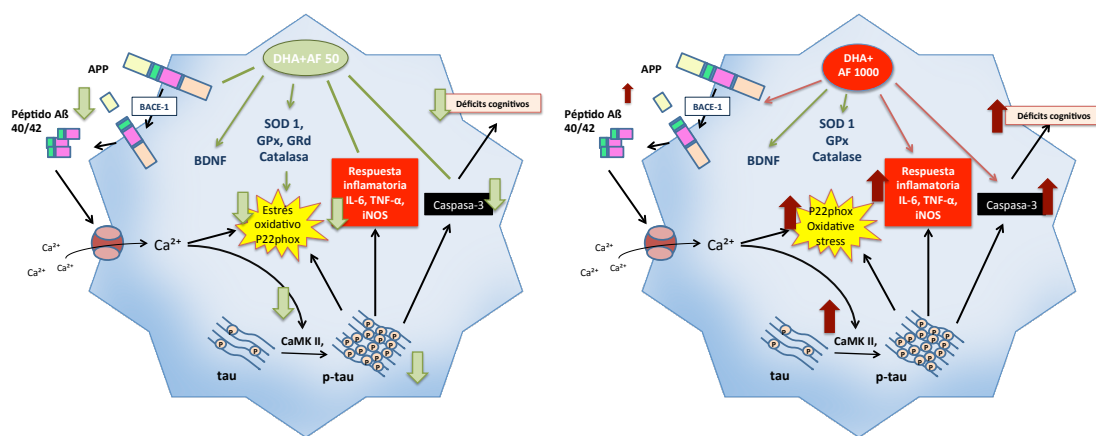


Figura 47. Esquema resumen de los efectos de A) el DHA con baja concentración en AF en el hipocampo de ratones ApoE^{-/-} en comparación con B) el DHA con alta concentración de AF. El DHA bajo en AF redujo la amiloidogénesis así como la cascada amiloide, que induce activación microglial, liberación de citoquinas y aumento de la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, hiperfosforilación de tau y muerte neuronal así como un aumento del déficit cognitivo. El AF aumentó la actividad de la β -secretasa BACE 1 y el proceso inflamatorio, apoptosis y la pérdida de las capacidades cognitivas en los ratones ApoE^{-/-}, en comparación con los ratones ApoE^{-/-} con el DHA con baja concentración de AF. DHA+AF 50: DHA con 50 ppm de AF; DHA+AF 1000: DHA con 1000 ppm de AF; APP: proteína precursora del péptido β -amiloide, BACE-1: β -secretasa 1; A β : péptido β -amiloide; BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro; SOD-1: Superóxido dismutasa; GPx: Glutacion peroxidasa, GRd: Glutacion reductasa; p22phox: subunidad p22phox de la NADH oxidasa (NOX); IL-6: interleuquina 6; TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; CaMKII: quinasa dependiente de calcio-calmodulina tipo 2; DHA-FL: DHA formando parte de los fosfolípidos de las membranas neuronales; p-tau: proteína tau fosforilada en serina 396.



IX. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

- **Memoria y cognición**

Los ratones ApoE^{-/-} mostraron una menor capacidad de aprendizaje y consolidación de la memoria en comparación con los ratones control. Ambos parámetros mejoraron significativamente en los ratones ApoE^{-/-} alimentados con un DHA bajo en AF en comparación con el grupo ApoE^{-/-} y empeoró cuando se utilizó un DHA con un nivel elevado de AF.

- **Amiloidogénesis**

La amiloidogénesis aumentó en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} en comparación con el control. La expresión proteica de la APP y el péptido A β disminuyeron significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} alimentados con una dieta enriquecida en DHA con bajo contenido en AF. Sin embargo, estos valores no se redujeron, con el DHA de alto contenido en AF. La actividad de la β -secretasa fue mayor significativamente en el grupo de ratones ApoE^{-/-} alimentados con un DHA con alta concentración de AF, en comparación con el resto de grupos experimentales.

- **Ovillos neurofibrilares**

La expresión proteica de la CaMKII, la p-tau y la relación p-tau/tau total aumentaron significativamente en el grupo ApoE^{-/-} en comparación con el control y disminuyeron en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} alimentados con una dieta enriquecida en DHA con bajo contenido en AF. Estos valores aumentaron en los ratones ApoE^{-/-} con un DHA con alta concentración de AF, en comparación con los ratones ApoE^{-/-} que consumieron DHA con bajo nivel de AF.

- **Protección neuronal y diferenciación celular**

La expresión proteica de BDNF disminuyó en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo control y se normalizó con la dieta enriquecida con el DHA con bajo contenido en AF. Estos valores disminuyeron al aumentar la concentración de AF en el DHA de la dieta de los ratones ApoE^{-/-} frente al grupo con DHA bajo en AF. Así mismo, la expresión de BDNF disminuyó significativamente en los cultivos de células microgliales Bv-2 activadas, frente al grupo control y se normalizó con el DHA con baja concentración de AF. No obstante, la expresión de BDNF disminuyó significativamente en la microglía activada con DHA y alta concentración de AF en comparación a los grupos con un DHA con baja concentración de AF.

- **Inflamación**

La expresión proteica de la IL-6, el TNF- α y la iNOS aumentaron en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto al grupo control y disminuyeron significativamente en los ratones ApoE^{-/-} con una dieta enriquecida en DHA y bajo contenido en AF frente a los ratones del grupo ApoE^{-/-}. El aumento del AF en el DHA produjo un aumento significativo de la expresión de estas citoquinas, sin modificar la iNOS, en estos ratones en comparación con los ratones ApoE^{-/-} con una dieta enriquecida en DHA y bajo contenido en AF.

De manera similar, el DHA con baja concentración de AF redujo la elevada expresión de estos parámetros en los cultivos de microglía activada. El aumento del AF mostró una tendencia a aumentar la expresión de estas citoquinas, siendo significativo para la COX-2.

- **Estrés oxidativo**

La expresión proteica de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa, SOD 1, catalasa, GPx y GRd aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto a los controles. La expresión proteica de estos biomarcadores disminuyó significativamente en hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} alimentados con el DHA, independientemente de la concentración de AF, hasta alcanzar valores del grupo Control.

Asimismo, la expresión proteica de estos biomarcadores, así como la producción del anión superóxido (O₂⁻), aumentaron significativamente en la microglía activada en comparación con el grupo Control, y se revirtió con la co-incubación del DHA con baja concentración de AF. No obstante, la expresión de la p22phox y la producción de O₂⁻, aumentaron significativamente la microglía activada y co-incubada con DHA y alta concentración de AF, frente al DHA bajo en AF.

- **Supervivencia celular y apoptosis**

La supervivencia celular disminuyó significativamente en los grupos de células microgliales Bv-2 activadas frente al grupo control, sin modificarse en los grupos activados y co-incubados con DHA y bajo nivel de AF. Sin embargo, la supervivencia celular disminuyó significativamente al aumentar la concentración de AF en los cultivos. La expresión de la Caspasa-3 aumentó significativamente en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-} respecto a los controles y disminuyó de forma significativa en los grupos de ratones a los que se les administró DHA, sin que hubiera diferencias significativas debidas a la concentración de AF. Asimismo, el aumento de la cas-3 en la microglía activada revirtió con la co-incubación de DHA independientemente de la concentración de AF.

X. CONCLUSIONES

1. La administración de un DHA bajo en AF reduce el deterioro cognitivo, la amiloidogénesis, la hiperfosforilación de la proteína tau, la inflamación y el estrés oxidativo en el hipocampo de los ratones ApoE^{-/-}, en comparación con un DHA con alta concentración de AF.

2. La supervivencia celular aumenta, y se reduce el proceso inflamatorio, la activación microglial y el estrés oxidativo en células microgliales activadas y co-incubadas con un DHA de bajo contenido en AF en comparación con la co-incubación con un DHA con una concentración mayor de AF.

3. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, se podría proponer que la cantidad elevada de AF en los suplementos de DHA podría ser causa de los resultados poco concluyentes obtenidos en los ensayos clínicos previos. Por ello, la realización de nuevos ensayos clínicos con un DHA de bajo contenido en AF, podría ofrecer nuevas perspectivas en la prevención y/o el tratamiento de la EA.



XI. BIBLIOGRAFÍA

Abubakari A.R., Naderali M.M., Naderali E.K. (2014). Omega-3 fatty acid supplementation and cognitive function: Are smaller dosages more beneficial. *Int. J. Gen. Med.* 7: 463–473.

Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G.M. y col. (2000) Inflammation and Alzheimers disease. *Neurobiology of Aging*. 21(3): 383–421.

Akira S., Takeda K. (2004) Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*. 4(7): 499–511.

Amor S., Puentes F., Baker D., Van der Valk P. (2010) Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. 129(2): 154–169.

Anderson V., Fenwick T., Manly T., Robertson I. (1998) Attentional skills following traumatic brain injury in childhood: A componential analysis. *Brain Inj.* 12, 937–949.

Antoniou X., Borsello T. (2012). The JNK signalling transduction pathway in the brain. *Frontiers in Bioscience*. 1(4): 2110–2120.

Antypa N., Van der Does A.J.W., Smelt A.H.M., Rogers R.D. (2009). Omega-3 fatty acids (fish-oil) and depression-related cognition in healthy volunteers. *J. Psychopharmacol.* 23: 831–840.

Aoki K., Uchihara T., Sanjo N., Nakamura A., Ikeda K., Tsuchiya K., Wakayama Y. (2003). Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction. *Stroke*. 34: 875–80.

Aranceta J., Pérez-Rodrigo C. (2012). Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: A systematic review. *Br. J. Nutr.* 107: S8–S22.

Arena G., Valente E.M. (2016). PINK1 in the limelight: multiple functions of an eclectic protein in human health and disease. *J Pathol.* 2017 Jan;241(2):251-263. doi: 10.1002/path.4815.

Arterburn L.M., Hall E.B., Oken H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 83: 1467S–1476S.

Ashford J.W. (2004). APOE genotype effects on Alzheimer's disease on set and epidemiology. *J.Mol.Neurosci.* 23: 157–165.

Atshaves B.P., McIntosh A.L., Payne H.R., Mackie J., Kier A.B., Schroeder F. (2005). Effect of branched-chain fatty acid on lipid dynamics in mice lacking liver fatty acid binding protein gene. *Am J Physiol Cell Physiol.* Mar;288(3):C543-58

Avdesh A., Wong P., Martins R.N., Martin-Iverson M.T. (2011). Memory function in a mouse genetic model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 25(3): 433-44.

Baierle M., Vencato P., Oldenburg L., Bordignon S., Zibetti M., Trentini C. y col. (2014). Fatty acid status and its relationship to cognitive decline and homocysteine levels in the elderly. *Nutrients*. 6: 3624–3640.

