



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Mecanismos de neuroprotección mediante la modulación de SIRT1

Rubén Corpas Expósito

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

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

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



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

# **Mecanismos de neuroprotección mediante la modulación de SIRT1**

Rubén Corpas Expósito  
2016



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

# **Mecanismos de neuroprotección mediante la modulación de SIRT1**

Memòria presentada per **Rubén Corpas Expósito** per optar al títol de  
doctor per la **Universitat de Barcelona**

DIRECTOR: Coral Sanfeliu

TUTOR: Mercè Pallàs

DOCTORAND: Rubén Corpas

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB), CSIC

**RUBÉN CORPAS EXPÓSITO**

2016



El proyecto de tesis de **Rubén Corpas Expósito**:

**Mecanismos de neuroprotección mediante la modulación de SIRT1,**

ha sido realizado en el:

**Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB), CSIC,**

dirigido por:

**Dra. Coral Sanfeliu**

Unidad de Envejecimiento y Neurodegeneración.

IIBB-CSIC

IDIBAPS



## FINANCIACIÓN

Esta tesis ha sido financiada por los proyectos CSD2010-00045 y SAF2012-39852-C02-02 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



Paso a paso.

No concibo ninguna otra manera para lograr las cosas.

*Michael Jordan #23*

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa.

*Mahatma Gandhi (1869-1948)*

La ciència es compon d'errors,  
que a la vegada, són les passes cap a la veritat.

*Julio Verne (1828-1905)*



## **AGRADECIMIENTOS**

De pequeño ya realizaba mis propias investigaciones con hormigas, caracoles, lagartijas, renacuajos, moscas...hasta tuve mi propio microscopio, que aún conservo. Eran momentos para soñar e imaginar que algún día haría algo importante. Recuerdo cuando a mi madre le decía “tú nunca morirás, porque yo inventaré algo”. Ese sueño de niño científico no va a ser posible, aunque el trabajo realizado durante estos años de tesis contribuirá para el conocimiento de mecanismos relacionados con la longevidad y la enfermedad de Alzheimer, y para conseguir un envejecimiento saludable.

La etapa de doctorando no ha sido fácil, y ha requerido de mucho sacrificio. El esfuerzo, la constancia y la superación para las triatlones también sirve para otros ámbitos de la vida. Quien me iba a decir hace unos años que tendría ante mis manos una tesis doctoral y que estaría a un paso de ser doctor. Me doy cuenta de lo que he conseguido y ha valido la pena. Alegrías y buenos momentos son lo que ahora me viene a la memoria, y estoy muy agradecido a todos los compañeros, amigos y familiares que han participado en mi vida para que esta tesis haya sido posible.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis padres, por haberme permitido soñar y por haber hecho todo lo posible para llegar a ser quien soy. Gracias por todo el apoyo, por haberme enseñado la palabra esfuerzo y por la educación recibida. Con los puzles y las tablas de multiplicar empezó todo. El tren pasó una vez y lo supe coger.

A mi hermana Rebeca, por ser mi amiga y confidente durante toda nuestra infancia. Las conversaciones de Pinochito y Blancanieves no se olvidan, bona niiiiit. Gracias por aguantar las noches de estudio con los ruidos de la silla, ñic, ñic. Bequita, puedes contar conmigo. Un besito.

Mireia, la meva companya de viatge a la vida. Moltes gràcies pels ànims en els moments de debilitat científica, quan pensava que amb la ciència no hi havia futur. Per entendre les males cares al tornar del labo, i per compartir els neguits dels mals resultats i les alegries de les publicacions. Gràcies per tot i recorda, “en la prosperitat i en l’adversitat, en la salut i en la malaltia, i que t’estimaré i t’honoraré tota la vida”.

A todos los compañeros del IIBB por convivir todos los días, y a los compis de farmacia por las colaboraciones...a todos, muchas gracias.

En especial al labo 607, por hacer que las jornadas de trabajo no sean tan duras. Y a Sara, gracias por las confidencias de abogado, si, sé que has continuado la frase con lo que tengo aquí colgado. Moltes gràcies per haver contribuït de manera especial en aquesta etapa, en la que malgrat tota la feina, cada dia treies un somriure, i quan ja sortia to bé era la bomba. Al labo se't troba a faltar. A veure si ara ja comença a sonar la flauta. Muchas gracias a MJ, Marta y David, con vosotros y Sara, el labo 607 fue el mejor grupo de pre- y post-hocs de chichinabo. Gracias por ser parte de esta tesis y por acompañarme en los momentos de felicidad. Aunque cada uno siga su camino, recordad que siempre nos quedará Heidelberg y Walter Mitty.

Coral, gràcies per haver confiat en mi, i per haver-me donat la oportunitat de formar-me com a investigador i també com a persona. Sempre t'estaré molt agraït.

Mercè, gràcies per col·laborar amb la Coral, per estar present en els millor moments, i que des de farmàcia continuïn les col·laboracions!!! Moltes gràcies.

A toda la gente de la cantina, o camarote de los hermanos Marx. Todos hacéis posible que la pausa entre experimentos sea más divertida, porque en la cantina no se habla de trabajo, es el lugar para explicar anécdotas, historias y para sacar temas al azar...muchas gracias por los momentos vividos. Y a todos los compañeros que vamos de casa rural, siempre recordareis los madrugones con música celestial y sobretodo el momento de los globos... Gracias por celebrar mi despedida de soltero y por hacerme disfrutar de las pruebas. Fue un fin de semana muy especial que recordaré toda la vida. Muchas gracias, y por cierto, si leéis esto estáis muertos.

Al gen Baronia, por llamarme científico loco y mata-ratas. Ya lo sé, seré doctor, tendré buena memoria y viviré más, pero nos quedaremos calvos. Esa sí que hubiera sido una buena investigación para la tesis.

Agradecer a tod@s los que han sido parte importante de esta etapa tan especial en mi vida. Gracias por estar ahí. Y sobre todo gracias a mi familia por estar orgullosos, y a los que me rodean cada día.

# **ÍNDICE**



<b>ÍNDICE</b> .....	i
<b>ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. El envejecimiento .....	3
2. Teorías clásicas del envejecimiento .....	4
a) Teorías estocásticas .....	4
b) Teorías no estocásticas .....	5
3. Marcadores moleculares del envejecimiento .....	5
a) Daños primarios .....	6
b) Daños secundarios .....	6
c) Daños terciarios .....	7
4. Enfermedad de Alzheimer .....	7
a) Medicamentos .....	9
b) Epidemiología .....	9
c) Antecedentes históricos .....	9
5. Tipos de enfermedad de Alzheimer .....	10
a) Alzheimer familiar .....	10
• Mutaciones en el gen APP .....	10
• Mutaciones en los genes PSEN1 y PSEN2 .....	11
b) Alzheimer esporádico .....	11
6. Procesamiento de la proteína precursora amiloide .....	12
a) Vía no amiloidogénica .....	13
• ADAM10 .....	13
b) Vía amiloidogénica .....	14
• BACE1 .....	14
• $\gamma$ -secretasa .....	15
7. Fosforilación de tau .....	15
8. Proteostasis .....	16
9. Neuroinflamación .....	17
10. El cerebro .....	19
a) Hipocampo de ratón .....	19
b) Conexiones hipocampales .....	21
11. Sirtuinas .....	21
a) Clasificación de las sirtuinas .....	22
12. Sirtuina 1 .....	23
13. Resveratrol .....	24

14. Melatonina .....	27
15. Activación de SIRT1 como terapia anti-Alzheimer .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	31
<b>METODOLOGÍA</b> .....	35
1. Ratones modelo de Alzheimer 3xTg-AD .....	37
2. Vectores lentivirales .....	38
3. Inyección esterotáxica en hipocampo y transducción génica .....	38
4. Sobreexpresión de SIRT1 .....	39
5. Administración de resveratrol .....	39
6. Administración de melatonina .....	39
7. Pruebas de comportamiento .....	40
• Prueba de las esquinas .....	40
• Campo abierto .....	40
• Ensayo Sensorial .....	40
• Coordinación motora y equilibrio .....	41
• Caja oscura/iluminada .....	41
• Tabla de los cuatro agujeros .....	41
• Reconocimiento de objetos .....	42
• Laberinto acuático de Morris .....	42
8. Muestras cerebrales .....	43
9. Inmunofluorescencia de muestras cerebrales .....	43
10. PCR cuantitativa en tiempo real .....	45
11. Validación del modelo in vitro de 3xTg-AD .....	45
12. Cultivo de neuronas y transducción génica .....	46
13. Inmunocitoquímica de cultivos neuronales .....	47
14. Inmunodetección de proteínas por Western blot .....	47
15. Análisis estadístico .....	47
<b>RESULTADOS</b> .....	49
<b>ESTUDIO 1: PROTECCIÓN DE LA PÉRDIDA COGNITIVA POR SOBREEXPRESIÓN DE SIRT1 EN EL HIPOCAMPO</b> .....	51
• Expresión de SIRT1 y GFP en la zona CA1 del hipocampo .....	51
• La sobreexpresión de SIRT1 induce protección contra las alteraciones de comportamiento asociadas a demencia .....	52
• La sobreexpresión de SIRT1 protege contra la pérdida cognitiva en ratones 3xTg-AD e induce mejora cognitiva en ratones NoTg .....	52
• La sobreexpresión de SIRT1 induce neuroprotección contra A $\beta$ y p-tau en ratones 3xTg-AD .....	54

<b>ESTUDIO 2: PROTECCIÓN DE LA NEURODEGENERACIÓN POR SOBREEXPRESIÓN DE SIRT1 EN CULTIVOS NEURONALES</b> .....	55
• Expresión de SIRT1 y GFP en cultivos de neuronas .....	55
• Sobreexpresión de SIRT1 reduce la patología A $\beta$ y tau en cultivos neuronales 3xTg-AD .....	56
• SIRT1 protege contra la disfunción de proteostasis e incrementa la vía no amiloidogénica .....	58
• La sobreexpresión de SIRT1 induce un aumento del neurotrofismo .....	59
• SIRT1 incrementa la plasticidad sináptica en cultivos neuronales .....	60
<b>ESTUDIO 3: PROTECCIÓN DE LA PÉRDIDA COGNITIVA POR TRATAMIENTO CON RESVERATROL</b> .....	62
• El tratamiento con resveratrol induce protección contra las alteraciones de comportamiento asociadas a demencia .....	62
• El tratamiento con resveratrol induce protección contra la pérdida cognitiva en ratones 3xTg-AD .....	63
• La administración de resveratrol protege contra la patología amiloide .....	64
• La administración de resveratrol protege contra la patología tau en ratones 3xTg-AD .....	66
• Resveratrol aumenta la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma .....	66
• La administración de resveratrol activa las vías reguladoras y efectoras de SIRT1 .....	67
<b>ESTUDIO 4: PROTECCIÓN DE LA PÉRDIDA COGNITIVA POR TRATAMIENTO CON MELATONINA</b> .....	69
• El tratamiento con melatonina induce protección contra las alteraciones de comportamiento asociadas a demencia .....	69
• La administración de melatonina protege contra la pérdida cognitiva en ratones 3xTg-AD .....	70
• La administración de melatonina protege contra la patología amiloide y tau en ratones 3xTg-AD .....	71
• La administración de melatonina no modifica el sistema ubiquitina-proteasoma .....	72
• La administración de melatonina activa las vías reguladoras de SIRT1 .....	73
• La administración de melatonina no modifica la proteólisis de APP y A $\beta$ .....	74
• La melatonina protege contra la neuroinflamación en ratones 3xTg-AD .....	74
• La administración de melatonina reduce la inflamación sistémica .....	75
<b>DISCUSIÓN</b> .....	77
<b>CONCLUSIONES</b> .....	89
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	93



# **ABREVIATURAS**



- A $\beta$** : proteína  $\beta$ -amiloide
- ac-**: proteína acetilada
- AD**: enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer's disease*)
- ADAM10**: *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*
- AICD**: dominio intracelular de APP (*APP intracellular domain*)
- AMPK**: *adenosine monophosphate-activated protein kinase*
- APOE**: apolipoproteína E
- APP**: proteína precursora amiloide (*amyloid precursor protein*)
- BACE1**: *beta-site APP cleaving enzyme 1*
- BDNF**: factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain-derived neurotrophic factor*)
- BPSD**: alteraciones del comportamiento asociadas a demencia (*behavioural and psychological symptoms of dementia*)
- CA**: cuerno de Amón
- CE**: corteza entorrinal
- CHIP**: *carboxyl-terminus of Hsp70 interacting protein*
- CMV**: *cytomegalovirus immediate early promoter*
- CTF**: fragmento carboxiterminal (*carboxi-terminal fragment*)
- DMEM**: medio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)
- DNA**: ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- DR6**: *death receptor 6*
- FAD**: enfermedad de Alzheimer familiar (*familial Alzheimer's disease*)
- FOXO**: *forkhead box protein O*
- Gas6**: *growth-arrest-specific gene 6*
- GD**: giro dentado
- GDNF**: factor neurotrófico derivado de la glía (*glial cell line-derived neurotrophic factor*)
- GFAP**: proteína fibrilar acídica de la glía (*glial fibrillary acidic protein*)
- GFP**: *green fluorescent protein*
- Hsp70**: proteína de choque térmico 70 (*heat shock protein 70*)
- IDE**: enzima degradadora de insulina (*insulin-degrading enzyme*)

- IF:** inmunofluorescencia
- IL:** interleuquina
- LXR:** receptor X del hígado (*liver X receptor*)
- MAP2:** proteína asociada a microtúbulo 2 (*microtubule-associated protein 2*)
- MEL:** tratamiento melatonina
- MWM:** laberinto acuático de Morris (*Morris water maze*)
- NAD:** *nicotine adenine dinucleotide*
- NeuN:** proteína nuclear específica neuronal (*neuronal specific nuclear protein*)
- NF- $\kappa$ B:** *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- NFT:** ovillos neurofibrilares (*neurofibrillary tangles*)
- NMDA:** *N-methyl-D-aspartate*
- NOR:** ensayo de reconocimiento de objetos (*novel object recognition*)
- p-:** proteína fosforilada
- PGC-1 $\alpha$ :** *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
- PGK:** *phosphoglycerate kinase 1 promoter*
- PSD95:** proteína de densidad postsináptica 95 (*postsynaptic density protein 95*)
- RAR $\beta$ :** receptor beta de ácido retinoico (*retinoic acid receptor beta*)
- ROS:** especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)
- RV:** tratamiento resveratrol
- Sir2:** *silent mating type information regulation two*
- TBP:** *TATA-binding protein*
- TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*)
- TORC1:** *CREB-regulated transcription coactivator 1*
- TrkB:** receptor de tropomiosina quinasa B (*tropomyosin receptor kinase B*)
- UPS:** sistema ubiquitina-proteasoma (*ubiquitin-proteasome system*)
- VEGF-A:** factor de crecimiento endotelial vascular A (*vascular endothelial growth factor A*)
- VSV-G:** *vesicular stomatitis virus G glycoprotein*
- WB:** Western blot

# **RESUMEN**



El aumento de la esperanza de vida poblacional que ha tenido lugar en las últimas décadas, previsiblemente conducirá a un incremento de la incidencia de enfermedades asociadas con la edad, incluyendo la demencia. La principal causa de demencia es la enfermedad de Alzheimer (AD) contra la que no existen tratamientos efectivos, por lo que se está convirtiendo en un obstáculo para el envejecimiento saludable. Es de gran interés científico y social la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para disminuir el riesgo de AD y la severidad de la patología una vez desencadenada.

En esta tesis se estudia la vía de longevidad y neuroprotección de SIRT1, una desacetilasa que tiene una actividad antienviejamiento en cuanto a su contribución al mantenimiento de la fisiología celular. Estudios previos sugieren que puede ser eficaz contra aspectos de la patología neuronal de tipo amiloide y tau que cursa en AD.

El objetivo general es definir la vía de SIRT1 como diana terapéutica en AD. El estudio se ha llevado a cabo en ratones 3xTg-AD y cultivos neuronales de estos ratones, como modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, de AD.

La investigación se ha desarrollado en los siguientes estudios:

Estudio 1: Se demuestra que la sobreexpresión de SIRT1 mediante la inyección de un vector lentiviral en el hipocampo de ratones 3xTg-AD induce protección de la pérdida cognitiva, ya que los ratones 3xTg-SIRT1 muestran memoria y capacidad de aprender durante los diferentes ensayos de comportamiento. Los análisis muestran que los ratones 3xTg-SIRT1 favorecen la vía no amiloidogénica de la proteína APP mediante el aumento de la expresión de ADAM10. El incremento de los niveles de los factores neurotróficos BDNF y VEGF analizados en el hipocampo también adquiere importancia en la protección cognitiva ya que favorecen la plasticidad neuronal. Es notable el hecho de que el efecto pro-cognitivo inducido por la sobreexpresión de SIRT1 se detecta también en ratones control.

Estudio 2: Mediante los cultivos de neuronas 3xTg-SIRT1 se demuestra un aumento de las vías de degradación por las que disminuye el péptido A $\beta$ , con aumento de la proteína IDE y del sistema ubiquitina-proteasoma. La activación de la vía no amiloidogénica de

procesamiento de la APP promovida por SIRT1 contribuye a la disminución de A $\beta$ . La disminución de p-tau se produce a través de la desacetilación de la proteína ac-tau que induce su degradación por el proteasoma. El aumento de los niveles de factores neurotróficos y la mejora de la arborización es otro de los mecanismos implicados en la neuroprotección inducida por SIRT1 y se observa en neuronas 3xTg-AD y en neuronas control. Igualmente destacable es el hecho que la activación de las vías de proteólisis de proteínas anormales se detecta también en las neuronas control.

Estudios 3 y 4: El ensayo de dos moléculas activadoras de SIRT1 que pueden ingerirse con la dieta, resveratrol y melatonina, ha demostrado sus efectos neuroprotectores en ratones 3xTg-AD. Los análisis realizados muestran que el tratamiento con melatonina o con resveratrol induce una actividad recuperadora de la capacidad cognitiva y neuroprotectora de la patología AD. Los mecanismos estudiados demuestran la implicación de la vía SIRT1.