Barage S.H., Sonawane K.D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 52: 1-18.

Barcelo-Coblijn G., Murphy E.J. (2009). Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog. Lipid Res.* 48: 355–374.

Barkley R.A. (2001). The executive functions and self-regulation: An evolutionary neuropsychological perspective. *Neuropsychol. Rev.* 11: 1–29.

Barnes P.J., Karin M. (1997). Nuclear factor- κ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine*. 336(15): 1066–1071.

Bartus R.T., Dean R.L., Beer B., Lippa A.S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 217: 408–414.

Bartzokis G. (2011). Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown. *Neurobiol. Aging*. 32: 1341–1371.

Bateman R.J., Aisen P.S., De Strooper B., Fox N.C., Lemere C.A., Ringman J.M. y col. (2011). Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 3: 1–13.

Bell R.D., Winkler E.A., Sagare A.P., Singh I., LaRue B., Deane R., Zlokovic B.V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*. 68(3): 409–427.

Bell R.D., Winkler E.A., Singh I., Sagare A.P., Deane R., Wu Z. y col. (2012). Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*. 485: 512–16.

Bertram L., Tanzi R.E. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 768–778.

Beydoun M.A., Kaufman J.S., Satia J.A., Rosamond W., Folsom A.R. (2007). Plasma n-3 fatty acids and the risk of cognitive decline in older adults: The atherosclerosis risk in communities study. *Am. J. Clin. Nutr.* 85: 1103–1111.

Belkouch M., Hachem M., Elgot A., Van A.L., Picq M., Guichardant M. y col. (2016). The pleiotropic effects of omega-3 docosahexaenoic acid on the hallmarks of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*. 38: 1-11.

Blasbalg T.L., Hibbeln J.R., Ramsden C.E., Majchrzak S.F., Rawlings R.R. (2011). Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am. J. Clin. Nutr.* 93: 950–962.

Boimel M., Grigoriadis N., Lourdopoulos A., Touloumi O., Rosenmann D., Abramsky O., Rosenmann H. (2009). Statins reduce the neurofibrillary tangle burden in a mouse model of tauopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68: 314–325.

Boneva N.B., Yamashima T. (2012). New insights into “GPR40-CREB interaction in adult neurogenesis” specific for primates. *Hippocampus.* 22: 896–905.

Botella-Lopez A., Burgaya F., Gavin R. Garcia-Ayllon M.S., Gomez-Tortosa E., Pena-Casanova J., Urena J.M. y col. (2006). Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer’s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 5573–5578.

Bouwens M., Bromhaar M.G., Jansen J., Muller M., Afman, L.A. (2010). Postprandial dietary lipid-specific effects on human peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles. *Am. J. Clin. Nutr.* 91: 208–217.

Brandes R.P., Weissmann N., Schröder K. (2014). Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine.* 76: 208–226.

Brenna J.T., Diau G.Y. (2007). The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 77: 247–250.

Brenna J.T., Salem N. Jr., Sinclair A.J., Cunnane S.C. (2009). Alpha-linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 80: 85–91.

Brenna J.T., Varamini B., Jensen R.G., Diersen-Schade D.A., Boettcher J.A., Arterburn L.M. (2007). Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. *Am. J. Clin. Nutr.* 85: 1457–1464.

Broadhurst C.L., Cunnane, S.C., Crawford M.A. (1998). Rift valley lake fish and shellfish provided brain-specific nutrition for early homo. *Br. J. Nutr.* 79: 3–21.

Broom L., Marinova-Mutafchieva L., Sadeghian M., Davis J.B., Medhurst A.D., Dexter D.T. (2011). Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 50(5): 633–640.

Bryan J., Osendarp S., Hughes D., Calvaresi E., Baghurst K., van Klinken J.W. (2004). Nutrients for cognitive development in school-aged children. *Nutr. Rev.* 62: 295–306.

Bunik V.I., Raddatz G., Wanders R.J.A., Reiser G. (2006). Brain pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes are mitochondrial targets of the CoA ester of the Refsum disease marker phytanic acid, *FEBS Lett.* 580: 3551–3557

Busanello E.N., Zanatta A., Tonin A.M., Viegas C.M., Vargas C.R., Leipnitz G., y col. (2013) inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity and the respiratory chain by phytanic acid in cerebellum from young rats: possible underlying mechanisms of cerebellar ataxia in Refsum disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2013; 45: 137–44.

Butterfield D.A., Hensley K., Cole P., Subramaniam R., Aksenov M., Aksenova M. y col. (1997). Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: Relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 68: 2451-2457.

Cagnin A., Brooks D.J., Kennedy A.M., Gunn R.N., Myers R., Turkheimer F.E. y col. (2001). In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet.* 358: 461–467.

Cai Z., Wang C., He W., Tu H., Tang Z., Xiao M. y col. (2015). Cerebral small vessel disease and Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging.* 10: 1695-704.

Calabrese V., Guagliano E., Sapienza M., Panebianco M., Calafato S., y col. (2007). Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochem Res.* 32(4-5): 757-73.

Calderon, F., Kim, H.Y. (2004). Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 90: 979–988.

Calon F., Lim G.P., Morihara T., Yang F., Ubeda O., Salem N., y col. (2005). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid depletion activates caspases and decreases NMDA receptors in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* 22: 617–626.

Cao D., Kevala K., Kim J., Moon H.S., Jun S.B., Lovinger D., Kim H.Y. (2009). Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J. Neurochem.* 111: 510–521.

Casali B.T., Corona A.W., Mariani M.M., Karlo J.C., Ghosal K., Landreth G.E. (2015). Omega-3 Fatty Acids Augment the Actions of Nuclear Receptor Agonists in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 35:9173-9181.

Castellano J.M., Kim J., Stewart F.R., Jiang H., DeMattos R.B., Patterson B.W., y col. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med.* 3(89): 89ra57.

Cederholm T., Salem N., Jr. Palmblad J. (2013). Omega-3 fatty acids in the prevention of cognitive decline in humans. *Adv. Nutr.* 4: 672–676.

Champoux M., Hibbeln J.R., Shannon C., Majchrzak S., Suomi S.J., Salem N. Jr., Higley, J.D. (2002). Fatty acid formula supplementation and neuromotor development in rhesus monkey neonates. *Pediatr. Res.* 51: 273–281.

Chan K.Y., Wang W., Wu J., Liu L., Theodoratou E., Car J., Middleton L., y col. (2013). Global Health Epidemiology Reference Group (GHERG). Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis. *Lancet*. 381(9882):2016-23.

Chapuis J., Hansmannel F., Gistelinck M., Mounier A., Van Cauwenberghe C., Kolen K.V., y col. (2013). Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol. Psychiatry*. 18: 1225–1234.

Chaudhary S., Parvez S. (2017). Phytanic acid induced neurological alterations in rat brain synaptosomes and its attenuation by melatonin. *Biomed Pharmacother*. 95:37-46. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.156.

Chekxonin V.P., Baklaushev V.P., Iusubalieva G.M., Volgina N.E., Gurina O.I. (2012). Fundamental and applied aspects of the hematoencephalic barrier research. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. (8):66-78

Chen G., Chen K.S., Knox J., Inglis J., Bernard A., Martin S.J., y col. (2000). A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 408(6815): 975-9.

Chen C.T., Bazinet R.P. (2015). Beta-oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*. 92: 33–40.

Chen C.T., Domenichiello A.F., Trépanier M.O., Liu,Z., Masoodi M., Bazinet R.P. (2013). The low levels of eicosapentaenoic acid in rat brain phospholipids are maintained via multiple redundant mechanisms. *J. Lipid Res*. 54: 2410–2422.

Chen C.T., Kitson A.P., Hopperton K.E., Domenichiello A.F., Trepanier M.O., Lin L.E., y col. (2015). Plasma non-esterified docosahexaenoic acid is the major pool supplying the brain. *Sci. Rep*. 5: 15791.

Chen S., Oyarzabal E.A., Sung Y.F., Chu C.H., Wang Q., Chen S.L. y col. (2015) Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. *Glia*.63(1): 118–131.

Chen S., Subbaiah P.V. (2013). Regioisomers of phosphatidylcholine containing DHA and their potential to deliver DHA to the brain: Role of phospholipase specificities. *Lipids*. 48: 675–686.

Chiurchiù V., MacCarrone M. (2011). Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*. 15(9): 2605–2641.

Chilton F.H., Dutta R., Reynolds L.M., Sergeant S., Mathias R.A., Seeds M.C. (2016). Precision Nutrition and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Case for Personalized Supplementation Approaches for the Prevention and Management of Human Diseases. *PLoS One*. 11(5):e0155307. doi: 10.3390/nu9111165.

Chiurchiù V., Orlacchio A., Maccarrone M. (2016). Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:7909380.

Coleman R., Hayek T., Keidar S., Aviram M. (2006) A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice. *Acta Histochem.* 108(6): 415-24.

Conklin S.M., Gianaros P.J., Brown S.M., Yao J.K., Hariri A.R., y col. (2007). Long-chain omega-3 fatty acid intake is associated positively with corticolimbic gray matter volume in healthy adults. *Neurosci. Lett.* 421: 209–212.

Conquer J., Tierney M., Zecevic J., Bettger W., Fisher R. (2000). Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids* 35: 1305–1312.

Contestabile A. (2011). The history of the cholinergic hypothesis. *Behav. Brain Res.* 221: 334–340.

Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. (2003). Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*; 17: 1195-1214.

Cornejo F., von Bernhardi R. (2016). Age-Dependent Changes in the Activation and Regulation of Microglia. *Adv Exp Med Biol.* 949: 205-226.

Corvo M.L., Marinho H.S., Marcelino P., Lopes R.M., Vale C.A., y col. (2015). Superoxide dismutase enzymosomes: Carrier capacity optimization, in vivo behaviour and therapeutic activity. *Pharm Res.* 32: 91-102.

Coulson E.J., Paliga K., Beyreuther K., Masters C.L. (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem. Int.* 36: 175–184.

Crauwels H.M., Van Hove C.E., Holvoet P., Herman A.G., Bult H. (2003). Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. *Cardiovasc Res.* 59(1): 189-99.

Crawford M.A., Bloom M., Broadhurst C.L., Schmidt W.F., Cunnane S.C., y col. (2006). Brain elongation of linoleic acid is a negligible source of the arachidonate in brain phospholipids of adult rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 1050–1059.

Cribb L., Murphy J., Froud A., Oliver G., Bousman C.A., Sarris J. (2017). Erythrocyte polyunsaturated fatty acid composition is associated with depression and FADS genotype in Caucasians. *Nutrients.* 9(11). pii: E1165.

Crisby M., Rahman S.M., Sylven C.m Winblad B.m Schultzberg M. (2004). Effects of high cholesterol diet on gliosis in apolipoprotein E knockout mice. Implications for Alzheimer's disease and stroke. *Neurosci. Lett.* 369: 87–92.

- Darios F., Davletov B. (2006). Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature*. 440: 813–817.
- Davies P., Maloney A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2, 1403.
- Dawney A.B., Millar D.J. (1997). Glycation and advanced glycation end-product formation with icodextrin and dextrose. *Perit Dial Int*. 17: 52-58.
- Deane R., Sagare A., Hamm K., Parisi M., Lane S., Finn M.B. y col. (2008). ApoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest*. 118(12): 4002–4013.
- De Bruijn R.F., Bos M.J., Portegies M.L., Hofman A., Franco O.H., Koudstaal P.J., Ikram M.A. (2015). The potential for prevention of dementia across two decades: the prospective, population-based Rotterdam Study. *BMC Med*. 13: 132.
- De Chaves E.P., Narayanaswami V. (2008) Apolipoprotein E and cholesterol in aging and disease in the brain. *Future Lipidol*. 3: 505–30.
- De la Monte S.M., Wands J.R. (2006). Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 9(2): 167–181.
- De la Monte S.M., Tong M. (2014). Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol*. 88: 548–559.
- Demar J.C., Ma K., Chang L., Bell J.M., Rapoport S.I. (2005). Linolenic acid does not contribute appreciably to docosahexaenoic acid within brain phospholipid of adult rats fed a diet enriched in docosahexaenoic acid. *J. Neurochem*. 94: 1063–1076.
- De Mattos R.B., Brendza R.P., Heuser J.E., Kierson M., Cirrito J.R., Fryer J. y col. (2001). Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human ApoE transgenic mice. *Neurochem Int*. 39(5-6): 415-25.
- Deng Y., Ren X., Yang L., Lin Y., Wu X. (2003). AJNK-dependent pathway is required for TNFalpha induced apoptosis. *Cell*. 115(1): 61–70.
- De Strooper B., Annaert W., (2010). Novel research horizons for presenilins and gammasecretases in cell biology and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 26: 235–260.
- Devi L., Prabhu B.M., Galati D.F., Avadhani N.G., Anandatheerthavarada H.K. (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *The Journal of Neuroscience*. 26 (35): 9057–9068.

Dhaunsi G.S, Alsaeid M., Akhtar S. (2016). Phytanic acid activates NADPH oxidase through transactivation of epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells. *Lipids Health Dis.* 15: 105-111.

Dickson D.W. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 56(4): 321–339.

Dieckmann M., Dietrich M.F., Herz J. (2010). Lipoprotein receptors an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. *Biol Chem.* 391: 1341–1363.

Dingwall C. (2001). Spotlight on BACE: the secretases as targets for treatment in Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 108: 1243–1246.

Doens D., Fernández P.L. (2014). Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation.* 11:48.

Dorey E., Chang N., Liu Q.Y., Yang Z., Zhang W. (2014). Apolipoprotein E, amyloid-beta, and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 30(2): 317-30.

Du H., Guo L., Yan SS. (2012). Synaptic mitochondrial pathology in Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal.* 16(12): 1467-75.

D'Uscio L.V., Baker T.A., Mantilla C.B., Smith L., Weiler D., y col. (2001). Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21(6): 1017-22.

D'Uscio L.V., Smith L.A., Katusic Z.S. (2001) Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of Apolipoprotein E-deficient mice. *Stroke.* 32(11): 2658-64.

Dyall S.C. (2015). Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci.* 21 (7): 52.

Dyall S.C., Michael G.J., Michael-Titus A.T. (2010). Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J. Neurosci. Res.* 88: 2091–2102.

Eaton S., Bartlett K., Pourfarzam M. (1996). Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem. J.* 320: 345–357.

Eckert A., Schulz K.L., Rhein V., Götz J. (2010). Convergence of amyloid- β and tau pathologies on mitochondria in vivo. *Molecular Neurobiology.* 41(2-3): 107–114.

Ellinghaus P., Wolfrum C., Assmann G., Spener F., Seedorf U. (1999). Phytanic acid activates the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in

sterol carrier protein 2-/sterol carrier protein x-deficient mice, *J. Biol. Chem.* 274: 2766–2772.

Emken E.A., Adlof R.O., Gulley R.M. (1994). Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim. Biophys. Acta.* 1213: 277–288.

Evin G., Weidemann A. (2002). Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta-amyloid peptides. *Peptides.* 23: 1285–1297.

Fernandez P.L., Britton G.B., Rao K.S. (2013). Potential immunotargets for Alzheimer's disease treatment strategies. *J Alzheimers Dis.* 33(2): 297–312.

Fischer R., Maier O. (2015). Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid Med Cell Longev.* 2015:610813.

Fleith M., Clandinin M.T. (2005). Dietary pufa for preterm and term infants: Review of clinical studies. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* 45: 205–229.

Flynn J.M., Melov S. (2013). SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med.* 62: 4-12.

Forman M.S., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2004). Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.* 10: 1055–1063.

Francis P.T., Sims N.R., Procter A.W., Bowen D.M. (1993). Cortical pyramidal neurone loss may cause glutamatergic hypoactivity and cognitive impairment in Alzheimer's disease: investigative and therapeutic perspectives. *J. Neurochem.* 60: 1589–1604.

Fransen P., Van Assche T., Guns P.J., Van Hove C.E., De Keulenaer G.W. y col. (2008). Endothelial function in aorta segments of apolipoprotein E-deficient mice before development of atherosclerotic lesions. *Pflugers Arch.* 455(5): 811-8.

Freudenberger T., Oppermann M., Heim H.K., Mayer P., Kojda G., Schrör K., Fischer J.W. (2010). Proatherogenic effects of estradiol in a model of accelerated atherosclerosis in ovariectomized ApoE-deficient mice. *Basic Res Cardiol.* 105(4): 479-86.

Gao H.M., Zhou H., Hong J.S. (2012). NADPH oxidases: novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Trends in Pharmacological Sciences.* 33 (6): 295–303.

Galvagnion C., Buell A.K., Meisl G., Michaels T.C., Vendruscolo M., Knowles T.P., Dobson C.M. (2015). Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat. Chem. Biol.* 11: 229–234.

Galloway S., Pallebage-Gamarallage M.M., Takechi R., Jian L., Johnsen R.D., Dhaliwal S.S., Mamo J.C. (2008). Synergistic effects of high fat feeding and apolipoprotein E deletion on enterocytic amyloid-beta abundance. *Lipids Health Dis.* 7: 15.

Garai K, Frieden C. (2010). The association-dissociation behavior of the ApoE proteins: kinetic and equilibrium studies. *Biochemistry*. 49: 9533–9541.

Garcés M, Crespo C, Finkel L, Arroyo M. (2016). Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social. Ed: UCM y Alianza Española de Enfermedades Neurodegenerativas. Madrid. 1-175.

García González J. M. (2014). ¿Por qué vivimos más? Descomposición por causa de la esperanza de vida española de 1980 a 2009. *Revista Española de Investigaciones Sociológicas*. <http://doi.org/10.5477/cis/reis.148.39>.

Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, y col. (2011). APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry*. 16: 903–07.

Genis I, Gordon I, Sehayek E, Michaelson D.M. (1995). Phosphorylation of tau in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett*. 199(1): 5-8.

Ginsberg S.D., Che S., Counts S.E., Mufson E.J. (2006). Shift in the ratio of three-repeat tau and four-repeat tau mRNAs in individual cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Neurochem*. 96: 1401–1408.

Giusto N.M., Salvador G.A., Castagnet P.I., Pasquare S.J., de Boschero, M.G.I. (2002). Age-associated changes in central nervous system glycerolipid composition and metabolism. *Neurochem. Res*. 27: 1513–1523.

Glöckner F, Ohm T.G. (2014). Tau pathology induces intraneuronal cholesterol accumulation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 73: 846–854.

Glöckner F, Meske V, Lütjohann D, Ohm T.G. (2011). Dietary cholesterol and its effect on tau protein: a study in apolipoprotein E-deficient and P301L human tau mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 70(4): 292-301.

Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. (2006). NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology*. 72(11): 1493–1505.

Goate A, Chartier-Harlin M.C., Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, y col. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 349:704–706.

Goedeke L, Fernández-Hernando C. (2014). MicroRNAs: a connection between cholesterol metabolism and neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 72 Pt A: 48-53.

Gong C.X., Iqbal K. (2008). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr. Med. Chem*. 15: 2321–2328.

Goustard-Langelier B., Guesnet P., Durand G., Antoine J.M., Alessandri J.M. (1999). n-3 and n-6 fatty acid enrichment by dietary fish oil and phospholipid sources in brain cortical areas and nonneural tissues of formula-fed piglets. *Lipids*. 34: 5–16.

Goustard-Langelier B., Guesnet P., Durand G., Antoine J.M., Alessandri J.M. y col. (2011). Elongase reactions as control points in long-chain poly unsaturated fatty acid synthesis. *PLoS One* . 6: e 29662.

Granold M., Moosmann B., Staib-Lasarezik I., Arendt T., Del Rey A., Engelhard K. y col. (2015). High membrane protein oxidation in the human cerebral cortex. *Redox Biol*. 4: 200-7.

Green K.N., Martinez-Coria H., Khashwji H., Hall E.B., Yurko-Mauro K.A., Ellis L., LaFerla F.M. (2007). Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *J.Neurosci*. 27: 4385–4395.

Grimm M. O., Grosgen S., Riemenschneider M., Tanila H., Grimm H. S., and Hartmann T. (2011). From brain to food: analysis of phosphatidylcholins, lysophosphatidylcholins and phosphatidylcholin plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J Chromatogr*. 1218: 7713-7722.

Grimm M.O., Kuchenbecker J., Grosgen S., Burg V.K., Hundsdorfer B., Rothhaar T.L. y col. (2011). Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J. Biol. Chem*. 286: 14028–14039.

Grimm M.O., Michaelson D., Hartmann T. (2017). Omega-3 fatty acids, lipids and apoE lipidation in Alzheimer's disease: a rationale for multi-nutrient dementia prevention. *J Lipid Res*. pii: jlr.R076331. doi: 10.1194/jlr.R076331.

Grings M., Tonin A.M., Knebel L.A., Zanatta A., Moura A.P., Filho C.S. (2012). Phytanic acid disturbs mitochondrial homeostasis in heart of young rats: a possible pathomechanism of cardiomyopathy in Refsum disease. *Mol Cell Biochem*. 366: 335-343.

Grootendorst J., de Kloet E.R., Dalm S., Oitzl M.S. (2001). Reversal of cognitive deficit of apolipoprotein E knockout mice after repeated exposure to a common environmental experience. *Neuroscience*. 108:237-247.