En esta tesis se ha demostrado que la activación farmacológica de SIRT1 puede ser una buena estrategia terapéutica para prevenir y proteger contra los procesos neurodegenerativos, ya que los beneficios incluyen: (i) la total preservación de la capacidad cognitiva, (ii) una extraordinaria protección contra la patología amiloide y tau, (iii) activación de las vías de proteólisis de proteínas anormales, y (iv) activación del neurotrofismo.

# **INTRODUCCIÓN**



El incremento progresivo de la esperanza de vida ha dado lugar a un aumento de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's disease*), un trastorno neurodegenerativo progresivo que conduce a una disfunción sináptica, demencia y finalmente a la muerte. AD es la causa de demencia más común y se está convirtiendo en un obstáculo para conseguir un envejecimiento saludable.

En esta tesis se ha estudiado la proteína SIRT1, una desacetilasa que contribuye a la regulación celular en respuesta a estresores y promueve la longevidad del organismo. SIRT1 induce efectos neuroprotectores contra la patología AD mediante la regulación de la acetilación de proteínas clave.

La modulación farmacológica de SIRT1 resulta interesante para el control de la pérdida cognitiva relacionada con la edad. SIRT1 puede ser modulada mediante estilos de vida, tales como el ejercicio físico y mediante algunas dietas como la administración de resveratrol.

A lo largo de esta tesis se han estudiado los efectos neuroprotectores de SIRT1 mediante su sobreexpresión y el efecto de compuestos activadores de SIRT1 como son el resveratrol y la melatonina.

## **1. El envejecimiento**

Desde un punto de vista biológico, el envejecimiento se define como el conjunto de modificaciones inevitables e irreversibles que se producen en el organismo con el paso del tiempo, que provocan una disminución gradual del funcionamiento de los órganos y que finalmente conducen hacia la muerte del individuo.

Es difícil determinar el momento en el que se inicia el envejecimiento, aunque está considerado que se manifiesta a partir del estado de máxima vitalidad, alrededor de los 26-30 años (Belsky et al., 2015). La población de personas mayores de 65 años es cada vez más numerosa en nuestra sociedad (World Health Statistics, 2016), por lo que el estudio de los mecanismos asociados a las enfermedades relacionadas con la edad es vital para mantener una buena calidad de vida a largo de edades avanzadas.

Hasta el momento no existe una única definición aceptada, sin embargo el proceso de envejecimiento presenta las siguientes características (Vina et al., 2007):

- Universal: ocurre en todos los organismos vivos y se presenta de manera similar en todos los individuos de una misma especie.
- Deletéreo: el proceso lleva hacia una pérdida progresiva de funciones en el organismo.
- Progresivo: los cambios se producen de manera acumulativa e irreversible a lo largo de la vida.
- Intrínseco: las causas son de origen endógeno y no dependen de factores ambientales modificables.

## 2. Teorías clásicas del envejecimiento

Existen multitud de teorías que intentan explicar el proceso de envejecimiento y que se dividen en dos tipos de pensamiento (Weinert and Timiras, 2003). Las teorías estocásticas proponen que el envejecimiento se produce como consecuencia de alteraciones aleatorias que se acumulan a lo largo del tiempo en el organismo, mientras que el pensamiento no estocástico considera que el envejecimiento del organismo está predeterminado y que es una continuación del proceso de desarrollo que corresponde a la última etapa dentro de una secuencia de eventos codificados en el genoma.

### a) Teorías estocásticas

- **Teoría del error catastrófico:** Propone que con el paso del tiempo se producen errores en la replicación del material genético que se van acumulando. Los errores en la síntesis proteica producen daño en la función celular y finalmente la muerte (Orgel, 1963).
- **Teoría del entrecruzamiento:** Postula que con el paso del tiempo las proteínas se deterioran y se producen entrecruzamientos entre proteínas y otras macromoléculas celulares, de manera que no pueden ejercer la función correcta y se desarrollan enfermedades (Bjorksten, 1968).
- **Teoría del desgaste:** Propone que cada organismo está formado por partes irremplazables y que una acumulación de daño en las partes vitales comporta la muerte de las células, tejidos, órganos y finalmente del organismo.
- **Teoría de los radicales libres:** Teoría de las más populares y aceptadas que propone que el envejecimiento es el resultado de una inadecuada protección contra el daño producido en los tejidos por los radicales libres (Harman, 1956). Se ha demostrado

que ciertos antioxidantes, mediante la disminución radicales libres, pueden prevenir la aparición de enfermedades asociadas con la edad además de aumentar la esperanza de vida en diferentes especies (Anisimov et al., 2006; Marchal et al., 2013).

- **Teoría del estrés oxidativo y daño mitocondrial.** Se sugiere que el envejecimiento es el resultado del daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) en el genoma mitocondrial de las células postmitóticas (Miquel, 1998; Vina et al., 2007). De esta manera la función celular se encuentra alterada y disminuye la resistencia ante situaciones de estrés, produciéndose daño oxidativo, disfunción celular y que finalmente culmina con la muerte celular (Hiona and Leeuwenburgh, 2008).

#### **b) Teorías no estocásticas**

- **Teoría del marcapasos:** Determina que los sistemas inmune y neuroendocrino son los marcadores internos del proceso de envejecimiento y que la degeneración está determinada para ocurrir en momentos específicos de la vida, actuando como un reloj biológico (Burnet, 1970).
- **Teoría genética:** Teoría de las más aceptadas que sostiene que durante la replicación del DNA (del inglés *deoxyribonucleic acid*) se produce un acortamiento de los telómeros a lo largo de las sucesivas divisiones celulares que determina el tiempo de vida celular (Olovnikov, 1996).

Para todas estas teorías se han hallado evidencias científicas que las respaldan, aunque ninguna de ellas por sí sola puede explicar el proceso del envejecimiento en su totalidad, ya que es un proceso multifactorial en el que hay un conjunto de interacciones de origen genético que se ven influidos por el medio ambiente y por los estilos de vida de cada persona.

### **3. Marcadores moleculares del envejecimiento**

Actualmente se han definido nueve indicadores moleculares del envejecimiento que se clasifican en tres categorías dependiendo del efecto que se consigue incidiendo sobre ese mecanismo (Lopez-Otin et al., 2013). La combinación de estos enfoques permite una comprensión detallada de los mecanismos fundamentales del envejecimiento y facilita futuras intervenciones para poder obtener un envejecimiento saludable.

### a) Daños primarios

Son los causantes primarios del envejecimiento, y al incidir sobre un único mecanismo es posible retrasar el envejecimiento de muchos organismos y tejidos.

- **Inestabilidad genómica:** Se refiere a los defectos que se van acumulando en los genes a lo largo del tiempo, por causas intrínsecas o extrínsecas, ya que debe haber un equilibrio entre las lesiones del DNA y las vías de reparación (Moskalev et al., 2013).
- **Desgaste de los telómeros:** La función de los telómeros es la estabilidad estructural del cromosoma y la protección de los extremos a lo largo de las sucesivas divisiones celulares. Los extremos de los cromosomas se van acortando tras cada división celular, de modo que cuando son muy cortos la célula no puede dividirse y muere (Blackburn et al., 2006).
- **Alteraciones epigenéticas:** Son los daños a las proteínas que se unen al DNA, debidos a la exposición al ambiente. En los cambios epigenéticos tienen gran influencia los hábitos de vida (Talens et al., 2012).
- **Pérdida de proteostasis:** Se producen alteraciones en la capacidad de degradación de proteínas aberrantes, de manera que las proteínas defectuosas no se eliminan y se acumulan, causando patologías asociadas al envejecimiento. En la AD se produce una acumulación de las proteínas A $\beta$  y p-tau, por lo que las neuronas acaban muriendo (Powers et al., 2009).

### b) Daños secundarios

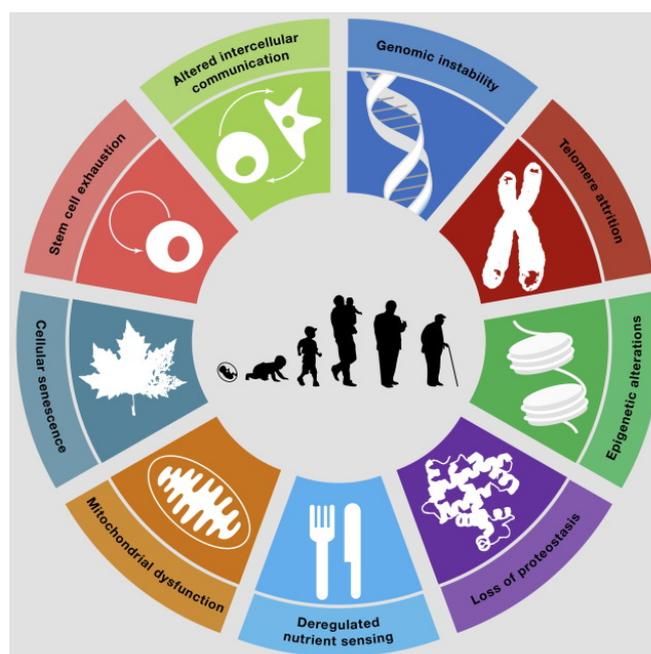
Son las respuestas del organismo a las causas desencadenantes del envejecimiento y que tratan de corregir sus daños, sin embargo, si se cronifican o agravan también se vuelven dañinas.

- **Desregulación de los sensores de nutrientes:** Son mecanismos metabólicos que hacen que se prolongue la longevidad debido a una disminución en la ingesta de calorías (Mattison et al., 2012).
- **Disfunción mitocondrial:** Se trata de un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de un sistema biológico de reparar el daño oxidativo producido (Park and Larsson, 2011).
- **Senescencia celular:** Induce a la célula a dejar de dividirse cuando acumula muchos defectos (Kuilman et al., 2010), de manera que se pueden prevenir enfermedades como el cáncer. Sin embargo, si esta respuesta se da en exceso se producen procesos de daño celular y los tejidos envejecen.

### c) Daños terciarios

El tercer grupo de indicadores son los fallos funcionales resultantes que emergen cuando los daños causados no pueden ser compensados.

- **Agotamiento de células madre:** Las células madre se agotan, por lo que se produce una disminución del potencial regenerador de los tejidos (Shaw et al., 2010).
- **Alteración de la comunicación intercelular:** Se trata de la aparición de errores debidos a la pérdida de comunicación entre tejidos, que pueden dar lugar al proceso de inflamación crónica (Zhang et al., 2013).

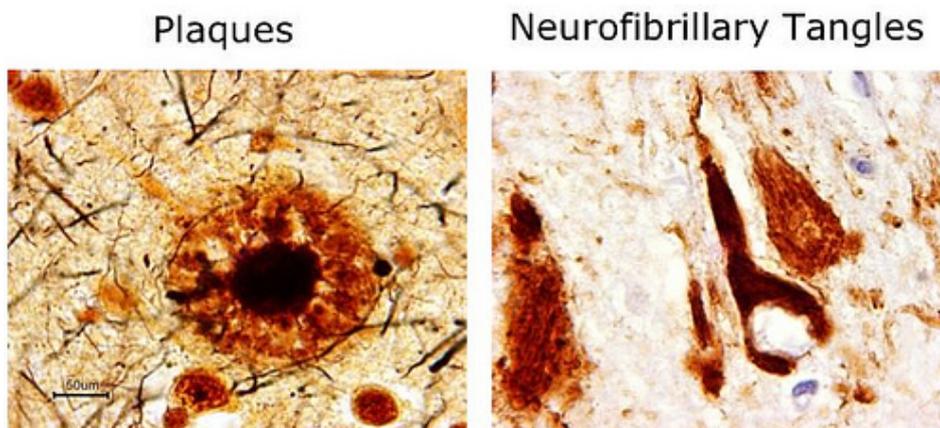


**Imagen 1.** Marcadores moleculares del envejecimiento. El esquema enumera las nueve características del envejecimiento (Lopez-Otin et al., 2013).

## 4. Enfermedad de Alzheimer

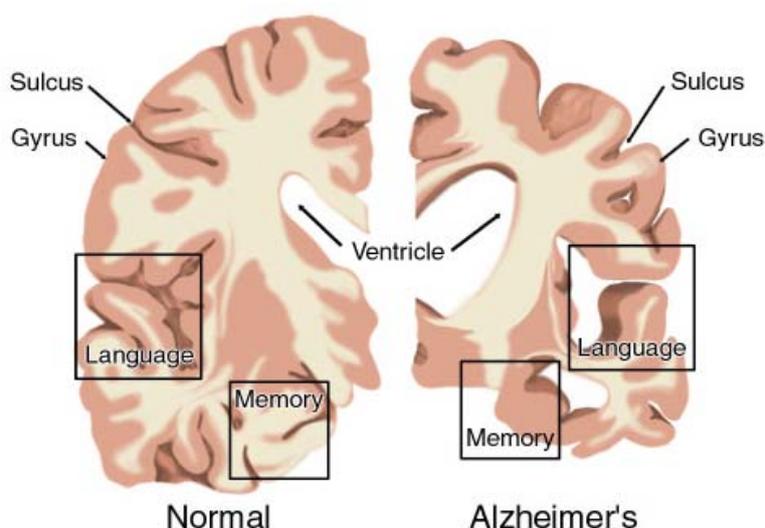
La enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's disease*) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que conduce a un deterioro de la función cerebral y finalmente a la muerte. El cerebro del afectado por AD muestra una patología típica con la presencia de deposiciones extracelulares de proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y de ovillos neurofibrilares (NFT, del inglés *neurofibrillary tangles*) de proteína tau hiperfosforilada (p-tau) (Hardy and Selkoe, 2002).

La deficiencia más notable en los afectados por AD es la pérdida de memoria y una inhabilidad para adquirir nueva información (Kazui et al., 2005), aunque los primeros síntomas se suelen confundir con la vejez (Waldemar et al., 2007).



**Imagen 2.** Alteraciones histopatológicas típicas del cerebro afectado de Alzheimer: placas seniles de  $\beta$ -amiloide y ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada. <http://morebrainpoints.blogspot.com.es>

A medida que la enfermedad avanza se produce una degeneración de las neuronas involucradas en los procesos de la memoria, que incluye la muerte selectiva de células nerviosas, la pérdida de sinapsis neuronal, la disminución en los niveles de neurotransmisores, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la atrofia de diferentes zonas del cerebro que finalmente producen la pérdida de la función cognitiva y posteriormente la muerte del individuo (DeKosky and Scheff, 1990). Además, los afectados presentan dificultades para el lenguaje, pérdida de la orientación y de la facultad de reconocimiento, problemas para ejecutar movimientos coordinados, y padecen trastornos conductuales que acaban afectando a la capacidad de juicio (Cummings, 2004).



**Imagen 3.** Secciones transversales de un cerebro sano y un cerebro afectado de enfermedad de Alzheimer. Las zonas relacionadas con el lenguaje y la memoria se encuentran afectadas. Imagen modificada de [www.brightfocus.org](http://www.brightfocus.org)

### **a) Medicamentos**

Actualmente no existen tratamientos efectivos contra la AD. Donezepilo, rivastigmina y galantamina son agentes farmacológicos con acción pro-colinérgica por inhibición de la acetilcolinesterasa. Memantina actúa como antagonista de NMDA (del inglés *N-methyl-D-aspartate*). En todos los casos son tratamientos sintomáticos que no evitan la progresión de la enfermedad (Kumar et al., 2015).

El conocimiento actual de que existe una larga fase preclínica asintomática previa a la aparición de los primeros síntomas de declive cognitivo ha estimulado el ensayo de nuevos tratamientos preventivos y terapéuticos (Molinuevo et al., 2016).

### **b) Epidemiología**

En los últimos años, el aumento de la esperanza de vida ha dado lugar a un incremento de la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas. Los datos indican que actualmente 46.8 millones de personas en todo el mundo padecen algún tipo de demencia y se estima que esta cifra aumentará hasta los 74.7 millones en 2030 y hasta los 131.5 millones en 2050 (World Alzheimer Report, 2015).

La causa de demencia más común es AD, con un 60-70% de los casos (Reitz et al., 2011) y las predicciones muestran que en 2050 estará afectada 1 de cada 85 personas, por lo que se está convirtiendo en un obstáculo para el envejecimiento saludable (Brookmeyer et al., 2007). En las personas mayores de 65 años afecta al 7-10% de los individuos, mientras que si se sobrepasan los 80 años el porcentaje aumenta hasta un 40% (Wimo et al., 2003). A nivel mundial, se presenta una prevalencia regional del 1.6% en África, del 4% en las regiones de China y el Pacífico Occidental, del 4.6% en América Latina, del 5.4% en el oeste Europa y del 6.4% en América del Norte (Ferri et al., 2005).

### **c) Antecedentes históricos**

La AD fue descrita por primera vez el 4 de noviembre de 1906, cuando el alemán Alois Alzheimer (1864-1915) presentó una ponencia que describía una inusual enfermedad de la corteza cerebral. En el trabajo del doctor Alzheimer se describió el cuadro clínico de los 4 años de evolución de Auguste Deter, una mujer de 51 años que presentaba alteraciones psiquiátricas junto con un deterioro rápido y progresivo de la memoria, y que falleció a causa de una septicemia y neumonía (Tanzi and Bertram, 2005).

El estudio histológico del cerebro, mediante la utilización de tinción de plata, mostró la presencia de lesiones histopatológicas señaladas como placas seniles o amiloideas, NFT y cambios arterioscleróticos cerebrales (Goedert and Spillantini, 2006).

Desde entonces se ha demostrado que el componente mayoritario de las placas seniles es A $\beta$  y que los NFT están formados por p-tau (Hardy and Selkoe, 2002). Estas alteraciones neuropatológicas se sitúan fundamentalmente en el hipocampo, el subiculum, la amígdala y las áreas de asociación neocorticales (Walsh and Selkoe, 2004).

## 5. Tipos de enfermedad de Alzheimer

### a) Alzheimer familiar

Forma poco frecuente de AD que representa menos del 5% del total de casos y que aparece a una edad temprana, entre los 40-65 años (Campion et al., 1999). Al producirse de forma prematura es un tipo más agresivo de AD, ya que compromete la calidad de vida del afectado durante mucho más tiempo.

En la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD, del inglés *familiar Alzheimer's disease*) existe una predisposición genética, ya que tiene un patrón de herencia mendeliano autosómico dominante. Las mutaciones en los genes de la proteína precursora amiloide (APP, del inglés *amyloid precursor protein*), presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) están relacionadas con la FAD y se han asociado con un aumento en la producción de A $\beta$ .

- **Mutaciones en el gen APP:**

Se han descrito varias mutaciones que afectan a la expresión del gen que codifica la APP, localizado en el cromosoma 21. Estas mutaciones pueden conducir a una mayor producción de péptido A $\beta$  o selectivamente de las formas más largas de 42 y 43 aminoácidos que tienen una mayor tendencia a la agregación que las formas más cortas de 36-40 aminoácidos.

La mutación más común de APP reemplaza al aminoácido valina por el aminoácido isoleucina en la posición 717. En la mutación sueca (APPSwe) se produce un doble cambio de aminoácidos en las posiciones 670/671 cerca del lugar de corte de la  $\beta$ -secretasa, lo que promueve un mayor aumento de la escisión de APP (Haass et al., 1995). La mutación Ártica (APPArc) da lugar a formas de aparición temprana de AD en las que aumenta la agregación de A $\beta$  (Nilsberth et al., 2001). Las mutaciones en la zona de corte de la  $\gamma$ -secretasa, como la Florida en la posición 716 o la London en la 717, también incrementan la formación de A $\beta$ . Las mutaciones Flamenca y Holandesa, en las posiciones 692 y 693 respectivamente, se encuentran cerca del lugar de corte de la  $\alpha$ -secretasa y producen hemorragias cerebrales con amiloidosis y AD (Tomiya et al., 2008).

- **Mutaciones en los genes PSEN1 y PSEN2:**

Los genes PSEN1 y PSEN2 codifican para las proteínas presenilina 1 (PS1) y presenilina 2 (PS2), proteínas transmembrana que forman parte del complejo  $\gamma$ -secretasa y que tienen una función reguladora en el procesamiento de la proteína APP. Las mutaciones en los genes de las presenilinas representan un 90% de las mutaciones presentes en la FAD, y en concreto las mutaciones de PSEN1 conforman el 70% de las mutaciones patogénicas, siendo el gen más involucrado. Las mutaciones en el cromosoma 14 provocan una PS1 anormal, mientras que mutaciones en el cromosoma 1 conducen hacia una PS2 anormal (Bird, 2008). A pesar de que existe un 67% de homología entre la secuencia primaria de aminoácidos de ambas presenilinas, la especificidad para PS1 y PS2 proviene de dos regiones, situadas en el extremo N-terminal y dentro del bucle hidrofílico formado entre las regiones transmembrana 6 y 7 (De Strooper et al., 1997).

Como principal factor patogénico, las mutaciones en estas enzimas llevan a la disfunción de la proteólisis del APP generándose un aumento patológico de la ratio  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ . Sin embargo, las presenilinas proteolizan sobre una gran variedad de sustratos intramembrana y también se han estudiado efectos patogénicos relacionados con la respuesta al estrés celular (Sarroca et al., 2016).

### **b) Alzheimer esporádico**

Representa la gran mayoría de los casos de AD (>95%) y es conocida por tener una aparición tardía a partir de los 65 años. Las causas no se conocen con exactitud, pero es probable que incluyan una combinación de factores genéticos, ambientales y de estilo de vida. La edad es el principal factor de riesgo, de tal forma que la prevalencia de AD se duplica cada 5 años después de los 65 años de edad (Barranco-Quintana et al., 2005).

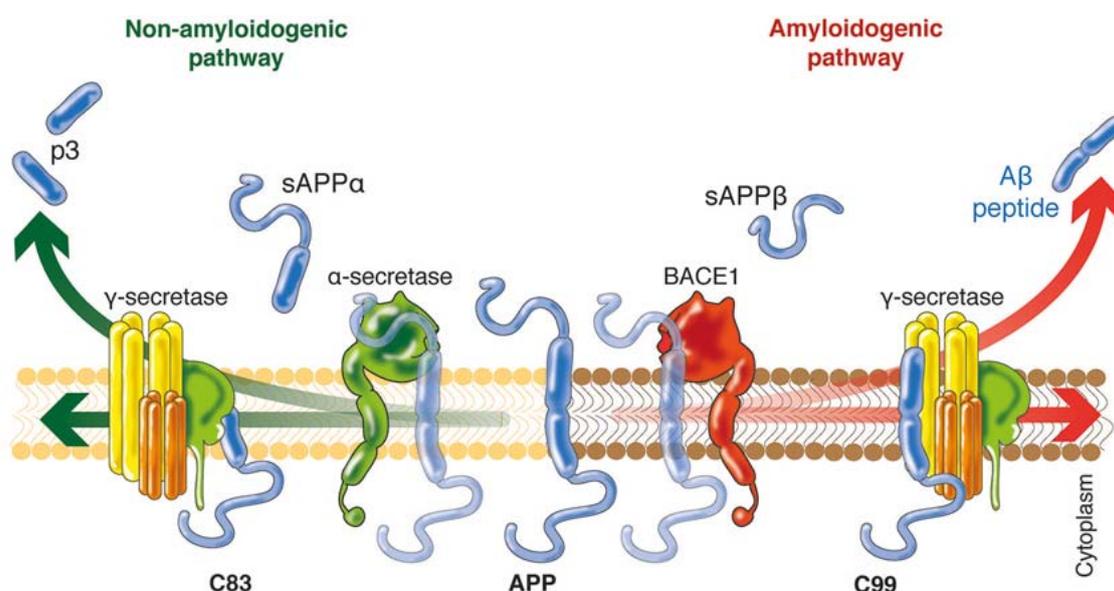
No se conocen los mecanismos del desencadenamiento de AD causado por procesos ligados al envejecimiento cerebral, aunque se ha propuesto el aumento de los niveles de estrés oxidativo y de inflamación como factores significativos (Wu et al., 2016). El polimorfismo genético ApoE4 (Raber et al., 2004), los defectos mitocondriales (Reddy and Beal, 2005), la diabetes de tipo 2 (Qiu and Folstein, 2006), los factores ambientales (Lazarov et al., 2005) y la dieta (Morris, 2004; Tchantchou et al., 2005) son otros de los factores de riesgo asociados con el AD esporádico. Estudios recientes sugieren que estilos de vida como una dieta saludable y la práctica de ejercicio físico pueden ser una terapia preventiva para el AD (Barnard et al., 2014).

El alelo E4 de la apolipoproteína E (APOE, cromosoma 19) está asociado con una amplia variedad de procesos neuropatológicos y aumenta el riesgo de desarrollar AD,

especialmente en los casos homocigóticos (Bertram and Tanzi, 2005; Mahley et al., 2006), aunque se ha sugerido que el mayor riesgo de desarrollar AD conferido por los alelos E4 puede ser más importante en las mujeres (Altmann et al., 2014). Por el contrario, se ha postulado un efecto protector para el alelo E2 (Mahley and Huang, 1999). Actualmente se están desarrollando fármacos para prevenir AD mediante el cambio estructural de la proteína ApoE4, para que se comporte más como la proteína ApoE2, o incluso mediante la mejora de las interacciones entre ApoE4 y A $\beta$ , con la esperanza de aumentar la depuración de A $\beta$  en el cerebro

## 6. Procesamiento de la proteína precursora amiloide

La APP es una proteína integral de membrana tipo I, con el extremo amino-terminal orientado hacia el espacio extracelular y el extremo carboxi-terminal (CTF) hacia el citosol (Kang et al., 1987; Dyrks et al., 1988), que está relacionada con la sinapsis y la plasticidad entre neuronas. Para funcionar, la APP necesita ser procesada en la membrana plasmática mediante la acción de tres tipos de proteasas;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (Haass, 2004), dando lugar a dos formas alternativas de procesamiento que liberan fragmentos casi idénticos, aunque esos pocos aminoácidos de diferencia son capaces de dar lugar a AD (Tanzi and Bertram, 2005). La vía no amiloidogénica parece ser neuroprotectora, mientras que la vía amiloidogénica genera el péptido A $\beta$  (Vetrivel and Thinakaran, 2006). Ambas vías compiten entre ellas, ya que incrementando la actividad  $\alpha$ -secretasa se reduce la producción del péptido A $\beta$  (Nitsch et al., 1992; Postina et al., 2004).

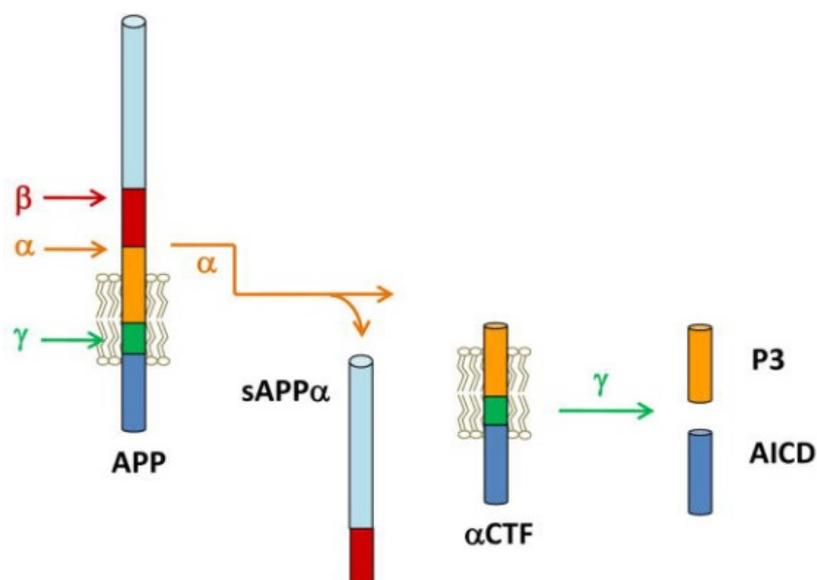


**Imagen 4.** Representación de las vías del procesamiento de la APP (Zolezzi et al., 2014).

### a) Vía no amiloidogénica

El procesamiento no amiloidogénico de la APP comienza con la acción de la  $\alpha$ -secretasa (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990), la cual realiza un corte en la parte extracelular de la APP a nivel del aminoácido 687, que libera una porción extracelular soluble denominada sAPP $\alpha$ . Se ha sugerido que el fragmento sAPP $\alpha$  tiene un papel neuroprotector (Mudher and Lovestone, 2002; Selkoe, 2004). Este procesamiento genera además el fragmento carboxi-terminal de 83 residuos ( $\alpha$ -CTF o C83), que carece de la porción del dominio A $\beta$ .

Posteriormente, el C83 es proteolizado por la  $\gamma$ -secretasa, de manera que se libera un pequeño péptido llamado p3 (Haass et al., 1993), que aparentemente es patológicamente irrelevante, y también un dominio intracelular de APP (AICD, del inglés *APP intracellular domain*) (Gu et al., 2001; Sastre et al., 2001), que es liberado al citosol y que tiene funciones a nivel de señalización nuclear (Cao and Sudhof, 2001; von Rotz et al., 2004).



**Imagen 5.** Procesamiento no amiloidogénico de la APP. Corte mediado por  $\alpha$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa respectivamente (Crump et al., 2013).

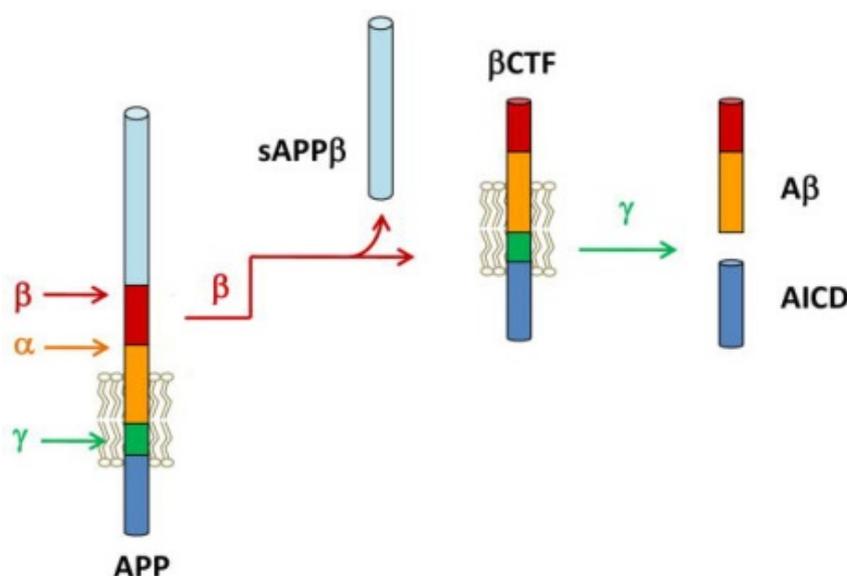
- **ADAM10:**

Varias metaloproteasas dependientes de zinc y miembros de la familia de las disintegrinas A tienen función  $\alpha$ -secretasa (Allinson et al., 2003), aunque existen evidencias que sugieren que ADAM10 (del inglés *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) es la que ejerce la principal actividad constitutiva  $\alpha$ -secretasa en las neuronas (Kuhn et al., 2010). La sobreexpresión de ADAM10 en ratones transgénicos reduce el procesamiento de APP a través de BACE1 (del inglés *beta-site APP cleaving enzyme 1*), de modo que disminuye la deposición de A $\beta$  (Postina et al., 2004), por lo que podría ser una buena diana terapéutica.

### b) Vía amiloidogénica

El procesamiento amiloidogénico de la APP comienza con la acción de la  $\beta$ -secretasa, la cual realiza un corte en la parte extracelular de la APP a nivel del aminoácido 671, liberando de esta forma una porción extracelular soluble denominada sAPP $\beta$  (Haass, 2004). El fragmento sAPP $\beta$  liberado parece funcionar como ligando del DR6 (del inglés *death receptor 6*), un receptor de la superficie celular que transmite señales de apoptosis al unirse a ligandos específicos, mediando la destrucción axonal y la muerte de las neuronas (Nikolaev et al., 2009).

Este procesamiento también genera un fragmento carboxi-terminal de 99 residuos ( $\beta$ -CTF o C99) que se retiene en la membrana y que puede ser a la vez proteolizado por la  $\gamma$ -secretasa para dar lugar a AICD y a los péptidos A $\beta$ , que se acaban acumulando de manera extracelular en forma de placas amiloides (LaFerla et al., 2007; Rajadas et al., 2013).



**Imagen 6.** Procesamiento de la APP por la vía amiloidogénica. Corte mediado por  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa respectivamente (Crump et al., 2013).

- **BACE1:**

Las principales responsables de la actividad  $\beta$ -secretasa son las proteasas BACE, aunque BACE1 se considera más importante que BACE2 (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Lin et al., 2000). La proteasa BACE1 está anclada a la membrana mediante un dominio transmembrana (Hong et al., 2000) y posee un dominio aspartil-proteasa en la porción extracelular que realiza el corte. BACE1 se expresa de forma ubicua, aunque los niveles y la actividad están incrementados en los cerebros de afectados por AD. La actividad  $\beta$ -secretasa es el factor limitante a la hora de generar A $\beta$ , por lo que el estudio de BACE1 es de gran interés para su utilización como diana terapéutica para tratar AD (Vassar, 2004).

A pesar de que parecía seguro inactivar la actividad de BACE1, han sido caracterizados otros sustratos fisiológicos naturales de esta proteasa que podrían generar efectos colaterales no deseados si no fueran procesados por haber inhibido la actividad de BACE1. En el estudio de ratones knockout de BACE1 se mostró que son viables, fértiles y que no presentan déficits graves a nivel comportamental, morfológico o de desarrollo (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001), aunque muestran diversas anomalías en la neurofisiología, incluyendo fallos en el desarrollo de los nervios periféricos, comportamientos alterados y mayor sensibilidad al dolor (Harrison et al., 2003).

- **$\gamma$ -secretasa:**

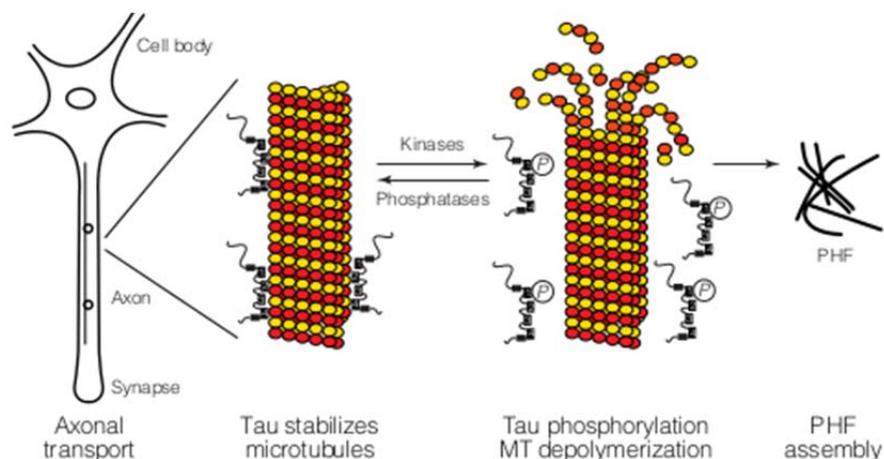
La liberación de A $\beta$  a partir de su precursor APP está mediada en última instancia por la  $\gamma$ -secretasa, y se realiza en su dominio transmembrana. La  $\gamma$ -secretasa es un complejo con actividad proteasa que consta de cuatro subunidades necesarias para que el complejo tenga actividad (Edbauer et al., 2003; Steiner et al., 2008), aunque las más importantes son las presenilinas (Wolfe et al., 1999).

El procesamiento de APP por la  $\gamma$ -secretasa no está restringido a un único lugar de escisión, y el último corte puede ocurrir en condiciones fisiológicas entre los aminoácidos 37 y 43 del dominio A $\beta$ . Esta diferencia en los aminoácidos de escisión es de gran importancia en la patología de AD, ya que se generan dos tipos de procesamiento secuencial que llevan a la generación principalmente de A $\beta$ 40 o de A $\beta$ 42. Las formas de A $\beta$  de 42 aminoácidos agregan mucho más, y parecen ser las responsables de la generación de oligómeros, los cuales afectan a la memoria y a la viabilidad celular (Haass and Selkoe, 2007). Actualmente se está investigando para poder modular terapéuticamente las escisiones y así prevenir la producción selectiva de A $\beta$ 42 (Schenk et al., 2012).