Gu Y., Schupf N., Cosentino S.A., Luchsinger J.A., Scarmeas N. (2012). Nutrient intake and plasma beta-amyloid. *Neurology*. 78: 1832–1840.

Gu X., Sun J. Li S., Wu X., Li L. (2013). Oxidative stress induces DNA demethylation and histone acetylation in SH-SY5Y cells: potential epigenetic mechanisms in gene transcription in A β production. *Neurobiol Aging*. 34(4):1069-79.

Guns P.J., Van Assche T., Verreth W., Franssen P., Mackness B., Mackness M. y col. (2008). Paraoxonase 1 gene transfer lowers vascular oxidative stress and

improves vasomotor function in apolipoprotein E-deficient mice with pre-existing atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 153(3): 508-16.

Guerreiro R., Hardy J. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 11: 732-37.

Gururajan A., van den Buuse M. (2014). Is the mtor-signalling cascade disrupted in schizophrenia? *J. Neurochem.* 129: 377-387.

Gutknecht J. (1998). Proton conductance caused by long-chain fatty acids in phospholipid bilayer membranes. *J Membr Biol.* 106: 83-93.

Haass C., De Strooper B. (1999). The presenilins in Alzheimer's disease—proteolysis holds the key. *Science.* 286: 916-919.

Halliday M.R., Rege S.V., Ma Q., Zhao Z., Miller C.A., Winkler E.A., Zlokovic B.V. (2016). Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 36(1): 216-27.

Harper S. (2014). Economic and social implications of aging societies. *Science.* 346(6209): 587-591.

Hashimoto M., Hossain S., Katakura M., al Mamun A., Shido O. (2015). The binding of A β 1-42 to lipid rafts of rbc is enhanced by dietary docosahexaenoic acid in rats: Implicates to Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1848: 1402-1409.

Hauser P.S., Narayanaswami V., Ryan R.O. (2011). Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res.* 50(1): 62-74.

Hayden M.S., Ghosh S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 132(3): 344-362.

Hayward J.H., Lee S.J. (2014). A decade of research on TLR2 discovering its pivotal role in glial activation and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Experimental Neurobiology.* 23(2): 138-147.

Hellgren LI. (2010). Phytanic acid-an overlooked fatty acid in dairy fat?. *Ann N Y Acad Sci.* 1190: 42-9.

Heneka M.T., Kummer M.P., Latz E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 463-477.

Heras-Sandoval D., Pedraza-Chaverri J., and Pérez-Rojas. J. (2016). Role of docosahexaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 10;13(1):61. doi: 10.1186/s12974-016-0525-7.

Hernández-Romero M.C., Delgado-Cortés M.J., Sarmiento M., de Pablos R.M., Espinosa-Oliva A.M., Argüelles S., y col. (2012). Peripheral inflammation increases

the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. *Neuro Toxicology* 33(3): 347–360.

Hernández-Rodas M.C., Valenzuela R., Echeverría F., Rincón-Cervera M.Á., Espinosa A., Illesca P. y col. (2017). Supplementation with Docosahexaenoic Acid and Extra Virgin Olive Oil Prevents Liver Steatosis Induced by a High-Fat Diet in Mice through PPAR- α and Nrf2 Upregulation with Concomitant SREBP-1c and NF- κ B Downregulation. *Mol Nutr Food Res*. doi: 10.1002/mnfr.201700479

Herz J. (2001). The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain. *Neuron*. 29: 571–581.

Herz J., Chen Y., (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 7: 850–859.

Hirsch-Reinshagen V., Maia L.F., Burgess B.L., Blain J.F., Naus K.E., McIsaac S.A. y col. (2005). The absence of ABCA1 decreases soluble ApoE levels but does not diminish amyloid deposition in two murine models of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 280: 43243–43256.

Hjorth E., Zhu M., Toro V.C., Vedin I., Palmblad J., Cederholm T., Freund-Levi Y. y col. (2013). Omega-3 fatty acids enhance phagocytosis of Alzheimer's disease-related amyloid- β 42 by human microglia and decrease inflammatory markers. *J. Alzheimer's Dis*. 35: 697–713.

Hofman F.M., Hinton D.R., Johnson K., Merrill J.E. (1989). Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *The Journal of Experimental Medicine*. 170(2): 607–612.

Holler C.J., Webb R.L., Laux A.L., Beckett T.L., Niedowicz D.M., Ahmed R.R., Liu Y. y col. (2012). BACE2 expression increases in human neurodegenerative disease. *Am J Pathol*. 180(1): 337-50.

Holler C.J., Davis P.R., Beckett T.L., Platt T.L., Webb R.L., Head E., Murphy M.P. (2014). Bridging integrator 1 (BIN1) protein expression increases in the Alzheimer's disease brain and correlates with neurofibrillary tangle pathology. *J. Alzheimers Dis*. 42: 1221–1227.

Hollingworth P., Harold D., Sims R., Gerrish A., Lambert J.C., Carrasquillo, M.M., y col. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet*. 43: 429–435.

Hong-Qi Y., Zhi-Kun S., Sheng-Di C. (2012). Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting A β and tau. *Transl. Neurodegener*. 21: 1–12.

Hong S.H., Belayev L., Khoutorova L., Obenaus A., Bazan N.G. (2014). Docosahexaenoic acid confers enduring neuroprotection in experimental stroke. *J Neurol Sci*. 338:135-141.

Huang Y., Mucke L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*. 148: 1204–1222.

Hurt-Camejo E. (2017). Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their mechanisms of action on apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans: a review. *Lipids Health Dis*. 10;16(1):149.

Hsieh H.L., Yang C.M. (2013). Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *BioMed Research International*. 2013(Article ID 484613): 18.

Huang W.J., Zhang X., Chen W.W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep*. 4(5): 519-522.

Igarashi, M., Ma K., Gao F., Kim H. W., Rapoport S. I., and Rao J. S. (2011). Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex. *J Alzheimers. Dis* 24: 507-517.

Igbavboa U., Hamilton J., Kim H.Y., Sun G.Y., Wood W.G. (2002). A new role for apolipoprotein E: modulating transport of polyunsaturated phospholipid molecular species in synaptic plasma membranes, *J. Neurochem*. 80(2): 255–261.

Idel S., Ellinghaus P., Wolfrum C., Nofer. J.R., Gloerich J. y col. (2002). Branched chain fatty acids induce nitric oxide-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem*. 277: 49319–49325.

Irizarry M.C., Deng A., Lleo A., Berezovska O., Von Arnim C.A., Martin-Rehrmann M. y col. (2004). Apolipoprotein E modulates γ -secretase cleavage of the amyloid precursor protein. *J. Neurochem*. 90: 1132–1143.

Itoh T., DeCamilli P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta*. 1761: 897–912.

Jackson P.A., Deary M.E., Reay J.L., Scholey A.B., Kennedy D.O. (2012). No effect of 12 weeks' supplementation with 1 g DHA -rich or EPA-rich fish oil on cognitive function or mood in healthy young adults aged 18–35 years. *Br. J. Nutr*. 107: 1232–1243.

Jackson P.A., Reay J.L., Scholey A.B., Kennedy D.O. (2012). DHA-rich oil modulates the cerebral haemodynamic response to cognitive tasks in healthy young adults: A near ir spectroscopy pilot study. *Br. J. Nutr*. 107: 1093–1098.

Jacobson T.A., Glickstein S.B., Rowe J.D., Soni P.N. (2012). Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: A review. *Journal of Clinical Lipidology*. 6, 5–1

Jansen G.A., Wanders R.J.A., Watkins P.A., Mihalik S.J. (1997). Phytanoyl-coenzyme A hydroxylase deficiency the enzyme defect in Refsum's disease, *N. Engl. J. Med*. 337: 133–134.

- Janssen C.I., Kiliaan A.J. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Prog Lipid Res.* 53:1-17.
- Jansen D., Zerbi V., Janssen C.I., van Rooij D., Zinnhardt B., Dederen P.J., Wright A.J. y col. (2014). Impact of a multi-nutrient diet on cognition, brain metabolism, hemodynamics, and plasticity in apoE4 carrier and apoE knockout mice. *Brain Struct Funct.* 219(5): 1841-68.
- Janssen C.I., Jansen D., Mutsaers M.P., Dederen P.J., Geenen B., Mulder M.T., Kiliaan A.J. (2016). The Effect of a High-Fat Diet on Brain Plasticity, Inflammation and Cognition in Female ApoE4-Knockin and ApoE-Knockout Mice. *PLoS One.* 11(5): e0155307. doi: 10.1371/journal.pone.0155307.
- Jansen D., Zerbi V., Janssen C.I., van Rooij D., Zinnhardt B., Dederen P.J. y col. (2014). Impact of a multi-nutrient diet on cognition, brain metabolism, hemodynamics, and plasticity in apoE4 carrier and apoE knockout mice. *Brain Struct Funct.* 219(5): 1841-68.
- Jiang F., Gibson A.P., Dusting G.J. (2001). Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice. *Eur J Pharmacol.* 424(2): 141-9.
- Jiang F., Guo Y., Salvemini D., Dusting G.J. (2003). Superoxide dismutase mimetic M40403 improves endothelial function in apolipoprotein(E)-deficient mice. *Br J Pharmacol.* 139(6): 1127-34.
- Jiang Q., Lee C.Y., Mandrekar S., Wilkinson B., Cramer P., Zelcer N. y col. (2008). ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron.* 58: 681-693.
- Jiao J., Li Q., Chu J., Zeng W., Yang M., Zhu S. (2014). Effect of n-3 PUFA supplementation on cognitive function throughout the life span from infancy to old age: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 100: 1422-1436.
- Jin Y., Sui H.J., Dong Y., Ding Q., Qu W.H., Yu S.X., Jin Y.X. (2012). Atorvastatin enhances neurite outgrowth in cortical neurons in vitro via up-regulating the Akt/mTOR and Akt/GSK-3beta signaling pathways. *Acta Pharmacol. Sin.* 33: 861-872.
- Jones D.T., Graff-Radford J., Lowe V.J., Wiste H.J., Gunter J.L., Senjem M.L. y col (2017). Tau, amyloid, and cascading network failure across the Alzheimer's disease spectrum. *Cortex.* pii: S0010-9452(17)30324-6. doi: 10.1016/j.cortex.2017.09.018.
- Kalaria R.N. (2009). Neurodegenerative disease: diabetes, microvascular pathology and Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 5: 305-306.

Kanatsu K., Morohashi Y., Suzuki M., Kuroda H., Watanabe T., Tomita T., Iwatsubo T. (2014). Decreased CALM expression reduces A β 42 total A β ratio through clathrin-mediated endocytosis of γ -secretase. *Nat. Commun.* 5: 3386.