## **7. Fosforilación de tau**

La proteína tau es una proteína importante del citoesqueleto de las neuronas que se encarga de la estabilización de los microtúbulos axonales a través de la interacción con la tubulina. Durante el desarrollo de AD, la proteína tau padece modificaciones y comienza a fosforilarse por múltiples sitios y a agregarse en forma de NFT, de manera que se altera su función biológica (Delacourte and Defossez, 1986). Las neuronas afectadas por NFT presentan microtúbulos anormales (Gray et al., 1987) y una disminución de la tubulina estable (Hempen and Brion, 1996), lo que desencadena en una pérdida de la capacidad de mantener el transporte axonal y en una disminución de las conexiones sinápticas de las

neuronas (Alonso et al., 2001; Baas, 2013). Los NFT son formaciones intracelulares secundarias a la hiperfosforilación anormal de tau formando filamentos helicoidales apareados asociados a ubiquitina (Wang et al., 2007). Algunos NFT son ubiquitinados (Perry et al., 1987) y la muerte neuronal parece ser el punto final a la degeneración neurofibrilar (Cras et al., 1995).



**Imagen 7.** Agregación de tau hiperfosforilada en ovillos neurofibrilares. <http://neurowiki2014.wikidot.com>

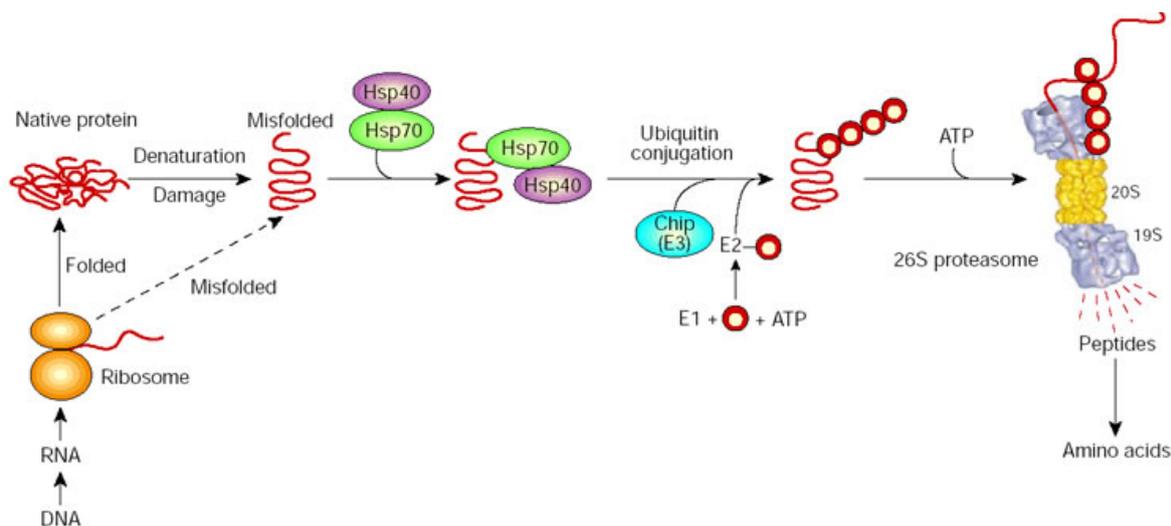
## 8. Proteostasis

Uno de los cambios moleculares del envejecimiento que probablemente más contribuye al desarrollo de la patología de AD, es la deficiencia en los mecanismos de control celular que degradan las proteínas anormales o mal plegadas. Estos mecanismos incluyen el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, del inglés *ubiquitin-proteasome system*), la autofagia y las chaperonas moleculares. Evidencias crecientes postulan alteraciones funcionales de UPS y sus componentes moleculares como causantes de cambios tempranos en la patología AD (Gadhavé et al., 2016).

El reciclaje de las proteínas defectivas derivadas de acúmulos de A $\beta$  y p-tau se lleva a cabo principalmente mediante el UPS (Hershko and Ciechanover, 1998; Ciechanover and Kwon, 2015), aunque el péptido A $\beta$  también puede ser degradado de manera independiente mediante la enzima neprilisina (Leissring and Turner, 2013) y la enzima degradadora de insulina (IDE, del inglés *insulin-degrading enzyme*) (Qiu et al., 1998).

El proceso de degradación de proteínas aberrantes mediante el UPS está involucrado en muchos mecanismos celulares tales como la plasticidad neuronal y la memoria (Fonseca et al., 2006; Karpova et al., 2006). Esta vía de reciclaje utiliza una cascada enzimática que consiste en la unión de varias moléculas de ubiquitina a la proteína aberrante. Las enzimas E1 se encargan de la activación de la ubiquitina, mientras que las enzimas E2 transfieren la

ubiquitina ya activada hacia las enzimas de ligación E3. La poliubiquitinación marca a la proteína aberrante y la conduce hacia el complejo proteasoma 26S para su posterior degradación proteolítica (Hershko and Ciechanover, 1998; Petrucelli et al., 2004). El proteasoma 26S puede localizarse en el núcleo o en el citoplasma y está conformado por el núcleo catalítico 20S y dos unidades regulatorias 19S. El complejo 20S está compuesto por cuatro anillos, formados a su vez de varias proteínas, las subunidades estructurales  $\alpha$  y las catalíticas  $\beta$  (Groll et al., 1997; DeMartino and Slaughter, 1999). El complejo 19S está situado en los extremos del complejo 20S y se encarga de abrir el anillo  $\alpha$  del 20S, y a desplegar las moléculas para que puedan ser introducidas dentro del compartimento catalítico. Durante este proceso, la proteína de choque térmico 70 (Hsp70, del inglés *heat shock protein 70*) actúa como chaperona y facilita la ubiquitinación de las proteínas mediante la interacción con la proteína CHIP (del inglés *carboxyl-terminus of Hsp70 interacting protein*) y la ligasa E3 (Westerheide et al., 2009). La degradación de proteínas anormales por autofagia tiene lugar en respuesta a condiciones de estrés celular mediante el sistema endosomal/lisosomal. Alteraciones de la autofagia en neuronas afectadas por la patología AD contribuyen a la muerte neuronal (Zare-Shahabadi et al., 2015).



**Imagen 8.** La vía ubiquitina-proteasoma. Los círculos rojos que representan la ubiquitina (Goldberg, 2003).

## 9. Neuroinflamación

La inflamación es una respuesta protectora del organismo utilizada para eliminar la causa inicial de una lesión celular. Si la lesión no se restablece, la respuesta inflamatoria se convierte en una condición crónica, por lo que el daño causado tiende a acumularse lentamente, incluso de forma asintomática durante años, conduciendo hacia un deterioro severo del tejido (Tuppo and Arias, 2005; Heneka and O'Banion, 2007).

La inflamación crónica es un mecanismo biológico común del envejecimiento que se ha relacionado con el inicio y la evolución de enfermedades relacionadas con la edad (Yu and Chung, 2006; Chung et al., 2009). Se ha sugerido que el proceso inflamatorio cerebral, conocido como neuroinflamación, desarrolla un papel fundamental en la patología AD (Holmes, 2013). La neuroinflamación se produce en las regiones patológicamente vulnerables a AD (Akiyama et al., 2000), con una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , del inglés *tumor necrosis factor alpha*), la interleuquina (IL) 6 e IL-1 $\beta$ , que son apenas detectables en el cerebro sano (Cacquevel et al., 2004; Vasto et al., 2007). Los depósitos de A $\beta$  y los ovillos neurofibrilares inician en el cerebro una respuesta inflamatoria crónica mediante la activación de microglía y astrocitos, de manera que se promueve la liberación de mediadores inflamatorios (Calsolaro and Edison, 2016). Los mediadores inflamatorios y las condiciones de estrés, a su vez, aumentan la producción de A $\beta$  e inhiben la formación de la fracción sAPP $\alpha$  que tiene un efecto protector neuronal. La activación crónica de la microglía puede dañar a neuronas adyacentes liberando productos tóxicos como especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Además, esta respuesta inflamatoria puede obstaculizar la activación de la microglía para fagocitar el péptido A $\beta$ , lo que provoca su acumulación y agregación en forma de placas amiloides. Por otra parte, A $\beta$  induce la expresión de citoquinas proinflamatorias en las células gliales de manera que se genera un círculo vicioso. Varias evidencias sugieren que todos estos factores pueden contribuir a la disfunción sináptica y a la muerte neuronal (Brown and Bal-Price, 2003).

Las citoquinas desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio y antiinflamatorio. Un factor importante en el inicio del proceso inflamatorio es la sobreexpresión de la IL-1, la cual induce a muchas reacciones que causan disfunción y muerte neuronal. Otras citoquinas importantes en la neuroinflamación son la IL-6 y el TNF- $\alpha$ . Por el contrario, IL-4 e IL-10 pueden suprimir tanto la producción de citoquinas proinflamatorias como su acción, protegiendo consecuentemente al cerebro (Wyss-Coray, 2006).

En los procesos inflamatorios participan además otros mediadores que desencadenan las diferentes reacciones suscitadas. En todos los casos se trata de pequeñas moléculas que actúan sobre receptores específicos de la membrana plasmática. Entre ellos podemos destacar Gas6 (del inglés, *growth-arrest-specific gene 6*) debido a su reciente implicación en la neuroinflamación de AD. Gas6 es un factor de crecimiento secretado dependiente de vitamina K que interactúa con los receptores de tirosina quinasa de la familia TAM (Bellido-Martin and de Frutos, 2008). A través de estas interacciones, Gas6 es capaz de regular la

respuesta inflamatoria, proporcionar plasticidad a los tejidos durante la recuperación del daño, proteger a las neuronas de la apoptosis, y además tiene funciones neurotróficas.

Gas6 juega un papel importante en AD (Yagami et al., 2002; Sainaghi et al., 2016), y su aumento puede ser parte de una reacción compensatoria dirigida a la regulación de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, favoreciendo el aclaramiento amiloide y promoviendo una respuesta regenerativa.

## **10. El cerebro**

El cerebro es un órgano muy complejo de consistencia gelatinosa que está protegido por el cráneo y que procesa información sensorial a la vez que coordina y mantiene las funciones vitales del organismo. Hasta un billón neuronas trabajan unidas a través de impulsos eléctricos para coordinar las actividades físicas y los procesos mentales que distinguen al ser humano de otras especies (Cosgrove et al., 2007).

Aunque el cerebro de ratón es casi diez veces más pequeño que el del humano, existen muchas similitudes, como la simetría bilateral y una suficiente complejidad para presentar el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. También pueden observarse algunas diferencias obvias, como las numerosas hendiduras de la superficie del cerebro humano que son el resultado del plegamiento de la corteza cerebral por mayor proliferación neuronal. Sin embargo, es innegable que las similitudes que se observan apoyan el hecho de que se recurra al ratón como modelo de estudio neurobiológico, pudiéndose extrapolar parcialmente los resultados obtenidos a partir de éstos.

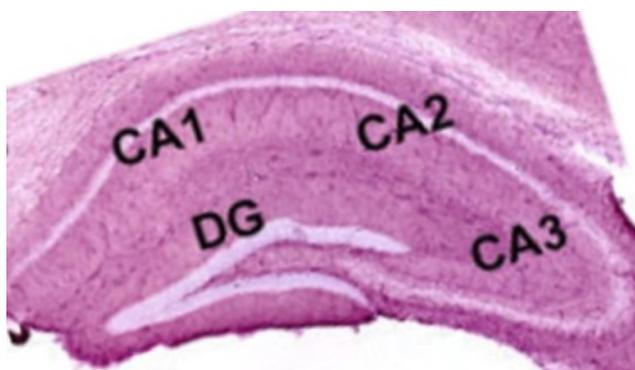
### **a) Hipocampo de ratón**

El hipocampo es una de las principales estructuras del cerebro, ya que desempeña un papel crucial en la adquisición del aprendizaje y la consolidación de la memoria (Wallenstein et al., 1998). Forma parte del sistema límbico, un conjunto de estructuras cerebrales que gestionan respuestas fisiológicas primitivas. Es de color amarillento claro, debido a que está cubierto por una capa de sustancia blanca llamada álveo, que corresponde a los axones de las células piramidales.

Anatómicamente, el hipocampo está organizado en varios subcampos; el cuerno de Amón (CA), el giro dentado (GD), el subiculum y la corteza entorrinal (CE) (Amaral and Witter, 1989; O'Mara, 2005). El cuerno de Amón está dividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3. El GD contiene la fascia dentata y el hilio. Al observar una sección transversal, el hipocampo aparece como una estructura en forma de C que se asemeja al cuerno de un carnero.

Al padecer AD, el hipocampo es una de las primeras regiones del cerebro en sufrir daño (Hyman et al., 1984; Mu and Gage, 2011), apareciendo como primeros síntomas los problemas de memoria y desorientación (Apostolova et al., 2015).

Experimentos con ratas han mostrado que las lesiones hipocampales afectan negativamente a la adquisición y retención del aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (Morris, 1984; Laursen et al., 2014). Por otra parte, se ha visto que la inyección de A $\beta$  en el hipocampo puede desencadenar en un déficit en la transmisión sináptica y la plasticidad (Stephan et al., 2001) y producir disfunción neuronal (Koudinov and Koudinova, 2001). El número de sinapsis neuronales y la transmisión de señales disminuyen considerablemente durante el envejecimiento (Scheff and Price, 1993) y a medida que avanza la patología de AD (Gonatas et al., 1967).



**Imagen 9.** Áreas hipocampales CA1, CA2, CA3, y el GD en el cerebro de ratón (Osterweil et al., 2005).

El hipocampo tiene una estructura laminar de tres capas:

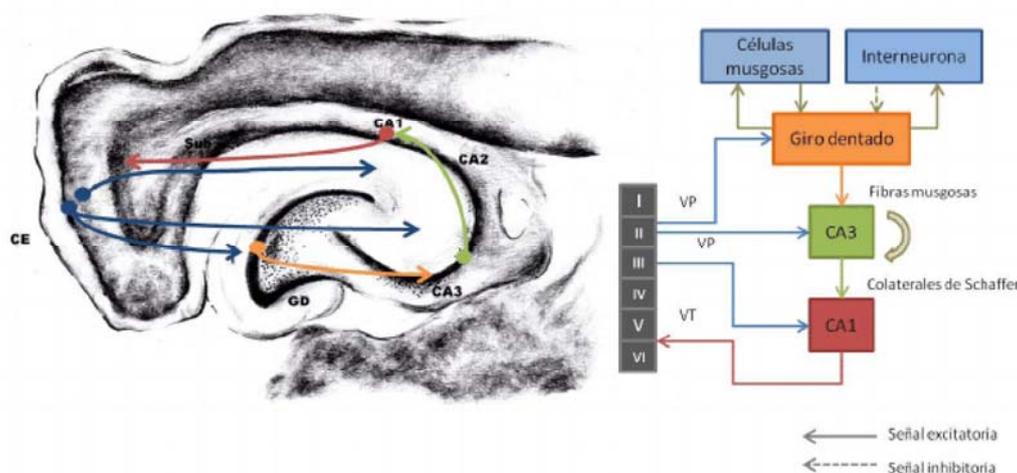
- **Capa oriens:** Zona más superficial y está constituida por las dendritas basales de las neuronas piramidales y por neuronas intrínsecas en las que sus axones se arborizan en forma de canasto alrededor de las neuronas piramidales del segundo estrato.
- **Capa piramidal:** Contiene los cuerpos celulares de las neuronas piramidales, que son las principales neuronas excitadoras del hipocampo. Está formado por el estrato radiatum, en el que se encuentran las dendritas apicales de las neuronas piramidales, y por el estrato piramidal, en los cuales se encuentran las neuronas piramidales y que se divide en los campos CA1, CA2 y CA3.
- **Capa molecular:** Estrato más superficial del hipocampo que está formado por dos capas de fibras compuestas de dendritas de células granulares; el estrato lacunosum, compuesto por la parte más distal las dendritas de las neuronas piramidales y por la capa de las fibras tangenciales.

## b) Conexiones hipocampales

La información procesada mediante el circuito trisináptico (Kim et al., 2012) permite relacionar diferentes aferencias sensoriales gracias a que las células piramidales del hipocampo tienen un alto grado de interconexión, facilitando las relaciones entre las diferentes entradas de información (Zhang et al., 2014).

La información fluye a lo largo del hipocampo por medio de las siguientes vías:

- **Vía perforante:** Circula desde la corteza entorrinal del giro parahipocampal hasta las células granulares del GD (Witter et al., 2000; Lavenex et al., 2004).
- **Vía de las fibras musgosas:** Va desde los axones de las células granulares del GD hacia las dendritas proximales de las neuronas piramidales de la región CA3, atravesando el hilus (Chicurel and Harris, 1992; Suzuki and Amaral, 2003).
- **Vía colateral de Schaffer:** Proyecta desde las neuronas piramidales de la región CA3 hacia las dendritas de las neuronas piramidales de la región CA1 (Laurberg and Sorensen, 1981; Ishizuka et al., 1990).



**Imagen 10.** Esquema de los circuitos en el hipocampo. La flecha azul describe la vía perforante, la naranja la vía de fibras musgosas, la verde para colaterales de Schaffer y la roja para proyecciones de CA1 a la corteza entorrinal (Olivares et al., 2015).

## 11. Sirtuinas

Las sirtuinas, nombre que proviene de las siglas Sir2 (del inglés *silent mating type information regulation two*), fueron identificadas en primer lugar en levaduras como factores de silenciamiento genético (Baur and Sinclair, 2006). Dicho silenciamiento requería la eliminación de los grupos acetilo de ciertos residuos de lisinas en las histonas H3 y H4, lo que sugería que Sir2 podía funcionar como una desacetilasa de histonas y que dependía del

sustrato  $\text{NAD}^+$  (del inglés *nicotine adenine dinucleotide*) para llevar a cabo su actividad enzimática (Imai and Guarente, 2010).  $\text{NAD}^+$  es un cofactor importante para la cadena de transporte de electrones y también está implicado en muchas reacciones enzimáticas (Houtkooper et al., 2010).

Actualmente las sirtuinas se definen como proteínas desacetilasas de histonas de clase III que catalizan la desacetilación de proteínas clave a través del consumo de  $\text{NAD}^+$  (Guarente, 2005; Herskovits and Guarente, 2014). La desacetilación de histonas promueve una descompactación de las regiones de cromatina, permitiendo la accesibilidad de la actividad transcripcional a las regiones promotoras de los genes y por lo tanto, su expresión. Además del silenciamiento de genes, estas proteínas cumplen funciones como la regulación metabólica y son claves en los procesos de envejecimiento. Se ha observado que la sobreexpresión de Sir2 en *C.elegans* (Tissenbaum and Guarente, 2001) y en *D.melanogaster* (Rogina and Helfand, 2004) proporciona un incremento de la longevidad.

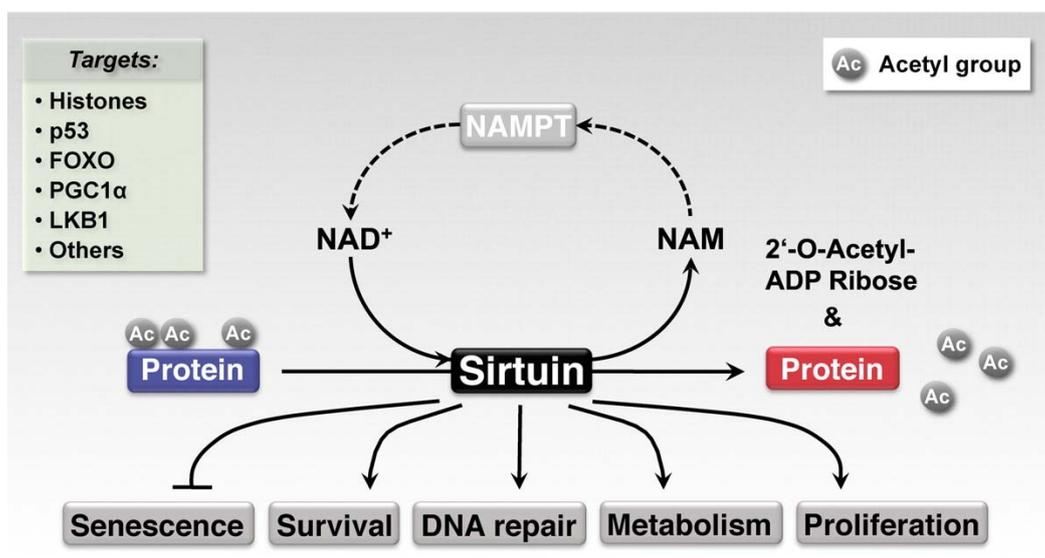


Imagen 11. Reacción desacetilasa catalizada por sirtuina dependiente de  $\text{NAD}^+$  (Oellerich and Potente, 2012).

### a) Clasificación de las sirtuinas

Las sirtuinas son proteínas bien conservadas a lo largo de la evolución y se han descrito homólogos en organismos que van desde las bacterias hasta los humanos (Imai et al., 2000). En mamíferos se expresan 7 isotipos diferentes (SIRT 1-7) con diferentes localizaciones a nivel celular y distintas actividades enzimáticas (Tabla 1) (Lalla and Donmez, 2013; Kupis et al., 2016). De todas ellas, SIRT1 es el homólogo más cercano al gen Sir2, por lo que la mayoría de los esfuerzos encaminados a profundizar en el conocimiento de las funciones de las sirtuinas se han centrado en SIRT1 (Haigis and Sinclair, 2010).

	Enzymatic activity	Sub-cellular localization	Effects on AD	Targets related to AD
SIRT1	Deacetylase	Nuclear, cytoplasmic	Neuroprotective (Chen et al., 2005; Qin et al., 2006b; Kim et al., 2007; Julien et al., 2009; Donmez et al., 2010; Min et al., 2010)	RAR $\beta$ , Tau, PGC1 $\alpha$ , LXR, NF $\kappa$ B
SIRT2	Deacetylase	Cytoplasmic, nuclear	Genetic association (Polito et al., 2012)	Unknown
SIRT3	Deacetylase	Mitochondrial	Genetic association (Weir et al., 2012)	Unknown
SIRT4	Deacetylase ADP-ribosyltransferase	Mitochondrial	Unknown	Unknown
SIRT5	Deacetylase Demalonylase Desuccinylase	Mitochondrial	Unknown	Unknown
SIRT6	ADP-ribosyltransferase Deacetylase	Nuclear	Unknown	Unknown
SIRT7	Deacetylase	Nucleolar	Unknown	Unknown

**Tabla 1.** Actividad enzimática, localización y efectos de las sirtuinas de mamíferos (Lalla and Donmez, 2013).

## 12. Sirtuina 1

Actualmente se están invirtiendo muchos esfuerzos en la búsqueda de una terapia eficaz contra AD (Parsons et al., 2013). Una vía importante puede ser la relacionada con la proteína SIRT1, una desacetilasa miembro de la familia de las sirtuinas (Bosch-Presegue and Vaquero, 2015) relacionada con la longevidad (Sato et al., 2013) y que induce efectos neuroprotectores contra la patología AD a través de la regulación de la acetilación de proteínas clave (Donmez, 2012; Paraiso et al., 2013; Hubbard and Sinclair, 2014; Corpas et al., 2016; Jesko et al., 2016).

SIRT1 es una proteína de localización nuclear (Michishita et al., 2005), sin embargo puede translocar al citoplasma durante la diferenciación neuronal, el crecimiento de neuritas y la apoptosis. Principalmente, SIRT1 cataliza la desacetilación de histonas y varios factores de transcripción a través del consumo del sustrato NAD<sup>+</sup> (Herskovits and Guarente, 2014). SIRT1 es además capaz de desacetilar un gran número de sustratos como p53, PGC-1 $\alpha$  (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) o FOXO (del inglés *forkhead box protein O*), importantes en la regulación y el control de procesos como el cáncer (Herranz et al., 2010), la reparación del DNA (Cohen et al., 2004), la apoptosis (Hasegawa and Yoshikawa, 2008), la inflamación (Yeung et al., 2004), el estrés oxidativo (Brunet et al., 2004) y el metabolismo (Hubbard et al., 2013).

En cuanto AD, SIRT1 desacetila el receptor  $\beta$  de ácido retinoico (RAR $\beta$ , del inglés *retinoic acid receptor beta*), un activador de ADAM10 que resulta en la reducción de la producción de A $\beta$  a través de la activación de la vía no amiloidogénica (Lee et al., 2014; Saffig and

Lichtenthaler, 2015). SIRT1 también puede prevenir la formación de NFT a través de la desacetilación de la proteína tau, induciendo de ese modo su degradación a través del proteasoma (Min et al., 2010). Además, SIRT1 muestra efectos neuroprotectores mediante la inhibición de la disfunción mitocondrial a través de la desacetilación y activación de PGC-1 $\alpha$  (Rodgers et al., 2005), de manera que SIRT1 actúa a modo de sensor de la disponibilidad de nutrientes. SIRT1 también muestra neuroprotección mediante la prevención de la inflamación a través de la activación del receptor X de hígado (LXR, del inglés *liver X receptor*) o mediante la inhibición de NF- $\kappa$ B (del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Gan and Mucke, 2008).

SIRT1 está expresada en el cerebro adulto (Ramadori et al., 2008), con altos niveles en la corteza, el cerebelo, el hipotálamo y sobretodo en las neuronas del hipocampo (Sakamoto et al., 2004), aunque su expresión se ve disminuida en las regiones del cerebro afectadas por AD (Lutz et al., 2014).

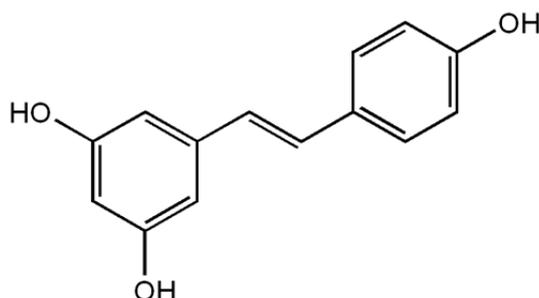
Respecto al aprendizaje, la memoria y la plasticidad sináptica, se ha demostrado que la ausencia de SIRT1 empeora las habilidades cognitivas asociadas a los efectos en la plasticidad sináptica (Michan et al., 2010). En el hipocampo de los ratones 3xTg-AD modelo de Alzheimer se observa una disminución de SIRT1 (Marques et al., 2012; Revilla et al., 2014a). Por otra parte, la sobreexpresión de SIRT1 en el hipocampo de ratones p25 modelo de AD y tauopatías confiere neuroprotección significativa (Kim et al., 2007), y la sobreexpresión de SIRT1 en cultivos de neuronas de ratones Tg2576 induce una reducción de la secreción de A $\beta$  (Qin et al., 2008).

SIRT1 puede llegar a ser modulada mediante diferentes terapias, tales como el ejercicio físico (Cox et al., 2016) y la restricción calórica (Quintas et al., 2012) o mediante activadores como son el resveratrol (Porquet et al., 2014; Witte et al., 2014) y la melatonina (Tajes et al., 2009; Mukda et al., 2016).

### **13. Resveratrol**

El resveratrol (3,4',5,-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural presente en numerosas especies vegetales que se produce como defensa a lesiones físicas, infecciones por patógenos, deficiencias nutricionales, fluctuaciones de temperatura, o a radiación ultravioleta (Fremont, 2000). Las principales fuentes de resveratrol en la dieta son el vino tinto, la uva roja (sobre todo la piel), la granada, la soja, las frambuesas, los arándanos, los cacahuets y el cacao (Allard et al., 2009).

El resveratrol está formado por dos anillos aromáticos unidos por un puente metileno y presenta dos isómeros geométricos: el *trans*-, que es el biológicamente activo, y el *cis*-, que es inestable (Catalgol et al., 2012). La exposición a la luz favorece la transformación del isómero *trans* en *cis*, lo que conlleva una pérdida de estabilidad y de actividad biológica (Harikumar and Aggarwal, 2008).



**Imagen 12.** Estructura química del resveratrol.

Respecto a las propiedades físico-químicas, el resveratrol es un polvo blanco con fórmula molecular  $C_{14}H_{12}O_3$ , peso molecular de 228.25 g/mol y un punto de fusión de 253-255°C. Es un compuesto soluble en lípidos, etanol y DMSO, pero prácticamente insoluble en agua. Se caracteriza por una alta permeabilidad y baja solubilidad, lo que hace que sea bien absorbido en el intestino.

En términos de toxicidad y seguridad, la información disponible es limitada. Una dosis oral de 300 mg/kg no tiene efectos tóxicos en ratas, sin embargo, una dosis de 1 g/kg comienza a tener efectos adversos como deshidratación y pérdida de peso. Una dosis de 3 g/kg comienza a tener una alta toxicidad, produciendo daño hepático, daño renal y anemia (Crowell et al., 2004). Una dosis de 18 g/kg es letal en la mayoría de los animales estudiados. En humanos, dosis de hasta 10 g de resveratrol son bien toleradas (Knutson and Leeuwenburgh, 2008).

Al resveratrol se le atribuyen propiedades beneficiosas sobre la salud y se especula con que es el responsable de la paradoja francesa, que hace referencia a la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares que se dan en la población francesa a pesar del consumo de una dieta alta en grasas saturadas que sería compensada por el consumo de vino (Vidavalur et al., 2006; Sun et al., 2010). Desde entonces, el resveratrol ha sido ampliamente estudiado y se ha demostrado que tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiproliferativas y antiangiogénicas (Baur and Sinclair, 2006). Además, se ha observado que el resveratrol aumenta la resistencia al estrés y que mejora diversos marcadores de envejecimiento, por lo que produce un incremento de la longevidad (Howitz et al., 2003; Viswanathan et al., 2005; Porquet et al., 2013).

Existe controversia acerca de si el resveratrol puede ser un activador directo de SIRT1 (Borra et al., 2005) o si se activa indirectamente mediante otras vías (Behar et al., 2009; Villalba and Alcain, 2012; Bitterman and Chung, 2015). Otros estudios muestran que el resveratrol incrementa la actividad AMPK (del inglés *adenosine monophosphate-activated protein kinase*), lo que genera un aumento de  $\text{NAD}^+$  que resulta en un incremento de la actividad de SIRT1 (Park et al., 2012; Price et al., 2012). En ratones, se ha demostrado que el resveratrol provoca una activación de SIRT1 y de su diana PGC-1 $\alpha$ , lo que produce cambios beneficiosos en la función mitocondrial (Lagouge et al., 2006; Canto and Auwerx, 2009).

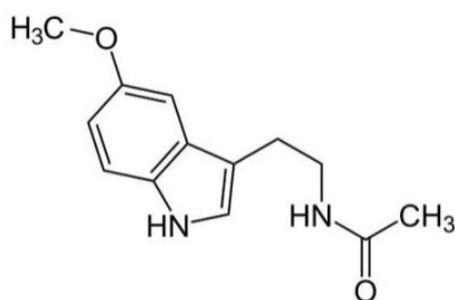
La hipótesis del mecanismo más ampliamente aceptada es que el resveratrol imita los efectos antioxidantes y antienvjecimiento de la restricción calórica (Barger et al., 2008; Albani et al., 2009), y que son realizados mediante la regulación de SIRT1 (Chung et al., 2011). Un hecho que refuerza esta afirmación es que otros activadores de SIRT1 como el SRT501 y el SRT1720 producen efectos similares a la restricción calórica y activan las mismas vías de señalización (Smith et al., 2009; Dai et al., 2010).

La restricción calórica es un régimen alimentario caracterizado por una moderada reducción en el porcentaje calórico, pero sin llegar a la malnutrición. Tiene efectos beneficiosos sobre la salud de los mamíferos, aumentando la esperanza de vida y retrasando la aparición de enfermedades asociadas al envejecimiento como el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Bordone and Guarente, 2005; Colman et al., 2009).

Las primeras evidencias científicas de que una disminución en la ingesta calórica podría aumentar la longevidad datan de hace 75 años, cuando se observó que al alimentar ratas con un 20% de celulosa en la comida (no la pueden digerir), aumentaban de forma significativa tanto la vida media como la vida máxima. En la actualidad, hay numerosas teorías que intentan explicar los efectos de la restricción calórica; la inhibición de la ruta de los glucocorticoides, la disminución en los depósitos de grasa, la disminución en la generación de ROS, una mayor supervivencia celular, una mejora en la proteostasis, la obtención de menores niveles de insulina y glucosa en sangre u otros cambios endocrinos adicionales. Al combinar resveratrol con restricción calórica no se observan efectos aditivos, lo que sugiere que el resveratrol es capaz de activar SIRT1, y que SIRT1 es responsable de mediar los efectos de la restricción calórica sobre la longevidad de los organismos.

## 14. Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona producida principalmente en la glándula pineal a la que se le atribuyen diversas propiedades beneficiosas sobre la salud (Axelrod, 1974; Reiter, 1991), como la regulación de los ritmos circadianos, la mejora de la respuesta inmunitaria y la de potente antioxidante que podría tener un importante efecto antienviejimiento (Tan et al., 1993; Leon et al., 2004; Anisimov et al., 2006; Zhou et al., 2008; Reiter et al., 2016). La melatonina también activa las sirtuinas, además de poseer propiedades antiinflamatorias (Ramis et al., 2015). Otros órganos y tejidos como retina, intestinos, ovarios, testículos, linfocitos y médula ósea también producen melatonina (Hardeland et al., 2011; Acuna-Castroviejo et al., 2014).



**Imagen 13.** Estructura química de la melatonina.

La síntesis y liberación de melatonina es estimulada por la oscuridad e inhibida por la luz, de modo que en el ser humano, el aumento de la secreción de melatonina se produce poco después del comienzo de la oscuridad, alcanzando el pico máximo hacia la mitad de la noche (entre las 2 y las 4 horas a.m.) y descendiendo gradualmente durante la segunda mitad de la noche. La biosíntesis de la melatonina se inicia a partir del aminoácido esencial triptófano, que es convertido a 5-hidroxitriptófano mediante el enzima triptófano hidrolasa y posteriormente es decarboxilado a serotonina. La serotonina es catalizada por las enzimas N-acetiltransferasa e hidroxindol-O-metiltransferasa, ambas limitadas en gran parte a la glándula pineal. Una vez formada en la glándula pineal, la melatonina es liberada a los capilares y al líquido cerebroespinal para poder llegar a todos los tejidos del organismo en un corto período de tiempo (Cardinali and Pevet, 1998; Macchi and Bruce, 2004).

La cantidad de melatonina que llega a los tejidos puede ser diferente. Por ejemplo, los niveles de melatonina liberados al líquido cerebroespinal son de 5 a 10 veces mayores que los de la sangre, medidos simultáneamente (Tricoire et al., 2002) y también se ha visto que el tejido cerebral puede tener mayores niveles de melatonina que otros tejidos corporales (Reiter and Tan, 2002). La melatonina plasmática tiene una vida media de unos 30 minutos, se metaboliza principalmente en el hígado y el 95% se elimina por la orina en forma de 6-

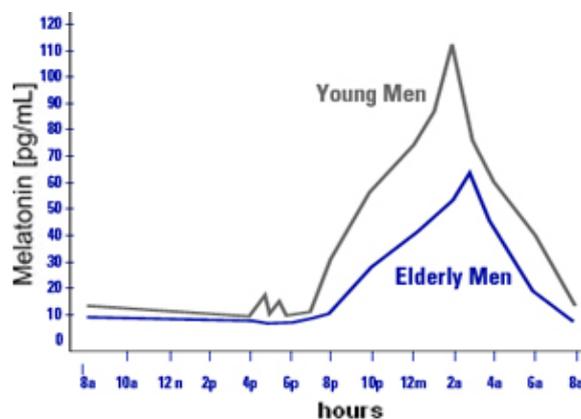
sulfatoximelatonina. En plasma, el 70% de la melatonina va unida a albúmina, mientras que el 30% restante va libre y pasa a la saliva (Yeleswaram et al., 1997).

La melatonina posee dos propiedades principales, su solubilidad (en agua y en lípidos) que le permite una fácil distribución en las células y su habilidad de atravesar la barrera hematoencefálica para entrar en las neuronas y en la glía, lo que permite que pueda interactuar con una gran variedad de proteínas y receptores (Reiter, 1995).

En humanos la producción y secreción rítmica de melatonina se mantiene hasta la pubertad, cuando disminuye de manera notable, para estabilizarse de nuevo a los 35-40 años. Hacia los 55-65 años la producción de melatonina decae abruptamente, por lo que la amplitud del pico nocturno de melatonina no se detecta correctamente y condiciona la pérdida de su capacidad reguladora (Reiter, 1995).