Kar S., Issa A.M., Seto D., Auld D.S., Collier B., Quirion R. (1998). Amyloid β -peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 70: 2179–2187.

Karasinska J.M., de Haan W., Franciosi S., Ruddle P., Fan J., Kruit J.K., Stukas S. y col. (2013). ABCA1 influences neuroinflammation and neuronal death. *Neurobiol Dis.* 54: 445–55.

Karch C.M., Goate A.M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry.* 77: 43–51.

Kaur G., Molero J.C., Weisinger H.S., Sinclair A.J. (2013). Orally administered [14C]DPA and [14C]DHA are metabolized differently to [14C]EPA in rats. *Br. J. Nutr.* 109: 441–448.

Kiecolt-Glaser J.K., Belury M.A., Andridge R., Malarkey W.B., Glaser R. (2011). Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: A randomized controlled trial. *Brain Behav. Immun.* 25: 1725–1734.

Khan S.S., Bloom G.S. (2016). Tau: The Center of a Signaling Nexus in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 10: 31.

Kim J., Basak J.M., Holtzman D.M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron.* 63(3): 287–303.

Kim B., Backus C., Oh S., Hayes J.M., Feldman E.L. (2009). Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology.* 150: 5294–5301.

Kim W.S., Li H., Ruberu K., Chan S., Elliott D.A. (2013). Low J.K. Cheng D. Karl T. Garner B. Deletion of Abca7 increases cerebral amyloid- β accumulation in the J20 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 33: 4387–4394.

Kim J., Han J.W., So Y.S., Seo J.Y., Kim K.Y., Kim K.W. (2014). Prevalence and trends of dementia in Korea: a systematic review and meta-analysis. *J Korean Med Sci.* 29: 903–12.

Kitareewan S., Burkha L.T., Tomer K.B., Parker C.E., Deterding L.J., Stevens B.M., Forman D.E. y col. (1996). Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Mol. Biol. Cell.* 7: 1153–1166.

Kitajka K., Sinclair A.J., Weisinger R.S., Weisinger H.S., Mathai M., Jayasooriya A.P., Halver J.E., Puskas L.G. (2004). Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 10931–10936.

- Klementieva O., Willén K., Martinsson I., Israelsson B., Engdahl A., Cladera J. y col. (2017). Pre-plaque conformational changes in Alzheimer's disease-linked A β and APP. *Nature communications*. 13;8:14726.
- Kobayashi M., Yamamoto M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7(3-4): 385–394.
- Komen J.C., Distelmaier F., Koopman W.J., Wanders R.J.A., Smeitink J., Willems P.H. (2007). Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. *Cell. Mol. Life Sci*. 64: 3271–3281.
- Koo E.H., Lansbury P.T., Kelly J.W. (1999). Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 9989-9990.
- Kopf D., Frölich L. (2009). Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials. *J. Alzheimers Dis*. 16: 677–685.
- Kopke E., Tung Y.C., Shaikh S., Alonso A.C., Iqbal K., Grundke-Iqbal I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem*. 268: 24374–24384.
- Krimbou L., Denis M., Haidar B., Carrier M., Marcil M., Genest J. Jr. (2004). Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation. *J Lipid Res*. 45: 839–848.
- Kuratko C.N., Barrett E.C., Nelson E.B., Salem N. (2013). The relationship of docosahexaenoic acid (DHA) with learning and behavior in healthy children: A review. *Nutrients*. 5: 2777–2810.
- Kuret J., Congdon E.E., Li G., Yin H., Yu X., Zhong Q. (2005). Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microsc. Res. Tech*. 67: 141–155.
- Kuszczyk M.A., Sanchez S., Pankiewicz J., Kim J., Duszczuk M., Guridi M. Y col. (2013). Blocking the interaction between apolipoprotein E and A β reduces intraneuronal accumulation of A β and inhibits synaptic degeneration. *Am J Pathol*. 182(5): 1750-68.
- LaDu M.J., Falduto M.T., Manelli A.M., Reardon C.A., Getz G.S., Frail D.E. (1994). Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem*. 269: 23403–6.
- LaDu M.J., Pederson T.M., Frail D.E., Reardon C.A., Getz G.S., Falduto M.T. (1995). Purification of Apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. *J Biol Chem*. 270: 9039–42.
- Lambert MA., Bickel H., Prince M., y col. (2014). Estimating the burden of early onset dementia; systematic review of disease prevalence. *Eur J Neurol*. 21: 563–69.

Lane-Donovan C., Wong W.M., Durakoglugil M.S., Wasser C.R., Jiang S., Xian X., Herz J. (2016). Genetic Restoration of Plasma ApoE Improves Cognition and Partially Restores Synaptic Defects in ApoE-Deficient Mice. *J Neurosci.* 36(39): 10141-50.

Lang U.E., Jockers-Scherubl M.C., Hellweg R. (2004). State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: implications and limitations. *J. Neural Transm.* 111: 387–411.

Langemann H., Kabiersch A., Newcombe J. (1992). Measurement of low-molecular weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis. *European Neurology.* 32(5): 248–252.

Larson E.B., Yaff E. K., Langa K.M. (2013). New insights into the dementia epidemic. *N Engl J Med.* 369: 2275–77.

Laufs U., Wassmann S., Czech T., Münzel T., Eisenhauer M., Böhm M., Nickenig G. (2005). Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(4): 809-14.

Lehner C., Gehwolf R., Tempfer H., Krizbai I., Hennig B., Bauer H.C., Bauer H. (2011). Oxidative stress and blood-brain barrier dysfunction under particular consideration of matrix metalloproteinases. *Antioxid Redox Signal.* 15(5): 1305-23.

Liu Y., Liu F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Gong C.X. (2009). Brain glucose transporters, O-Glc N Acylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 111: 242–249.

Leckie R.L., Manuck S.B., Bhattacharjee N., Muldoon M.F., Flory J.M., Erickson K.I. (2014). Omega-3 fatty acids moderate effects of physical activity on cognitive function. *Neuropsychologia.* 59: 103–111.

Lee C.H., Hajra A.K. (1991). Molecular species of diacyl glycerols and phosphoglycerides and the post mortem changes in the molecular species of diacylglycerols in rat brains. *J. Neurochem.* 56: 370–379.

Lee K.S., Chung J.H., Choi T.K., Suh S.Y., Oh B.H., Hong C.H. (2009). Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 28: 281–287.

Lee J.H., Oh I.H., Lim H.K. (2016). Stem Cell Therapy: A Prospective Treatment for Alzheimer's Disease. *Psychiatry Investig.* 13(6): 583-589.

Leiper J., Nandi M. (2011). The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nature Reviews Drug Discovery.* 10(4): 277–291.

Lemotte P.K., Keidel S., Apfel C.M. (1996). Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand, *Eur. J. Biochem.* 236: 328–333.

Leoni V., Caccia C. (2015). The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1851: 1095–1105.

Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C.E. y col. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 269:973–977

Leung C., Jia Z. (2016). Mouse Genetic Models of Human Brain Disorders. *Front Genet.* 7:40.

Lin M.T., Beal M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443(7113): 787–795.

Lin Y.H., Llanos A., Mena P., Uauy R., Salem N., Pawlosky R.J. (2010). Compartmental analyses of 2H5-alpha-linolenic acid and CU-eicosapentaenoic acid toward synthesis of plasma labeled 22:6n-3 in newborn term infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 92: 284–293.

Ling, Y., Morgan K., Kalsheker N. (2003). Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35: 1505–1535.

Linseisen F., Lloyd-Smith J., Parkington J. (1999). Evidence for the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the modern hominid brain. *Lipids.* 34: S39–S47.

Liu L., Zhang K., Sandoval H., Yamamoto S., Jaiswal M., Sanz E., Li Z., Hui J. y col. (2015). Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell.* 160:177–190.

Lomnitski L., Kohen R., Chen Y., Shohami E., Trembovler V., Vogel T.M., Michaelson D.M. (1997). Reduced levels of antioxidants in brains of apolipoprotein E-deficient mice following closed head injury. *Pharmacol Biochem Behav.* 56(4): 669-73.

Lovell M.A., Ehmann W.D., Butler S.M., Markesbery W.R. (2004). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 111(9):1167-82. Epub 2004 May 14.

Lu F., Li X., Suo A.Q., Zhang J.W. (2010). Inhibition of tau hyperphosphorylation and β amyloid production in rat brain by oral administration of atorvastatin. *Chin. Med. J.* 123: 1864–1870.

Lue L.F., Kuo Y.M., Roher A.E., Brachova L., Shen Y., Sue L., Beach T. y col. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 155(3): 853–862.

Lugrin J., Rosenblatt-Velin N., Parapanov R., Liaudet L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological Chemistry.* 395(2): 203–230.

- Lynch J.R., Tang W., Wang H., Vitek M.P., Bennett E.R., Sullivan P.M. y col. (2003). APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic a central nervous system inflammatory response. *J. Biol. Chem.* 278: 48429–48433.
- Macauley S.L., Stanley M., Caesar E.E., Yamada S.A., Raichle M.E., Perez R., Mahan T.E. y col. (2015). Hyperglycemia modulates extracellular amyloid- β concentrations and neuronal activity in vivo. *J. Clin. Invest.* 125: 2463–2467.
- Maccioni R.B., Farías G., Morales I., Navarrete L. (2010). The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res.* 41: 226–231.
- Maher P.A., Schubert D.R. (2009). Metabolic links between diabetes and Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.* 9: 617–630.
- Mahley R.W., Weisgraber K.H., Huang Y. (2009). Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res.* 50 (Suppl): S183–S188.
- Mahley R.W., Huang Y. (2012). Apolipoprotein E sets the stage: response to injury triggers neuropathology. *Neuron.* 76: 871–85.
- Marquer C., Laine J., Dauphinot L., Hanbouch L., Lemerrier-Neuillet C., Pierrot N., y col. (2014). Increasing membrane cholesterol of neurons in culture recapitulates Alzheimer's disease early phenotypes. *Mol. Neurodegener.* 9: 60.
- Martín V., Fabelo N., Santpere G., Puig B., Marín R., Ferrer I., Díaz M. (2010). Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J. Alzheimer's Dis.* 19: 489–502.
- Masliah E., Mallory M., Ge N., Alford M., Veinbergs I., Roses A.D. (1995). Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp. Neurol.* 136: 107–122.
- Masliah E., Crews L., Hansen L. (2006). Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 9: 91–99.
- Marotolli F.M., Katsumata Y., Koster K.P., Thomas R., Fardo D.W., Tai L.M. (2017). Peripheral Inflammation, Apolipoprotein E4, and Amyloid- β Interact to Induce Cognitive and Cerebrovascular Dysfunction. *ASN Neuro.* 9: 4
- Matsuzaki T., Sasaki K., Tanizaki Y., Hata J., Fujimi K., Matsui Y. y col. (2010). Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology.* 75: 764–770.
- Matsuzawa A., Ichijo H. (2005). Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxidants and Redox Signaling.* 7(3-4): 472–481.
- Mazanetz M.P., Fischer P.M. (2007). Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 464–479.

McNamara R.K. (2010). DHA deficiency and prefrontal cortex neuropathology in recurrent affective disorders. *J Nutr.* 140:864-868.

McNamara R.K., Liu Y., Jandacek R., Rider T., Tso P. (2008). The aging human orbitofrontal cortex: Decreasing polyunsaturated fatty acid composition and associated increases in lipogenic gene expression and stearoyl-CoA desaturase activity. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 78: 293-304.

Medhi B., Chakrabarty M. (2013). Insulin resistance: An emerging link in Alzheimer's disease. *Neurol. Sci.* 34: 1719-1725.

Mei Y., Zhang Y., Yamamoto K., Xie W., Mak T.W., You H. (2009). FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. *Proc Natl Acad Sci.* 106(13):5153-8. doi: 10.1073/pnas.0901104106

Meyrelles S., Peotta V.A., Pereira T., Vasquez E. (2011). Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse. Insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Diseases.* 10: 211.

Mohajeri M.H., Troesch B., Weber P. (2015). Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: Implications for brain aging and Alzheimer-type dementia. *Nutrition.* 31: 261-275.

Montine T.J., Montine K.S., Olson S.J., Graham D.G., Roberts L.J., Morrow J.D., Linton M.F. y col. (1999). Increased cerebral cortical lipid peroxidation and abnormal phospholipids in aged homozygous apoE-deficient C57BL/6J mice. *Exp. Neurol.* 158: 234-241.

Morató L., Bertini E., Verrigni D., Ardisson A., Ruiz M., Ferrer I., Uziel G., Pujol A. (2014). Mitochondrial dysfunction in central nervous system white matter disorders. *Glia.* 62(11): 1878-1884.

Moreira P.I., Honda K., Liu Q., Aliev G., Oliveira C.R., Santos M.S., Zhu X., Smith M.A., Perry G. (2005). Alzheimer's disease and oxidative stress: The old problem remains unsolved. *Curr Med Chem Cent Nerv Syst Agents.* 5: 51-62.

Morgan M.J., Liu Z.G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research.* 21(1): 103-115.

Moriguchi T., Greiner R.S., Salem N. Jr. (2000). Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J. Neurochem.* 75: 2563-2573.

Mozaffarian D., Wu J.H. (2012). (n-3) fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *J Nutr.* 142(3):614S-625S.

Mukherjee P.K., Chawla A., Loayza M.S., Bazan N.G. (2007). Docosanoids are multifunctional regulators of neural cell integrity and fate: significance in aging and disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 77(5-6):233-8.

Murata H., Takamatsu H., Liu S., Kataoka K., Huh NH., Sakaguchi M. (2015). NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions. *PLoS One*. 10(11): e0142438. doi: 10.1371

Murer M.G., Yan Q., Raisman-Vozari R. (2001). Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 63: 71–124.

Nagai K. (1995). Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation and mitochondrial dysfunction. *Neurology*. 45(8):1594-601.

Nagai K. (2015). Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation and mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicol Teratol.* 48:33-9. doi: 10.1016/j.ntt.2015.01.006.

Nakashima Y., Plump A.S., Raines E.W., Breslow J.L., Ross R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 14(1): 133-40.

Nathan B.P., Bellosta S., Sanan D.A., Weisgraber K.H., Mahley R.W., Pitas R.E. (1994). Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*. 264: 850–2.

Nilsson L., Nordberg A., Hardy J., Wester P., Winblad B. (1986). Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level. *J. Neural Transm.* 67: 275–285.

Niranjan R. (2014). The Role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of parkinson's disease: focus on astrocytes. *Molecular Neurobiology*. 49(1): 28–38.

Nordberg A., Alafuzoff I., Winblad B. (1992). Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia. *J. Neurosci. Res.* 31: 103–111.

Norris S.E., Friedrich M.G., Mitchell T.W., Truscott R.J., Else P.L. (2015). Human prefrontal cortex phospholipids containing docosahexaenoic acid increase during normal adult aging, where as those containing arachidonic acid decrease. *Neurobiol. Aging*. 36: 1659–1669.

Norton S., Matthews F.E., Barnes D.E., Yaff E.K., Brayne C. (2014). Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol.* 13: 788–94.

Noubade R., Wong K., Ota N., Rutz S., Eidenschenk C., Valdez P.A. y col. (2014). NRROS negatively regulates reactive oxygen species during host defence and autoimmunity. *Nature*. 509(7499): 235–239.

Novak E.M., Dyer R.A., Innis S.M. (2008). High dietary omega-6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth. *Brain Res.* 1237: 136–145.

Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj E.K., Jones P.K. y col. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease,” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 60(8): 759–767.

Okun E., Mattson MP., Arumugam T.V. (2010). Involvement of Fc receptors in disorders of the central nervous system. *Neuromolecular Med.* 12(2): 164–178.

Olgiate P., Politis A.M., Papadimitriou G.N., DeRonchi D., Serretti A. (2011). Genetics of late-onset Alzheimer’s disease: update from the alzgene database and analysis of shared pathways. *Int. J. Alzheimer Dis.* 2011: 832379.

Orr S.K., Trepanier M.O., Bazinet R.P. (2013). n-3 polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 88: 97–103.

Oster T., Pillot T. (2010). Docosahexaenoic acid and synaptic protection in Alzheimer's disease mice. *Biochim Biophys Acta.* 1801:791-798.

Ouellet M., Emond V., Chen C.T., Julien C., Bourasset F., Oddo S., LaFerla F. y col. (2009). Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: an in situ cerebral perfusion study. *Neurochem. Int.* 55: 476–482.

Ouguerram K., Maugeais C., Gardette J., Magot T., Krempf M. (2006). Effect of n-3 fatty acids on metabolism of apoB100-containing lipoprotein in type 2 diabetic subjects. *Br J Nutr.* 96:100–6.

Ozsoy O., Tanriover G., Derin N., Uysal N., Demir N., y col. (2011). The effect of docosahexaenoic Acid on visual evoked potentials in a mouse model of Parkinson's disease: the role of cyclooxygenase-2 and nuclear factor kappa-B. *Neurotox Res.* 20:250-262.

Pan Y., Scanlon M.J., Owada Y., Yamamoto Y., Porter C.J.H., Nicolazzo J.A. (2015). Fatty acid-binding protein 5 facilitates the blood-brain barrier transport of docosahexaenoic acid. *Mol. Pharm.* 12: 4375–4385.

Perl D.P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J. Med.* 77: 32–42.

Peters A. (1996). Age-related changes in oligodendrocytes in monkey cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 371: 153–163.

Pifferi F., Jouin M., Alessandri J.M., Roux F., Perriere, N., Langelier B., Lavialle M., Cunnane S., Guesnet P. (2010). n-3 long-chain fatty acids and regulation of glucose

transport in two models of rat brain endothelial cells. *Neurochem. Int.* 56: 703–710.

Ploia C., Antoniou X., Sclip A., Grande V., Cardinetti D., Colombo A., Canu N. y col. (2011). JNK plays a key role in tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease models. *Journal of Alzheimer's Disease.* 26(2): 315–329.

Plourde M., Chouinard-Watkins R., Vandal M., Zhang Y., Lawrence P., Brenna J.T., Cunnane S.C. (2011). Plasma incorporation, apparent retroconversion and beta-oxidation of 13c-docosahexaenoic acid in the elderly. *Nutr. Metab.* 8: 5-10.

Plump A.S., Smith J.D., Hayek T., Aalto-Setälä K., Walsh A., Verstuyft J.G., Rubin E.M., Breslow J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 71(2): 343-53.

Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W., Ferri CP. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement.* 9: 63–75.

Pusceddu M.M., Kelly P., Stanton C., Cryan J.F., Dinan T.G. (2106). N-3 Polyunsaturated Fatty Acids through the Lifespan: Implication for Psychopathology. *Int J Neuropsychopharmacol.* 00: 1-23.

Qin B., Cartier L., Dubois-Dauphin M., Li B. Serrander L., KrauseK.H. (2006). A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. *Neurobiology of Aging.* 27(11): 1577–1587.

Qiu Z., Crutcher K.A., Hyman B.T., Rebeck G.W. (2003). ApoE isoforms affect neuronal N-methyl-D-aspartate calcium responses and toxicity via receptor-mediated processes. *Neuroscience.* 122: 291–303.

Qu Z., Jiao Z., Sun X., Zhao Y., Ren J., Xu G. (2011). Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. *Brain Res.* 1383: 300–306.

Querfurth H.W., LaFerla F.M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine.* 362(4): 329–344.

Rahman A., Akterin S., Flores-Morales A., Crisby M., Kivipelto M., Schultzberg M. Cedazo-Mínguez A. (2005). High cholesterol diet induces tau hyperphosphorylation in apolipoprotein E deficient mice. *FEBS Lett.* 579(28): 6411-6.

Rahman S.M., Van Dam A.M., Schultzberg M., Crisby M. (2005). High cholesterol diet results in increased expression of interleukin-6 and caspase-1 in the brain of apolipoprotein E knockout and wild type mice. *J. Neuroimmunol.* 169: 59–67.

Raji C.A., Erickson K.I., Lopez O.L., Kuller L.H., Gach H.M., Thompson P.M., Riverol M., Becker J.T. (2014). Regular fish consumption and age-related brain gray matter loss. *Am. J. Prev. Med.* 47: 444–451.

Raman K.G., Gandley R.E., Rohland J., Zenati M.S., Tzeng E. (2011). Early hypercholesterolemia contributes to vasomotor dysfunction and injury associated atherogenesis that can be inhibited by nitric oxide. *J Vasc Surg.* 53(3): 754-63.

Ransohoff R.M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science.* 353(6301):777-83.

Rathod R.S., Khaire A.A., Kale A.A., Joshi S.R. (2015). Beneficial effects of omega-3 fatty acids and vitamin B12 supplementation on brain docosahexaenoic acid, brain derived neurotrophic factor, and cognitive performance in the second-generation Wistar rats. *Biofactors.* 41(4):261-72.

Reddy J.K., Hashimoto T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: An adaptive metabolic system. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 193–230.

Reddy P.H., Tripathi R., Troung Q., Tirumala K., Reddy T.P., Anekonda V. y col. (2012). Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. *Biochim Biophys Acta.* 1822(5): 639-49.

Reed B., Villeneuve S., Mack W., DeCarli C., Chui H.C., Jagust W. (2014). Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis. *JAMA Neurol.* 71: 195–200.