Numerosos estudios han mostrado que la producción de melatonina disminuye durante los procesos de envejecimiento y apuntan a que los graves trastornos del ritmo sueño/vigilia que padecen los pacientes con AD son debidos a una irregularidad en la secreción de melatonina (Mishima et al., 1999). El envejecimiento está directamente relacionado con la disminución de la producción de melatonina (Touitou, 2001), por lo tanto, la disminución de los niveles de melatonina son un factor que puede contribuir a la disminución cognitiva relacionada con la edad y al aumento del riesgo de padecer AD (Nair et al., 1986).

Es por este motivo que clínicamente la melatonina ha sido utilizada para inducir el sueño, considerándose bien tolerada y segura, con dosis diarias entre los 0.1 a 1000 mg (Holliman and Chyka, 1997). La suplementación con melatonina ha sido sugerida en los pacientes con AD para mejorar el ritmo circadiano, disminuyendo la conducta agitada y la confusión, y también para producir mejoras en la memoria (Cardinali et al., 2002). Hasta el momento no ha sido publicado ningún efecto secundario de importancia o que conlleve riesgo asociado a su administración.



**Imagen 14.** Cambios en la amplitud del ritmo circadiano de melatonina con la edad (Nair et al., 1986).

### **15. Activación de SIRT1 como terapia anti-Alzheimer**

La modulación farmacológica de SIRT1 puede proporcionar una estrategia terapéutica prometedora para proteger contra el deterioro de las funciones biológicas y así reducir el riesgo de muchas enfermedades relacionadas con la edad. El uso tanto de melatonina como de resveratrol ha mostrado que ambos agentes tienen efectos neuroprotectores en diversos sistemas experimentales y que el mecanismo implicado incluye la activación de la proteína SIRT1 (Cristofol et al., 2012).

En modelos de ratones transgénicos de AD no existen estudios previos de sobreexpresión de SIRT1 que analicen una posible protección contra la pérdida cognitiva. Sólo se han estudiado algunos aspectos de neuroprotección en el modelo de taupatía de ratón transgénico de p25 (Kim et al., 2007). La demostración de efectos beneficiosos sobre el aprendizaje y la memoria y el conocimiento de los mecanismos implicados podría ser una base para el desarrollo de nuevos fármacos contra AD.

Se han publicados diversos estudios sobre los efectos neuroprotectores de resveratrol y melatonina en modelos de ratón transgénicos de AD (Garcia-Mesa et al., 2012; Porquet et al., 2014). La demostración de los efectos beneficiosos de suplementar la dieta con resveratrol o melatonina (Ramis et al., 2015) sugiere el interés de profundizar en los mecanismos implicados para el desarrollo de terapias preventivas o coadyuvantes contra AD.



# **OBJETIVOS**



El **objetivo general** de esta tesis es definir la vía de neuroprotección y longevidad de SIRT1 como diana terapéutica para prevenir los procesos neurodegenerativos asociados a la edad y así conseguir un envejecimiento saludable. Los estudios se han centrado en AD como principal causa de demencia a la edad avanzada.

La tesis se estructura en cuatro estudios que corresponden a los **objetivos específicos** siguientes:

- 1) Demostrar que la sobreexpresión de SIRT1 mediante la inyección de un vector lentiviral en el hipocampo de ratones 3xTg-AD protege de la pérdida cognitiva y la patología AD en este modelo animal de AD.
- 2) Investigar los mecanismos implicados en la neuroprotección inducida por SIRT1 mediante el análisis de cultivos neuronales de ratones 3xTg-AD transducidos con lenti-SIRT1.
- 3) Evaluar la acción neuroprotectora del tratamiento con resveratrol en ratones 3xTg-AD y demostrar que este tratamiento farmacológico intensifica la actividad de SIRT1.
- 4) Evaluar la acción neuroprotectora del tratamiento con melatonina en ratones 3xTg-AD y demostrar que este tratamiento farmacológico intensifica la actividad de SIRT1.



# **METODOLOGÍA**



## 1. Ratones modelo de Alzheimer 3xTg-AD

Los ratones 3xTg-AD expresan transgenes con mutaciones de AD familiar de la APP (APPSwe) y la presenilina 1 (PS1M146V), y una mutación del gen tau (tauP301L) (Oddo et al., 2003). Este modelo imita muchas de las características críticas de AD, incluyendo las patologías A $\beta$  y tau, el deterioro del aprendizaje y la memoria, alteraciones del comportamiento asociadas a demencia (BPSD, del inglés *behavioural and psychological symptoms of dementia*) y estrés oxidativo (Garcia-Mesa et al., 2011; Garcia-Mesa et al., 2015). Los ratones de la cepa control NoTg-AD tienen el mismo fondo genético híbrido (129  $\times$  C57BL/6) que los 3xTg-AD.

Los ratones 3xTg-AD reproducen el curso temporal y las áreas afectadas por patología amiloide y tau (Mastrangelo and Bowers, 2008) de la neuropatología AD. A los 2-3 meses de edad se inicia la alteración de la homeostasis neuronal. A los 3-4 meses se aprecia la inmunoreactividad frente a los depósitos de A $\beta$  intracelulares en las áreas vulnerables cerebrales de hipocampo, amígdala, córtex entorrinal y córtex primario motor. A los 6 meses se aprecia un aumento intracelular de la proteína p-tau en amígdala e hipocampo. A los 9-12 meses, edad en la que la patología A $\beta$  está bien instaurada, se observa p-tau en todas las zonas vulnerables. Finalmente a los 18 meses se observan depósitos extracelulares de A $\beta$  y los NFT.

Para los diversos estudios realizados se utilizaron ratones macho 3xTg-AD y NoTg-AD criados en el estabulario de la Universidad de Barcelona (UB). La primeras parejas de reproductores procedían de la colonia de 3xTg-AD establecida en la Universidad Autónoma de Barcelona (Gimenez-Llort et al., 2007). Ambas cepas se crían en homocigosis. Los genotipos fueron confirmados mediante el análisis de PCR del DNA obtenido de biopsias de la cola. Para el estudio con vectores lentivirales, los animales se alojaron individualmente en jaulas con filtros, cumpliendo con los requisitos de seguridad de nivel 2. Para el resto de experimentos, los animales se alojaron en grupos de 2-4 ratones en jaulas Makrolon de dimensiones adecuadas y bajo condiciones estándar de laboratorio, comida y agua ad libitum, 22  $\pm$  2 °C, y 12h:12h ciclo luz-oscuridad.

El comité de ética animal aprobó el manejo y los procedimientos de experimentación animal de acuerdo con la legislación española y la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE para experimentación animal (Ref: DAAM 5159, 5981 y 6523, CEEA, UB).

## 2. Vectores lentivirales

Se han construido vectores lentivirales recombinantes que codifican la proteína SIRT1 de ratón para la transducción de neuronas. Como control se han utilizado los vectores que codifican la proteína GFP (del inglés *green fluorescent protein*).

Para la inyección *in vivo* en el hipocampo, la combinación del pseudotipo VSV-G (del inglés *vesicular stomatitis virus G glycoprotein*) con el promotor PGK humano (del inglés *phosphoglycerate kinase 1 promoter*) permitió la especificidad neuronal y la expresión eficiente del transgen. Los vectores utilizados para la transducción neuronal *in vitro* fueron pseudotipados con VSV-G, y su expresión génica estaba bajo control del CMV humano (del inglés *cytomegalovirus immediate early promoter*). La titulación viral se obtuvo mediante ELISA de la proteína de la cápsida p24 (HIV-1 p24 Antigen ELISA, Zeptometrix) y también empleando PCR cuantitativa (Kutner et al., 2009). Los detalles de la obtención y el manejo de los lentivirus se describió previamente (Pertusa et al., 2008).

## 3. Inyección estereotáxica en hipocampo y transducción génica

Los ratones se anestesiaron intraperitonealmente (i.p) con 10 mg/kg de xilacina (Rompun 2%, Bayer) y 80 mg/kg de ketamina (Ketolar 50 mg/mL, Pfizer), y se colocaron en un aparato estereotáxico.

Se realizaron infusiones bilaterales de los vectores lentivirales en el área CA1 del hipocampo, una región del cerebro implicada críticamente en los procesos cognitivos. Las inyecciones estereotáxicas se realizaron a una velocidad de infusión de 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  en las siguientes coordenadas relativas a Bregma: -2.0 mm anteroposterior,  $\pm 1.2$  mm mediolateral y -1.5 mm dorsoventral. Las coordenadas se seleccionaron en estudios preliminares con inyección de colorante *Fast Green*. A cada lado se suministró 1  $\mu\text{L}$  de la solución de vector génico mediante una cánula de acero inoxidable de calibre 25 (Small Parts, Inc.) conectada a una jeringa Hamilton a través de un tubo de teflón. La jeringa se unió a una bomba de micro-infusión (Bioanalytical Systems, Inc.), y la cánula se dejó en posición durante 10 minutos después de la infusión para evitar que la solución retrocediera. Los animales fueron transducidos con solución vectorial SIRT1 que contenía  $3.2 \times 10^8$  genomas/ $\mu\text{L}$ . Los animales control recibieron la solución vectorial GFP que contenía  $6.6 \times 10^8$  genomas/ $\mu\text{L}$ .

La incisión se suturó y se permitió a los ratones recuperarse de la anestesia sobre una almohadilla térmica y volvieron a ser colocados en sus jaulas. Se controló la expresión génica mediante qPCR y la transducción neuronal específica se monitorizó por inmunohistoquímica, como se describe más adelante.

#### 4. Sobreexpresión de SIRT1

A los 4 meses de edad, los ratones 3xTg-AD y NoTg-AD fueron sometidos al procedimiento quirúrgico para el tratamiento de SIRT1 mediante la sobreexpresión génica o el tratamiento control mediante la expresión de GFP en hipocampo.

Los grupos experimentales fueron los siguientes: NoTg-GFP (n = 8), NoTg-SIRT1 (n = 9), 3xTg-GFP (n = 9) y 3xTg-SIRT1 (n = 10).

Los animales fueron sometidos a pruebas de comportamiento tras 6 meses de tratamiento, cuando los ratones tenían 10 meses de edad. En este período de 4 a 10 meses de edad se cubre el periodo de aparición de la patología AD desde la fase temprana a avanzada en estos ratones.

#### 5. Administración de resveratrol

El resveratrol (*trans*-resveratrol, Mega Resveratrol, Candlewood Stars) se administró en la comida de los animales a la concentración de 1 g/kg de dieta. La dieta suplementada con resveratrol fue preparada comercialmente con la dieta estándar que recibían todos los animales del estudio (2018 Teklad Global 18 % Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan). El consumo habitual de estos ratones es de 3 g/día, de modo que recibieron un total de 3 mg de resveratrol al día, equivalente a la dosis de resveratrol de 100 mg/kg de peso corporal. La dieta utilizada como control era la dieta estándar.

Los grupos experimentales fueron los siguientes: NoTg-ct (n = 14), NoTg-RV (n = 12), 3xTg-ct (n = 10) y 3xTg-RV (n = 10).

El tratamiento de resveratrol tenía una duración de 10 meses. Se inició la administración de resveratrol a los 2 meses de edad y finalizó a los 12 meses de edad. Posteriormente, los animales fueron sometidos a pruebas de comportamiento. En este período de 2 a 12 meses de edad se cubre un amplio periodo de progresión de la patología AD desde la fase pre-sintomática a la fase de patología avanzada.

#### 6. Administración de melatonina

La melatonina (Sigma M-5250) se administró a los ratones en la bebida a una dosis de 10 mg/kg/día. Para disolver la melatonina en el agua se utiliza etanol, por lo que el tratamiento control contiene un 0'065% de etanol. Se ha realizado un seguimiento y control del consumo dos veces por semana, realizado el cambio de las botellas y adaptando las cantidades de melatonina preparadas, para conseguir la dosis óptima de 10 mg/kg/día.

Los grupos experimentales fueron los siguientes: NoTg-ct (n = 16), NoTg-MEL (n = 12), 3xTg-ct (n = 13) y 3xTg-MEL (n = 11).

El tratamiento de melatonina tenía una duración de 6 meses. Se inició la administración de melatonina a los 6 meses de edad y finalizó cuando los ratones tenían 12 meses de edad. Posteriormente, los animales fueron sometidos a pruebas de comportamiento. El tratamiento se inició en una fase de patología moderada, siguiendo el mismo diseño de un estudio previo realizado en nuestro laboratorio (Garcia-Mesa et al., 2012).

## **7. Pruebas de comportamiento**

Los ensayos de comportamiento se realizaron en la Unitat d'Experimentació Animal de la Facultat de Psicologia de la Universidad de Barcelona (campus Mundet, UB).

- **Prueba de las esquinas:**

Se utilizó para evaluar neofobia a una nueva jaula durante 30 segundos. En esta prueba el ratón se colocó en el centro de una jaula nueva (Makrolon, 35 × 35 × 25) con serrín limpio y se midieron las veces que visitó las esquinas, la latencia de la primera incorporación vertical y el número de incorporaciones.

- **Campo abierto:**

Ensayo que evaluó la emotividad y la actividad locomotora vertical y horizontal durante 5 minutos. Cada animal se colocó en el punto central de una superficie blanca de madera (55 × 55 × 20 cm), dividida en cuadrantes de 10 × 10 cm. Se midieron las latencias de movimiento, de deambulación, de incorporación, de llegada a la periferia y del proceso de higiene del animal. También se midieron la deambulación total, la cantidad de incorporaciones, el tiempo y número de higienes y la emotividad, basada en las defecaciones y la orina.

- **Ensayo Sensorial:**

Se coge al ratón por la cola, de tal manera que sus patas traseras no toquen con la mano del investigador. Se levanta el ratón a una altura aproximada de 30 cm y se baja sobre una plataforma de color negro. El ensayo se realizó 3 veces y se miró que el animal estirara sus patas traseras y sus patas delanteras al acercarse a la plataforma, de manera que no se golpeará con la nariz en la plataforma.

- **Coordinación motora y equilibrio:**

Consistió en colocar el animal 2 veces consecutivas, durante 20 segundos cada una, en el centro de una varilla de madera de 1 cm<sup>2</sup> y de un metro de longitud. Seguidamente y con el objetivo de incrementar la dificultad se realizó el mismo tipo de ensayo con una varilla de metal de 1 cm de diámetro. En ambos ensayos se tuvieron en cuenta la distancia y el tiempo de permanencia sobre la varilla.

Finalmente se realizó una tercera prueba donde el ratón se colocó en el centro de una cuerda de metal de 3 mm de diámetro. Este ensayo se realizó 2 veces seguidas con un tiempo máximo de 5 segundos cada vez, y una tercera con un tiempo máximo de 60 segundos. En este último ensayo además de medir la distancia caminada y el tiempo de permanencia en la cuerda, también se tuvieron en cuenta los recursos empleados en el ejercicio (patas delanteras o traseras y la cola). Todos los aparatos fueron suspendidos a una altura de 50 cm sobre una mesa completamente acolchada.

- **Caja oscura/iluminada:**

Modelo para medir la ansiedad, que está basado en la aversión innata de los roedores a las áreas intensamente iluminadas, así como en el comportamiento exploratorio espontáneo en respuesta a factores estresantes de grado leve. En este ensayo el ratón puede explorar dos compartimentos interconectados por una apertura de 7 × 7 cm que presentan diferentes características de tamaño (2/1) y de color, uno negro (27 × 18 × 27 cm) y otro blanco (27 × 27 × 27 cm) iluminado con una bombilla de luz blanca de 20 W (Panlab, S.L).

Los animales se colocaron en el área de penumbra y fueron grabados durante 5 minutos. Se midió la latencia de entrada a la zona iluminada, así como el número de entradas y el tiempo de permanencia en esta zona. Además se contaron la cantidad de defecaciones y orina en cada zona.

- **Tabla de los cuatro agujeros:**

Este ensayo se utilizó para estudiar el comportamiento exploratorio de los animales frente a un ambiente novedoso en un tiempo total de 5 minutos. El aparato consiste en una caja de madera, blanca (32 × 32 × 32 cm), cuya base tiene 4 agujeros equidistantes de 3 cm de diámetro. El ratón se colocó en el centro de la superficie y se midió la latencia de movimiento y de exploración del primero y de los cuatro agujeros.

Se consideró una exploración cada ocasión que el ratón introdujo la cabeza en un agujero, pasando de la zona de los ojos. Se tuvo en cuenta además, por cada minuto, el número de

veces que el animal exploró y el tiempo que demoró en la exploración. Las defecaciones y la orina también fueron registradas.

- **Reconocimiento de objetos:**

La prueba de reconocimiento de objetos (NOR, del inglés *novel object recognition*) se empleó para evaluar la memoria de reconocimiento, basada en la tendencia espontánea de los roedores a dedicar más tiempo a explorar un objeto novedoso que uno familiar. Los animales se colocaron en medio de un laberinto negro con dos brazos angulados a 90°, cada uno de 25 × 5 cm. Las paredes de 15 cm de altura se pueden levantar para facilitar su limpieza. Los objetos a discriminar son de madera (A, B y C hacen 6.2 cm, 4.75 cm y 5 cm de altura, respectivamente, y de color distintivo).

Después de dos días previos de habituación, los animales fueron sometidos a un ensayo de adquisición de 10 minutos en presencia de dos objetos nuevos idénticos (A + A') situados al final de cada brazo. A las 2 horas se realizó un ensayo de retención de 10 min, reemplazando el objeto A por el objeto B. Otro ensayo de retención de 10 minutos se realizó 24 horas después, reemplazando el objeto A por el objeto C.

La exploración de objetos se definió como la orientación de la nariz al objeto a una distancia menor de 2 cm. Los tiempos de exploración se registraron y se utilizaron para calcular un índice de discriminación  $[\text{nuevo (t)} - \text{familiar (t)}] / [\text{tiempo total (t) en nuevo} + \text{familiar}]$ .

- **Laberinto acuático de Morris:**

La prueba del laberinto acuático de Morris (MWM, del inglés *Morris water maze*) se empleó para evaluar el aprendizaje espacial y la memoria. Consiste en un día de aprendizaje, seis días de adquisición de la memoria mediante referencias espaciales y un último día de recuperación de la memoria a través de la eliminación de la plataforma.