Rogers P.J., Appleton K.M., Kessler D., Peters T.J., Gunnell D., Hayward R.C., Heatherley S.V. y col. (2008). No effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) supplementation on depressed mood and cognitive function: A randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* 99: 421–431.

Roher A.E., Debbins J.P., Malek-Ahmadi M., Chen K., Pipe J.G., Maze S., Belden C., Maarouf C.L., Thiyyagura P., Mo H. (2012). Cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Vasc. Health Risk Manag.* 8: 599–611.

Romano A., Serviddio G., Calcagnini S., Villani R., Giudetti A.M., Cassano T., Gaetani S. (2017). Linking lipid peroxidation and neuropsychiatric disorders: focus on 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med.* S0891-5849(16): 31147-9.

Röncke S., Kruska N., Kahlert S., Reiser G. (2009). The influence of the branched-chain fatty acids pristanic acid and Refsum disease-associated phytanic acid on mitochondrial functions and calcium regulation of hippocampal neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Neurobiol Dis.* 36: 401-410.

Roy S., Zhang B., Lee V.M., Trojanowski J.Q. (2005). Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 109: 5–13.

Rylett R.J., Ball M.J., Colhoun E.H. (1983). Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res.* 289: 169–175.

Rylett R.J., Williams L.R. (1994). Role of neurotrophins in cholinergic-neuron function in the adult and aged CNS. *Trends Neurosci.* 17: 486–490.

Saher G., Stumpf S.K. (2015). Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochim.Biophys.Acta.* 1851: 1083–1094.

Salem N., Eggersdorfer M. (2015). Is the world supply of omega-3 fatty acids adequate for optimal human nutrition? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 18: 147–154.

Salem N., Vandal M., Calon F. (2015). The benefit of docosahexaenoic acid for the adult brain in aging and dementia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 92: 15–22.

Salminen A., Ojala J., Suuronen T., Kaarniranta K., Kauppinen A. (2008). Amyloid-beta oligomers set fire to inflammasomes and induce Alzheimer's pathology. *J. Cell. Mol. Med.* 12: 2255–2262.

Sajan M.P., Hansen B.C., Higgs M.G., Kahn C.R., Braun U., Leitges M. y col. (2017). Atypical PKC, PKC λ/ι , activates β -secretase and increases A β 1-40/42 and phospho-tau in mouse brain and isolated neuronal cells, and may link hyperinsulinemia and other aPKC activators to development of pathological and memory abnormalities in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 61: 225-237.

Sato N., Morishita R. (2015). The roles of lipid and glucose metabolism in modulation of β -amyloid, tau, and neurodegeneration in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Front. Aging Neurosci.* 7:199.

Scheltens P., Blennow K., Breteler M.M., de Strooper B., Frisoni G.B., Salloway S., Van der Flier W.M. (2016). Alzheimer's disease. *Lancet.* 388(10043):505-17.

Schindowski K., Belarbi K., Buee L. (2008). Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav.* 7: 43–56.

Schrijvers E.M., Verhaaren B.F., Koudstaal P.J., Hofman A., Ikram M.A., Breteler M.M. (2012). Is dementia incidence declining? Trends in dementia incidence since 1990 in the Rotterdam Study. *Neurology.* 78: 1456–63.

Schönfeld P., Wojtczak L. (2007). Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochim Biophys Acta.* 1767: 1032–40.

Schönfeld P.,(1997). Bohnensack R. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Lett,* 420: 167-170.

Schönfeld P., Kahlert S., Reiser G. (2006). A study of the cytotoxicity of branched-chain phytanic acid with mitochondria and rat brain astrocytes. *Exp Gerontol.* 41: 688-696.

Schonfeld P., Kahlert S., Reiser G. (2004). In brain mitochondria the branched-chain fatty acid phytanic acid impairs energy transduction and sensitizes for permeability transition. *Biochem. J.* 383: 121–128.

Schönfeld P., Reiser G. (2016). Brain Lipotoxicity of Phytanic Acid and Very Long-chain Fatty Acids. Harmful Cellular/Mitochondrial Activities in Refsum Disease and X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Aging Dis.* 7(2): 136-49.

Schönfeld P., Reiser G. (2006). Rotenone-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *J Biol Che.* 281: 7136-7142.

Schönfeld P., Struy H. (1999). Refsum disease diagnostic marker phytanic acid alters the physical state of membrane proteins of liver mitochondria, *FEBS Lett.* 457: 179–183.

Schuessel K., Leutner S., Cairns N.J., Müller W.E., Eckert A. (2017). Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging.* pii: S0197-4580(17)30294-4. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.001.

Seeley W.W., Mille B.L. Demencia. En: Harrison. Principios de Medicina Interna. 18e. eds. D.L. Longo, D.L. Kasper, J. L. Jameson, A.S. Fauci, S. L. Hauser, J. Loscalzo. Cap. 371. Ed: Mc Graw Hill Medical. 2012.

Selkoe D.J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature.* 399: A23–A31.

Selkoe D.J., Schenk D. (2003). Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 545–584.

Serhan C.N., Dalli J., Colas R.A., Winkler J.W., Chiang N. (2015). Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochim. Biophys. Acta.* 1851: 397–413.

Setälä K., Walsh A., Verstuyft J.G., Rubin E.M., Breslow J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 71(2): 343-53.

Shea T.B., Rogers E., Ashline D., Ortiz D., Sheu M.S. (2002). Apolipoprotein E deficiency promotes increased oxidative stress and compensatory increases in antioxidants in brain tissue. *Free Radic Biol Med.* 33(8): 1115-20.

Shen J., Kelleher R.J. (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 403–409.

Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva EA., Levesque G., Ikeda M., y col. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 375(6534): 754-60.

Shibuya Y., Niu Z., Bryleva E.Y., Harris B.T., Murphy S.R., Kheirollah A. y col. (2015). Acyl-coenzymeA: cholesterol acyl transferase 1 blockage enhances autophagy in the neurons of triple transgenic Alzheimer's disease mouse and reduces human P301L-tau content at the presymptomatic stage. *Neurobiol. Aging*. 36: 2248-2259.

Shobab L.A., Hsiung G.Y., Feldman H.H. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 4: 841-52.

Sierra A., Abiega O., Shahraz A., Neumann H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci*. 7:6.

Simons M., Keller P., De Strooper B., Beyreuther K., Dotti C.G., Simons K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci*. 95(11): 6460-4.

Simopoulos A.P. (2011). Evolutionary aspects of diet: The omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol. Neurobiol*. 44: 203-215.

Sims N.R., Bowen D.M., Allen S.J., Smith C.C., Neary D., Thomas D.J., Davison A.N. (1983). Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. *J. Neurochem*. 40: 503-509.

Smith M.A., Harris P.L., Sayre L.M., Perry G. (1997). Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox generated free radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(18): 9866-9868.

Smith D.D., Tan X., Tawfik O., Milne G., Stechschulte D.J., Dileepan K.N. (2010). Increased aortic atherosclerotic plaque development in female apolipoprotein E-null mice is associated with elevated thromboxane A2 and decreased prostacyclin production. *J Physiol Pharmacol*. 61(3): 309-16.

Sofroniew M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*. 32(12): 638-647.

Sperling R.A., Aisen P.S., Beckett L.A., Bennett D.A., Craft S., Fagan A.M., Iwatsubo T. y col. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement J Alzheimer's Assoc*. 7(3):280-292

Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 258 (5090): 1898-1902.

Starks E.J., O'Grady J.P., Hoscheidt S.M., Racine A.M., Carlsson C.M., Zetterberg H. y col. (2015). Insulin resistance is associated with higher cerebrospinal fluid tau levels in asymptomatic APOE4 carriers. *J. Alzheimers Dis.* 46: 525–533.

Steer E.K., Dail M.K., Chu C.T. (2015). Beyond mitophagy: cytosolic PINK1 as a messenger of mitochondrial health. *Antioxid Redox Signal.* 20;22(12):1047-59. doi: 10.1089/ars.2014.6206.

Steinberg D., Refsum Disease. En: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, vol. II, McGraw-Hill, New York, 1995; 2351–2369.

Steinberg D., Avigan J., Mize C., Baxter J.H., Cammermeyer J., Fales H.M., Hight P.F. (1966). Effects of dietary phytol and phytanic acid in animals. *J Lipid Res* 7: 684–691

Steinberg S.J., Wang S.J., Kim D.G., Mihalik S.J., Watkins P.A. (1999). Human very-longchain acyl-CoA synthetase: cloning, topography, and relevance to branched-chain fatty acid metabolism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 615–621.

Stillwell W., Shaikh S.R., Zerouga M., Siddiqui R., Wassall S.R. (2005). Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 559–579.

Stockley J.H., O'Neill C. (2007). The proteins BACE1 and BACE2 and beta-secretase activity in normal and Alzheimer's disease brain. *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 3): 574-6.

Stonehouse W. (2014). Does consumption of LC omega-3 PUFA enhance cognitive performance in healthy school-aged children and throughout adulthood? Evidence from clinical trials. *Nutrients.* 6: 2730–2758.

Stonehouse W., Conlon C.A., Podd J., Hill S.R., Minihane A.M., Haskell C., Kennedy D. (2013). DHA supplementation improved both memory and reaction time in healthy young adults: A randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 94: 1134–1143.

Svendsen C.N., Cooper J.D., Sofroniew M.V. (1991). Trophic factor effects on septal cholinergic neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 640: 91–94.

Tamagno E., Parola M., Bardini P., Piccini A., Borghi R., Guglielmotto M., Santoro G. y col. (2005). β -site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *Journal of Neurochemistry.* 92(3): 628–636.

Tamamizu-Kato S., Cohen J.K., Drake C.B., Kosaraju M.G., Drury J., Narayanaswami V. (2008). Interaction with amyloid beta peptide compromises the lipid binding function of apolipoprotein E. *Biochemistry.* 47: 5225–34.