Los ratones fueron entrenados para localizar una plataforma oculta (10 cm de diámetro, ubicada a 20 cm de la pared y 0.5 cm debajo de la superficie del agua) en un tanque circular (100 cm de diámetro, 40 cm de altura, 25°C de agua opaca, rodeado de cortinas negras) basándose en puntos de referencia distintivos como señales visuales. En cada uno de los cuatro puntos cardinales de la piscina se colocó un objeto diferente, los que el ratón debió utilizar para recordar la posición de la plataforma en el agua. Cada día se tuvo en cuenta que el animal no comenzara con la plataforma en el mismo sitio donde había terminado el día anterior para no influir positivamente en el resultado del ensayo. Se realizaron cuatro sesiones de prueba de 60 segundos por día.

Al séptimo día, después de un ensayo de aprendizaje, se retiró la plataforma y los ratones realizaron un ensayo de 60 segundos para probar la retención del aprendizaje. Se utilizó un sistema de seguimiento computarizado (SMART, Panlab S.A) para medir las distancias y los cuadrantes cubiertos.

## 8. Muestras cerebrales

Después de completar las pruebas conductuales y cognitivas, se procesaron 3 animales por grupo para el análisis histológico cerebral. Los animales restantes fueron decapitados y el hipocampo fue disecado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para un análisis posterior.

Para la histología del cerebro, los ratones fueron anestesiados como se describió anteriormente para la inyección de vectores. Los animales se perfundieron a través de un catéter ventricular con tampón fosfato 100 mM, pH 7.4 y que contenía 0.1 mg/mL de heparina (Mayne Pharma), seguido de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato. Se retiraron los cerebros, y se fijaron durante toda la noche en solución fría de paraformaldehído y después se aclararon con tampón fosfato frío. Los cerebros fueron crioconservados en soluciones sucesivas de 20% y 30% de sacarosa y posteriormente fueron congelados en hielo seco.

## 9. Inmunofluorescencia de muestras cerebrales

Los cerebros de ratón fijados se procesaron para inmunofluorescencia mediante procedimientos estándar (Pertusa et al., 2008).

Los cortes coronales de 30  $\mu\text{m}$  se tiñeron con los siguientes anticuerpos primarios: SIRT1, proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*), proteína nuclear específica neuronal (NeuN, del inglés *neuronal specific nuclear protein*), clon 4G8 de A $\beta$  y clon AT8 de p-tau. Los anticuerpos primarios y la dilución se enumeran en la Tabla 2. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los conjugados específicos de especie Alexa Fluor 488 y 546 (1:1000) (Life Technologies). Los núcleos de las células se contrastaron con TO-PRO-3 (1:1000) (Molecular Probes). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Leica TCS SP2.

Anticuerpo	Uso (dilución)	Casa comercial	Nº catálogo
A $\beta$ , clone 4G8	IF (1:50 – 1:100)	Covance	SIG-39220
A $\beta$ , clone 6e10	WB (1:1000)	BioLegend	803001
sAPP $\alpha$	WB (1:500)	BioLegend	813501
sAPP $\beta$	WB (1:1000)	BioLegend	813401
Actin (20-33)	WB (1:10 000)	Sigma	A5060
ADAM10	WB (1:1000)	Abcam	ab1997
AMPK	WB (1:1000)	Cell Signaling	2532S
p-AMPK (Thr172)	WB (1:1000)	Cell Signaling	2535S
APP-CTF, clone C1/6.1	WB (1:1000), IF (1:500)	Covance	SIG-39152
BACE1	WB (1:1000)	Abcam	ab2077
BDNF (N-20)	WB (1:500)	Santa Cruz Biotechnology	sc-546
CREB	WB (1:1000)	Cell Signaling	9197S
p-CREB (Ser133)	WB (1:1000)	Cell Signaling	9196S
GDNF (D-20)	WB (1:1000)	Santa Cruz Biotechnology	sc-328
GFAP, clone GA5	IF (1:100)	Sigma	G3893
Hsp70 (W27)	WB (1:2000)	Calbiochem	HSP01
IDE	WB (1:1000)	Calbiochem	PC730
MAP2, clone AP-20	WB (1:500), IF (1:100)	Sigma	M1406
Neprilisina/CD10	WB (1:1000)	R&D system	AF1126
NeuN	IF (1:100)	Millipore	MAB377
ac-p53, acetyl K382	WB (1:1000)	Abcam	ab37318
PGC-1 $\alpha$	WB (1:500)	Santa Cruz Biotechnology	sc-13067
Proteasome 20S core	WB (1:1000)	Enzo Life Sciences	BML-PW8155
PSD95	WB (1:500), IF (1:100)	Millipore	MAB1598
SIRT1	WB (1:2500), IF (1:100)	Cell Signaling	2028s
ac-tau, acetyl K280	WB (1:500)	AnaSpec	56077
p-tau, clone AT8	WB (1:1000), IF (1:50)	Thermo Scientific	MN1020
Tau, clone HT7	IF (1:50)	Thermo Scientific	MN1000
$\beta$ -tubulin	WB (1:10000)	Sigma	T4026
Ubiquitin	WB (1:2000)	Abcam	ab137031

**Tabla 2.** Lista de anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia (IF) y Western blot (WB).

## 10. PCR cuantitativa en tiempo real

La extracción del ARN total del hipocampo de ratón se realizó mediante el mirVana™ RNA Isolation Kit (Applied Biosystems). El rendimiento, la pureza y la calidad del ARN se determinaron usando un NanoDrop™ ND1000. Se seleccionó el ARN con una relación 260/280 >1.9. Se realizó la síntesis del cDNA utilizando el High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems). La expresión génica se midió en el sistema de qPCR ABI Prism 7900HT usando sondas TaqMan FAM específicas (Applied Biosystems). En el hipocampo de ratón se analizó la expresión génica de ADAM10, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, del inglés *glial cell line-derived neurotrophic factor*), IL1 $\beta$ , IL6, IL10, SIRT1, TNF- $\alpha$ , el receptor de tropomiosina quinasa B (TrkB, del inglés *tropomyosin receptor kinase B*) y el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A, del inglés *vascular endothelial growth factor A*). Los datos se normalizaron a la expresión del gen TBP (del inglés *TATA-binding protein*). En la Tabla 3 se presenta el listado de las sondas utilizadas.

Gene symbol	Assay ID	NCBI RefSeq
ADAM10	Mm00545742_m1	NM_007399.3
BDNF	Mm01334042_m1	NM_001048142.1
GDNF	Mm00599849_m1	NM_010275.3
IL1 $\beta$	Mm00434228_m1	NM_008361.3
IL6	Mm00446191_m1	NM_031168.1
SIRT1	Mm00490758_m1	NM_001159589.1
TBP	Mm00446971_m1	NM_013684.3
TNF- $\alpha$	Mm00443258_m1	NM_013693.2
TRKB	Mm00435422_m1	NM_001025074.2
VEGFA	Mm01281449_m1	NM_001025250.3

**Tabla 3.** Lista de las sondas marcadas con TaqMan utilizadas para el análisis de qPCR.

## 11. Validación del modelo *in vitro* de 3xTg-AD

Hay controversia acerca de la utilidad de los cultivos neuronales de ratones transgénicos de AD para reproducir la patología AD. En los ratones 3xTg-AD, los transgenes humanos se expresan bajo el control transcripcional del casete de expresión Thy1.2 (Oddo et al., 2003). La expresión y la actividad de Thy1.2 es muy baja hasta los días postnatales 6-12 (Caroni, 1997). En este sentido, el tejido cerebral de embriones 3xTg-AD de 16 días (E16) ha

mostrado un aumento de tres veces de la expresión de APP y tau (Smith et al., 2005) en comparación con una expresión de seis veces en ratones adultos (Oddo et al., 2003). Sin embargo, se ha demostrado que los cultivos de neuronas corticales y del hipocampo de embriones 3xTg-AD son útiles para estudiar una serie de alteraciones relacionadas con la AD, tales como señalización del calcio (Smith et al., 2005), excitabilidad neuronal (Frazzini et al., 2016), función mitocondrial (Yao et al., 2009) y homeostasis de iones de zinc (Sensi et al., 2008). Además, Vale et al. (Vale et al., 2010) informaron de las condiciones de cultivo específicas que condujeron a una acumulación de A $\beta$  y p-tau en cultivos de neuronas corticales de embriones 3xTg-AD a los 8 días *in vitro* (DIV). Estos autores propusieron que los cultivos primarios de neuronas 3xTg-AD constituyen un modelo *in vitro* que imita la patología de tipo AD y que puede ser útil para estudios de neuroprotección (Alonso et al., 2011b, a; Alonso et al., 2013).

En el presente estudio se utilizó el protocolo de cultivo celular de los autores mencionados y se confirmó la acumulación de A $\beta$  y p-tau, y de signos de neurodegeneración a los 11 DIV.

## 12. Cultivo de neuronas y transducción génica

Los cultivos primarios de neuronas corticales se realizaron a partir de ratones E16-17 NoTg y 3xTg-AD. Los hemisferios cerebrales, incluyendo las cortezas y los hipocampos, se diseccionaron en tampón de Krebs, se cortaron en pequeños dados, se tripsinizaron y se trituraron mecánicamente en una única suspensión de células. La suspensión celular se centrifugó y se resuspendió en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Biochrom AG) suplementado con 26.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 mM glutamina, 100 mU/L insulina B, 7  $\mu$ M ácido p-aminobenzoico, 25 mM KCl y 10% de suero fetal bovino (Gibco-BRL, Invitrogen). Las placas se recubrieron con 25 mg/L de poli-D-lisina.

Las células se sembraron para el análisis de inmunocitoquímica a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio. Para análisis por Western blot se usó una densidad de  $4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 12 pocillos. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%. Dos días después, se añadieron 2  $\mu$ M de citosina arabinosida al medio de cultivo para prevenir la proliferación de células no neuronales. A los 4 DIV, se añadió directamente al medio de cultivo una solución vectorial que contenía  $1.3 \times 10^7$  genomas/ $\mu$ L de SIRT1 o  $2.5 \times 10^9$  genomas/ $\mu$ L de GFP. Los cultivos de neuronas se analizaron a los 11 DIV, cuando se manifestó la acumulación de A $\beta$  y p-tau. La transducción neuronal se monitorizó mediante inmunohistoquímica y Western blot, como se describe a continuación.

### **13. Inmunocitoquímica de cultivos neuronales**

Los cultivos de neuronas cultivados en cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% después de 11 DIV. Las células se procesaron por inmunofluorescencia con los siguientes anticuerpos primarios: clon 4G8 de A $\beta$ , fragmento carboxi-terminal de APP (APP-CTF), proteína asociada a microtúbulo 2 (MAP2, del inglés *microtubule-associated protein 2*), NeuN, proteína de densidad postsináptica 95 (PSD95, del inglés *postsynaptic density protein 95*), SIRT1, clon AT8 de p-tau, y clon HT7 de tau total. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los conjugados Alexa Fluor 488 y 546 (1:1000). Los detalles de los anticuerpos primarios utilizados se presentan en la Tabla 2. La inmunocitoquímica se realizó por procedimientos estándar (García-Mesa et al., 2015).

### **14. Inmunodetección de proteínas por Western blot**

Los extractos tisulares y celulares se obtuvieron mediante el siguiente procedimiento. Los hipocampos y las neuronas maduras cultivadas se homogeneizaron en tampón RIPA frío y suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Para los hipocampos se analizaron 30  $\mu$ g de proteína, y para los cultivos de neuronas se analizaron 20  $\mu$ g de proteína. La electroforesis y la inmunodetección se realizó por procedimientos estándar (Revilla et al., 2014a). Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: clon 6e10 de A $\beta$ , ADAM10, AMPK, p-AMPK, APP-CTF, sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , BACE1, BDNF, CREB, p-CREB, GDNF, Hsp70, IDE, MAP2, Neprilisina, p53 acetilado (ac-p53), PGC-1 $\alpha$ , subunidades nucleares del proteasoma 20S, PSD95, SIRT1, tau clon HT7, tau acetilada (ac-tau), p-tau clon AT8, y ubiquitina. Como control de carga se usó el anticuerpo anti-actina. Los detalles de los anticuerpos primarios se presentan en la Tabla 2. Los anticuerpos secundarios fueron peroxidasa conjugados (1:2000) (GE Healthcare). Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia y se digitalizaron. Los niveles de proteína se expresaron en relación con la cantidad en el grupo NoTg sin tratamiento.

### **15. Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. Los datos se analizaron con procedimientos de ANOVA. Two-way ANOVA fue seguida por la prueba post hoc de Bonferroni para la comparación de los grupos que presentaban interacción entre variables. One-way ANOVA fue seguida por la prueba post hoc de Bonferroni para la comparación entre grupos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics v22.



# **RESULTADOS**



## ESTUDIO 1:

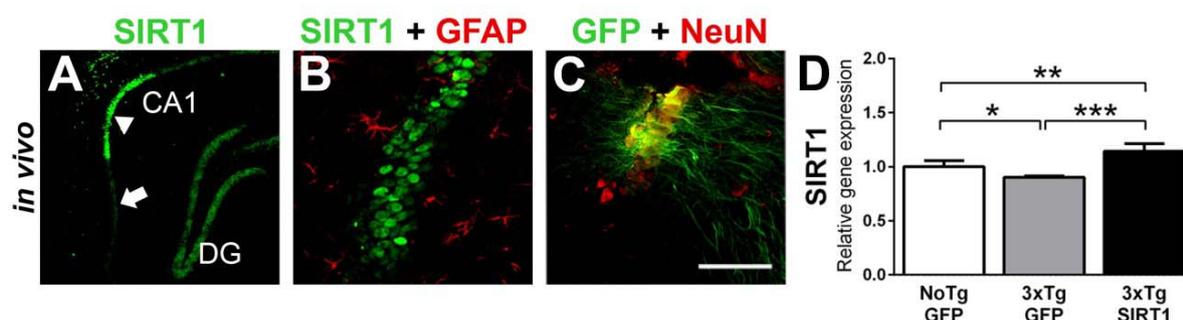
## PROTECCIÓN DE LA PÉRDIDA COGNITIVA POR SOBREEXPRESIÓN DE SIRT1 EN EL HIPOCAMPO

- **Expresión de SIRT1 y GFP en la zona CA1 del hipocampo**

Mediante técnicas estereotáxicas se realizó la infusión intracraneal de vectores lentivirales (lenti-SIRT1 o vector control lenti-GFP) en la zona CA1 del hipocampo de ratones 3xTg-AD y NoTg de 4 meses de edad. El lentivirus se dejó actuar durante 6 meses.

Las neuronas transducidas con lenti-SIRT1 mostraron inmunotinción intensa en comparación con los niveles de SIRT1 endógenos (Fig. 1a). La inyección de los vectores lentivirales en zona CA1 produjo una expresión selectiva de SIRT1 en el núcleo de las neuronas piramidales (Fig. 1b), mientras que GFP se expresó en todo el cuerpo neuronal (Fig. 1c). La naturaleza neuronal de las células transducidas fue confirmada mediante la tinción con el marcador neuronal NeuN (Fig. 1c) y el de astrocitos (Fig. 1b).

El análisis del hipocampo mediante la cuantificación del ARNm reveló un aumento de la expresión del gen SIRT1 en el grupo 3xTg-SIRT1 (Fig. 1d) [ $F(2,14) = 28.62$ ,  $p < 0.0001$ ].



**Fig. 1** Expresión de SIRT1 y GFP en el hipocampo. (a-c) Imágenes del hipocampo de ratones NoTg transducidos con vectores lentivirales. (a) Expresión de SIRT1 endógena (flecha) y transgen (cabeza de flecha) en el hipocampo. (b) Expresión de SIRT1 en el núcleo de las neuronas piramidales. (c) Expresión de GFP en todo el cuerpo neuronal. GFAP y NeuN se muestran en fluorescencia roja, mientras que GFP y SIRT1 se muestran en verde. (d) Expresión génica de SIRT1 en el hipocampo. Escala: a = 200  $\mu$ m; b, c = 50  $\mu$ m. Estadística: One-way ANOVA, Bonferroni, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  comparado con el grupo indicado.

- **La sobreexpresión de SIRT1 induce protección contra las alteraciones de comportamiento asociadas a demencia**

La sobreexpresión de SIRT1 indujo protección contra las BPSD en ratones 3xTg-SIRT1 de 10 meses de edad (Fig. 2a-d), e incluso se observó una mejora de comportamiento en ratones NoTg-SIRT1.

En el test de las esquinas, los ratones 3xTg-GFP presentaron una mayor latencia de incorporación vertical o rearing (Fig. 2a) [ $F(1,23) = 11.53$ ,  $p = 0.0025$ ; tratamiento,  $F(1,23) = 15.42$ ,  $p = 0.0007$ ; e interacción tratamiento  $\times$  genotipo,  $F(1,23) = 9.935$ ,  $p = 0.0045$ ] y un menor número de rearings (Fig. 2b) [interacción tratamiento  $\times$  genotipo,  $F(1,24) = 4.425$ ,  $p = 0.0461$ ] en comparación con los ratones NoTg-GFP. Lenti-SIRT1 recuperó las respuestas de neofobia en los ratones 3xTg-SIRT1 a niveles de NoTg.

En el ensayo de campo abierto, los ratones 3xTg-GFP presentaron una mayor latencia de movimiento (Fig. 2c) en comparación con los ratones NoTg-GFP [interacción tratamiento  $\times$  genotipo,  $F(1,28) = 4.201$ ,  $p = 0.0499$ ]. Lenti-SIRT1 redujo la latencia de movimiento (tiempo de freezing) en los ratones 3xTg-SIRT1 a niveles de NoTg, y también incrementó la distancia total recorrida (Fig. 2d) en ambas cepas [tratamiento,  $F(1,22) = 5.221$ ,  $p = 0.0323$ ].