- Tanaka N., Abe-Dohmae S., Iwamoto N., Yokoyama S. (2011). Roles of ATP-binding cassette transporter A7 in cholesterol homeostasis and host defense system. *J. Atheroscler. Thromb.* 18: 274–281.
- Tang C., Liu Y., Kessler P.S., Vaughan A.M., Oram J.F. (2009). The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *J. Biol. Chem.* 284: 32336–32343.
- Tanzi R.E. (2012) The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(10).
- Tian Q. (2002). Wang J. Role of serine/threonine protein phosphatase in Alzheimer's disease. *Neurosignals.* 11: 262–269.
- Thompson P.M., Hayashi K.M., de Zubicaray G., Janke A.L., Rose S.E., Semple J., Herman D. y col.(2003). Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 23(3): 994-1005.
- Trachootham D., Lu W., Ogasawara M.A., Valle N., Huang P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling.* vol. 10, no. 8, pp. 1343–1374.
- Tsaluchidu S., Cocchi M., Tonello L., Puri B.K. (2008). Fatty acids and oxidative stress in psychiatric disorders. *BMC Psychiatry.* 8 (1): S5.
- Turrens J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552: 335-344.
- Umhau J.C., Zhou,W., Carson R.E., Rapoport S.I., Polozova A., Demar J., Hussein N. y col. (2009). Imaging incorporation of circulating docosahexaenoic acid into the human brain using positron emission tomography. *J. Lipid Res.* 50: 1259–1268.
- Utermann G., M. Hees, and A. Steinmetz. (1997). Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature.* 269: 604–607.
- Van den Brink D.M., Wanders R.J. (2006). Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. *Cell Mol Life Sci.* 63(15):1752-65
- Van Noort J.M., Bsibsi M. (2009). Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair. *Progress in Brain Research.* 175: 139–148.
- Van Veldhoven PP. (2010). Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *J Lipid Res.* 51: 2863–95.
- Vandal M., Alata W., Tremblay C., Rioux-Perreault C., Salem N., Calon F., Plourde M. (2014). Reduction in DHA transport to the brain of mice expressing human APOE4 compared to APOE 2. *J. Neurochem.* 129: 516–526.

Velayudhan L., Poppe M., Archer N., Proitsi P., Brown R.G. (2010). Lovestone S. Risk of developing dementia in people with diabetes and mild cognitive impairment. *Br. J. Psychiatry.* 196: 36–40.

Verghese P.B., Castellano J.M., Holtzman D.M. (2011). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* 10: 241–252.

Verhoeven N.M., Wanders R.J., Poll-The B.T., Saudubray J.M., and Jakobs C. (1998). The metabolism of phytanic acid and pristanic acid in man: a review. *J Inherit Metab Dis* 21: 697–728.

Vermeer S.E., Prins N.D., den Heijer T., Hofman A., Koudstaal P.J., Breteler M.M. (2003). Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N. Engl. J. Med.* 348: 1215–1222.

Vida C., Gonzalez E.M., de la Fuente M. (2014). Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr. Pharm. Des.* 20: 4656–4678.

Villeneuve N., Fortuno A., Sauvage M., Fournier N., Breugnot C., Jacquemin C., Petit C., Gosgnach W. y col. (2003). Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res.* 40(2): 87-96.

Virtanen J.K., Siscovick D.S., Lemaitre R.N., Longstreth W.T., Spiegelman D., Rimm E.B., King I.B., Mozaffarian D. (2013). Circulating omega-3 polyunsaturated fatty acids and subclinical brain abnormalities on MRI in older adults: The Cardiovascular Health Study. *J. Am. Heart Assoc.* 2(5): e000305-2.

Wahrle S.E., Jiang H., Parsadanian M., Hartman R.E., (2005). Bales K.R. Paul S.M. Holtzman D.M. Deletion of *Abca1* increases *A*beta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 280: 43236–43242.

Wahrle S.E., Shah A.R., Fagan A.M., Smemo S., Kauwe J.S., Grupe A., Hinrichs A., Mayo K. y col. (2007). Apolipoprotein E levels in cerebrospinal fluid and the effects of ABCA1 polymorphisms. *Mol Neurodegener.* 2: 7.

Wahrle S.E., Jiang H., Parsadanian M., Kim J., Li A., Knoten A., Jain S. Hirsch-Reinshagen V. y col. (2008). Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 118: 671–682.

Walsh K.P., Minamide L.S., Kane S.J., Shaw A.E., Brown D.R., Pulford B., Zabel M.D., Lambeth J.D., Kuhn T.B., Bamberg J.R. (2014). Amyloid-beta and proinflammatory cytokines utilize a prion protein-dependent pathway to activate NADPH oxidase and induce cofilin-actin rods in hippocampal neurons. *PLoS One.* 9:e95995.

Wanders R.J., Ferdinandusse S., Brites P., Kemp S. (2010). Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 1801(3): 272-80.

Wanders R.J., Jansen G.A., Skjeldal O.H. (2001). Refsum disease, peroxisomes and phytanic acid oxidation: a review. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60: 1021–31.

Wanders R.J., Komen J., Ferdinandusse S. (2011). Phytanic acid metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1811(9): 498-507.

Wang X., Hjorth E., Vedin I., Eriksdotter M., Freund-Levi Y., Wahlund L.O. y col. (2015). Effects of n-3 FA supplementation on the release of proresolving lipid mediators by blood mononuclear cells: The OmegAD study. *J. Lipid Res.* 56: 674–681.

Wang Y., Cella M., Mallinson K., Ulrich J.D., Young K.L., Robinette M.L. y col. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell.* 160: 1061–1071.

Wang Z.Y., Miki T., Ding Y., Wang S.J., Gao Y.H., Wang X.L. y col. (2011). A high cholesterol diet given to apolipoprotein E-knockout mice has a differential effect on the various neurotrophin systems in the hippocampus. *Metab Brain Dis.* 26(3): 185-94.

Wassmann S., Czech T., Van Eickels M., Fleming I., Böhm M., Nickenig G. (2004). Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation.* 110(19): 3062-7.

Weidemann A., Eggert S., Reinhard F.B., Vogel M., Paliga K., Baier G. y col. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry.* 41: 2825–2835.

Weiser M.J., Butt C.M., Mohajeri M.H. (2016). Docosahexaenoic Acid and Cognition throughout the Lifespan. *Nutrients.* 8(2): 99-139.

Wierzbicki AS. (2004). Clinical significance of oxidation from phytol to phytanic acid in man. *Mol Genet Metab.* 83:347.

Wierzbicki AS. (2007). Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review. *Biochem Soc Trans.* 35: 881–6.

Wilcock G.K., Esiri M.M., Bowen D.M., Smith C.C. (1982). Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *J. Neurol. Sci.* 57: 407–417.

Wisdom N.M., Callahan J.L., Hawkins K.A. (2011). The effects of Apolipoprotein E on non-impaired cognitive functioning: a meta-analysis. *Neurobiol.Aging.* 32: 63–74.

Wisniewski T., Golabek A., Matsubara E., Ghiso J., Frangione B. (1993). Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid. *Biochemical and biophysical research communications*. 192: 359–65.

Wong P.C., Zheng H., Chen H., Becher M.W., Sirinathsinghji D.J., Trumbauer M.E. y col. (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature*. 387: 288–292.

World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption; FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 978; WHO: Geneva, Switzerland; FAO: Rome, Italy. 2010; 978: 25–29.

World Health Organization; WHO. Mental health action plan 2013-2020. World Health Organization. 2013.

Wu Y.T., Lee H.Y., Norton S., Prina A.M., Fleming J., Matthews F.E. Brayne C. (2014). Period, birth cohort and prevalence of dementia in mainland China, Hong Kong and Taiwan: a meta-analysis. *Int J Geriatr Psychiatry* 29: 1212–20.

Wu Y.Y., Hsu J.L., Wang H.C., Wu S.J., Hong C.J., Cheng I.H. (2015). Alterations of the Neuroinflammatory Markers IL-6 and TRAIL in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 5(3): 424-34.

Xiao L., Xu X., Zhang F., Wang M., Xu Y., Tang D. y col. (2017). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorated tubular injury mediated by mitophagy in diabetic kidney disease via Nrf2/PINK1. *Redox Biol*. 11:297-311.

Xiao Q., Gil S.C., Yan P., Wang Y., Han S., Gonzales E. y col. (2012). Role of phosphatidyl inositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis. *J. Biol. Chem*. 287: 21279–21289.

Wu Y.T., Fratiglioni L., Matthews F.E., y col. (2015). Dementia in western Europe: epidemiological evidence and implications for policy making. *Lancet Neurol* 15: 116–24.

Yaghoubi M., Oliver-Krasinski J., Cayatte A.J., Cohen R.A. (2000). Decreased sensitivity to nitric oxide in the aorta of severely hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 36(6): 751-7.

Yavin E., Himovichi E., Eilam R. (2009). Delayed cell migration in the developing rat brain following maternal omega 3 alpha linolenic acid dietary deficiency. *Neuroscience*. 162: 1011–1022.

Yeh F.L., Wang Y., Tom I., Gonzalez L.C., Sheng M. (2016). TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron*. 91(2): 328-40.

Yokokura M., Mori N., Yagi S., Yoshikawa E., Kikuchi M., Yoshihara Y. y col. (2011). In vivo changes in microglial activation and amyloid deposits in brain regions with

hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 38: 343–351.

Yu J.T., Tan L. (2012). The role of clusterin in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis, and therapy. *Mol. Neurobiol.* 45: 314–326.

Yun H.Y., Dawson V.L., Dawson T.M. (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Critical Reviews in Neurobiology.* 10(3-4): 291–316.

Yurko-Mauro K., Alexander D.D., Van Elswyk M.E. (2015). Docosahexaenoic acid and adult memory: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 10: e0120391.

Yurko-Mauro K., McCarthy D., Rom D., Nelson E.B., Ryan A.S., Blackwell A. y col (2010). Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimer's Dement.* 6: 456–464.

Zannis V.I., Just P.W., Breslow J.L. (1981). Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am. J. Hum. Genet.* 33: 11–24.

Zhang S.H., Reddick R.L., Piedrahita J.A., Maeda N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 258(5081): 468-71.

Zheng C., Zhou X.W., Wang J.Z. (2016). The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ . *Transl Neurodegener.* 5:7.

Zhou Y., Hayashi I., Wong J., Tugusheva K., Renger J.J., Zerbinatti C. (2014). Intracellular clusterin interacts with brain isoforms of the bridging integrator 1 and with the microtubule-associated protein Tau in Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 9:e103187.

Zhu J., Chu C.T. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Alzheimer's Disease.* 20(2): S325–S334.

Zhuang S., Demirs J.T., Kochevar I.E. (2000). P38 mitogenactivated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry.* 275(34): 25939–25948.

Zlokovic B.V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 12(12): 723–738.

Zlokovic B.V. (2013). Cerebrovascular effects of apolipoprotein E: implications for Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 70(4): 440-4.

Zomer A.W., Van der Burg B., Jansen G.A., Wanders R.J. (2000). Poll-The B.T. Van Der Saag P.T. Pristanic acid and phytanic acid. Naturally occurring ligands for the

nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *J. Lipid Res.* 41: 1801–1807.

Zhou L., Gao Q., Nie M., Gu J.L., Hao W., Wang L., Cao J.M. (2016). Degeneration and energy shortage in the suprachiasmatic nucleus underlies the circadian rhythm disturbance in ApoE^{-/-} mice: implications for Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 6:36335.

Zhou Z., Xu A., Vanhoutte P.M. (2011). Chronic administration of BMS309403 improves endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice and in cultured human endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 162(7): 1564-76.