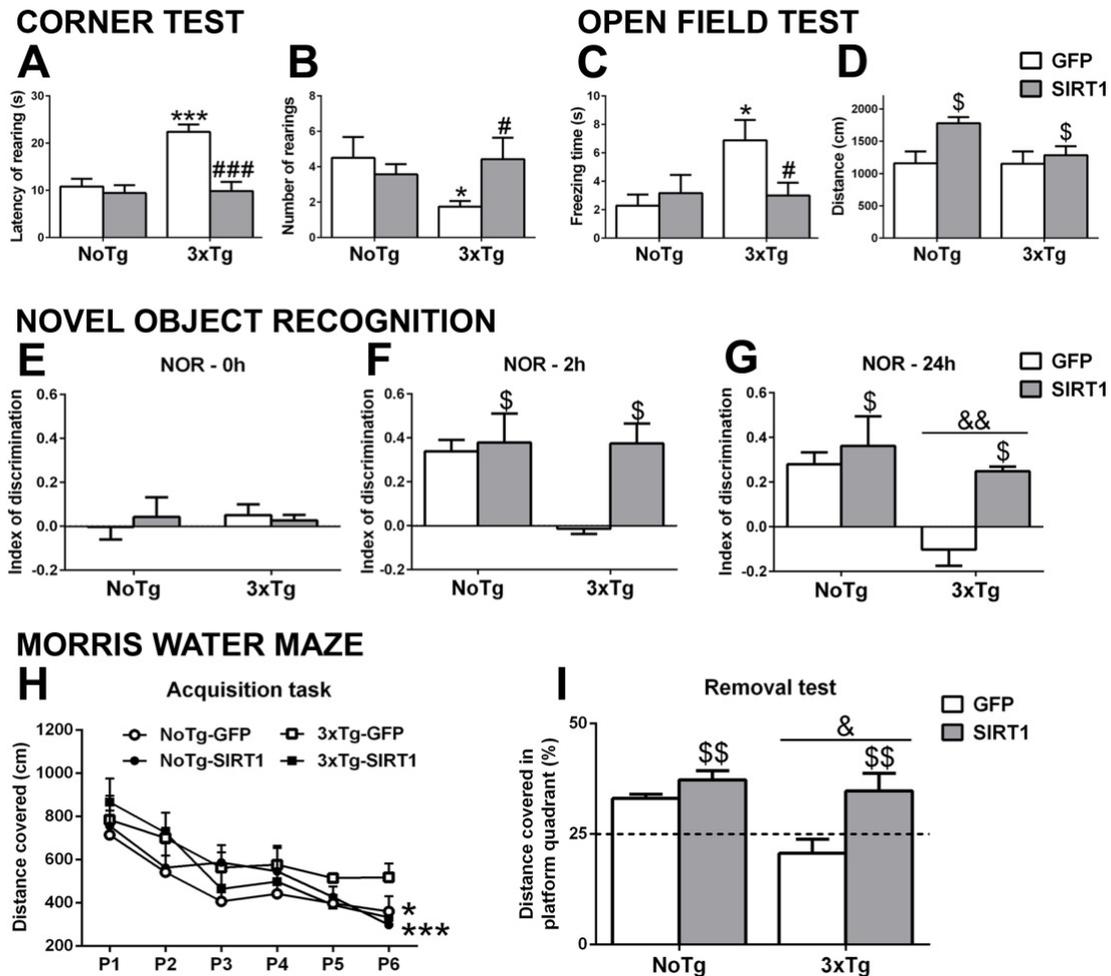
- **La sobreexpresión de SIRT1 protege contra la pérdida cognitiva en ratones 3xTg-AD e induce mejora cognitiva en ratones NoTg**

La sobreexpresión de SIRT1 conservó la cognición en ratones 3xTg-SIRT1 de 10 meses de edad y también indujo una mejora cognitiva en ratones NoTg-SIRT1, involucrada en las capacidades de aprendizaje y memoria (Fig. 2e-i).

En el test de NOR, los ratones 3xTg-GFP mostraron un déficit de memoria de reconocimiento, mientras que los ratones NoTg-SIRT y 3xTg-SIRT1 aumentaron su capacidad de recordar objetos familiares a las 2 horas (Fig. 2f) [tratamiento,  $F(1,21) = 6.072$ ,  $p = 0.0224$ ] y a las 24 horas [tratamiento,  $F(1,21) = 6.542$ ,  $p = 0.0183$ ; y genotipo  $F(1,21) = 8.574$ ,  $p = 0.0080$ ] (Fig. 2g).

En el ensayo de MWM los ratones NoTg-GFP, NoTg-SIRT1 y 3xTg-SIRT1 redujeron el recorrido para localizar la plataforma a lo largo de los días, de modo que las distancias recorridas por los ratones fueron disminuyendo [ $F(5,24) = 2.933$ ,  $p = 0.0332$ ;  $F(5,30) = 3.099$ ,  $p = 0.0226$ , y  $F(5,36) = 6.909$ ,  $p = 0.0001$  respectivamente], mientras que los ratones 3xTg-GFP no aprendieron durante los días de la adquisición de la memoria [ $F(5,42) = 2.259$ ,  $p = 0.0660$ ] (Fig. 2h). Al retirar la plataforma (Fig. 2i), los ratones NoTg y 3xTg-SIRT1 recordaron el cuadrante de la plataforma, ya que cubrieron una distancia en el cuadrante de

la plataforma significativamente mayor que la distancia esperada al azar [one-sample t-test column statistics,  $p < 0.05$ ], mientras que los ratones 3xTg-GFP nadaron al azar sin recordar la posición anterior de la plataforma de escape. Se observó un efecto general de la sobreexpresión de SIRT1, sugiriendo una mejora de la memoria para ambas cepas de ratón [genotipo,  $F(1,22) = 6.023$ ,  $p = 0.0225$ , y tratamiento,  $F(1,22) = 8.861$ ,  $p = 0.0070$ ].

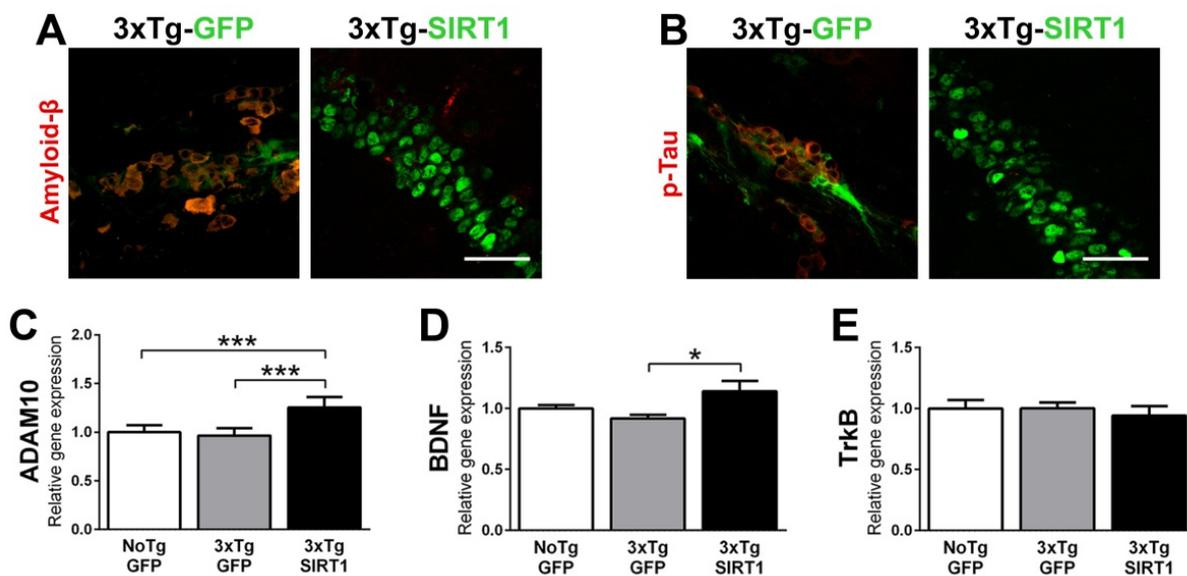


**Fig. 2** La sobreexpresión de SIRT1 induce neuroprotección y mejora cognitiva. Latencia de actividad vertical (a) y número de rearings (b) en el test de las esquinas. Latencia de movimiento (c) y distancia total recorrida (d) en el campo abierto. Test de NOR a tiempo 0h (e), 2h (f) y 24h (g). Test de MWM con las distancias recorridas hasta alcanzar la plataforma (h) y la distancia recorrida en el cuadrante de la plataforma (i). Estadística: a-c Two-way ANOVA, Bonferroni, \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  comparado con ratones NoTg; # $p < 0.05$  y ### $p < 0.001$  comparado con tratamiento GFP; d-g, i Two-way ANOVA, efecto de genotipo & $p < 0.05$  y && $p < 0.01$ ; y efecto de tratamiento \$ $p < 0.05$  y \$\$ $p < 0.01$ ; h One-way ANOVA, Bonferroni, \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$  P1 comparado con P6.

- **La sobreexpresión de SIRT1 induce neuroprotección contra A $\beta$  y p-tau en ratones 3xTg-AD**

El análisis del tejido cerebral mediante inmunotinción mostró una reducción de A $\beta$  (Fig. 3a) y p-tau (Fig. 3b) en la zona CA1 del hipocampo de ratones 3xTg-SIRT1 en comparación con los 3xTg-GFP, demostrando un efecto neuroprotector de SIRT1 contra la patología AD *in vivo*.

El aumento de expresión de SIRT1 en el hipocampo (Fig. 1d) fue acompañado de un aumento de la expresión de ADAM10 (Fig. 3c) [F(2,14) = 18.97, p = 0,0001] en los hipocampos de ratones 3xTg-SIRT1 en comparación con los 3xTg-GFP. Además se observó un aumento del factor neurotrófico BDNF (Fig. 3d) [F(2,13) = 3.764, p = 0.0513], mientras que los niveles de expresión de su receptor TrkB se mantuvieron sin cambios (Fig. 3e).



**Fig. 3** La sobreexpresión de SIRT1 induce efectos neuroprotectores contra A $\beta$  y p-tau. Inmunohistoquímica de A $\beta$  (a) y p-tau (b) en las neuronas piramidales de ratones 3xTg-AD. A $\beta$  y p-tau se muestran en fluorescencia roja, mientras que GFP y SIRT1 se muestran en verde. Escala: a, b = 50  $\mu$ m. Expresión génica de ADAM10 (c), BDNF (d) y TrkB (e). Estadística: One-way ANOVA, Bonferroni, \*p < 0.05 y \*\*\*p < 0.001 comparado con el grupo indicado.

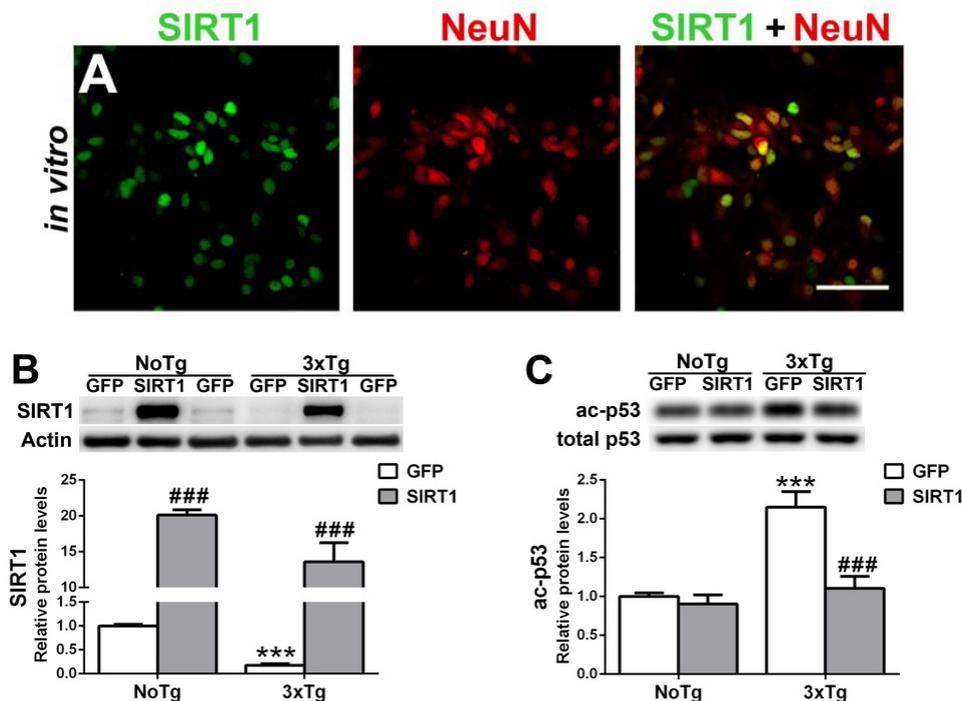
**ESTUDIO 2:**

**PROTECCIÓN DE LA NEURODEGENERACIÓN POR SOBREEXPRESIÓN DE SIRT1 EN CULTIVOS NEURONALES**

- **Expresión de SIRT1 y GFP en cultivos de neuronas**

Con el fin de analizar más a fondo los mecanismos involucrados en la neuroprotección inducida por SIRT1, se realizaron cultivos neuronales de ratones 3xTg-AD y NoTg. Los cultivos fueron transducidos con los lentivirus (lenti-SIRT1 o lenti-GFP) a los 4 DIV y analizados a los 11 DIV.

Mediante inmunotinción del marcador NeuN se confirmó que la expresión de SIRT1 se produjo en los núcleos de las neuronas (Fig. 4a), de la misma manera que *in vivo* (Fig. 1b).



**Fig. 4** Expresión de SIRT1 y GFP en los cultivos de neuronas. (a) Imágenes confocales de cultivos neuronales NoTg-SIRT1 teñidos con NeuN en rojo y SIRT1 en verde. (b-c) Niveles de proteínas de SIRT1 y ac-p53 mediante Western blot. Escala: a = 50 μm. Estadística: b-c Two-way ANOVA, Bonferroni, \*\*\*p < 0.001 comparado con NoTg; ###p < 0.001 comparado con el tratamiento GFP.

Mediante Western blot se demostró que la proteína SIRT1 está reducida en los cultivos neuronales de ratones 3xTg-GFP en comparación con los NoTg-GFP, y que después de la transducción se produjo una elevada sobreexpresión de SIRT1 en los cultivos 3xTg-SIRT1 y NoTg-SIRT1 (Fig. 4b) [genotipo,  $F(1,16) = 11.25$ ,  $p = 0.0040$ ; tratamiento,  $F(1,16) = 219.6$ ,  $p < 0.0001$ ; e interacción tratamiento  $\times$  genotipo,  $F(1,16) = 6.776$ ,  $p = 0.0192$ ].

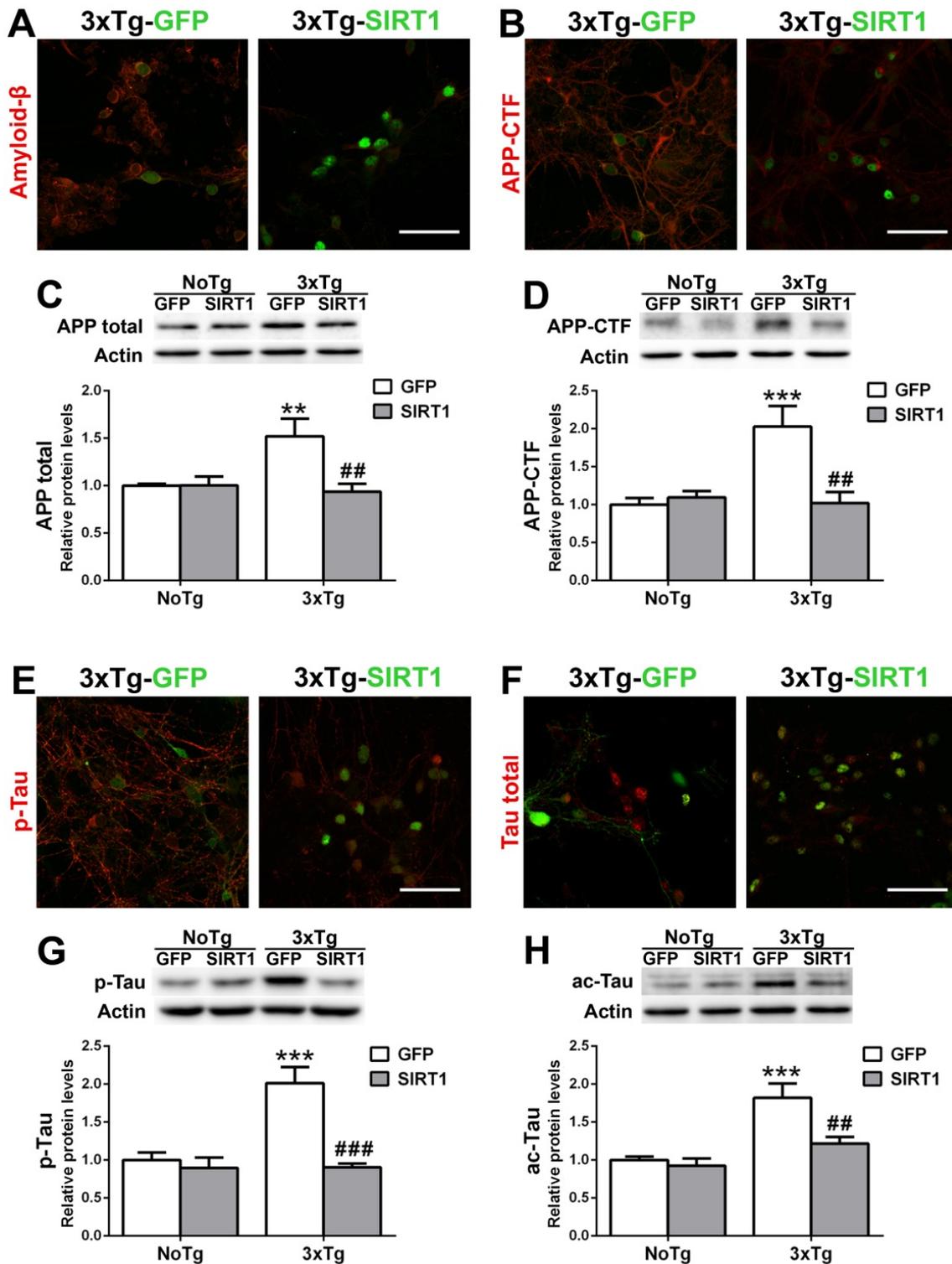
El factor anti-tumoral p53 es un sustrato de SIRT1 que esta anormalmente acetilado en los cultivos 3xTg-AD. La actividad desacetilasa de SIRT1 se confirmó a través de la disminución de los niveles de ac-p53 en los cultivos 3xTg-SIRT1 (Fig. 4c) [genotipo,  $F(1,20) = 22.72$ ,  $p = 0.0001$ ; tratamiento,  $F(1,20) = 16.22$ ,  $p = 0.0007$ ; e interacción tratamiento  $\times$  genotipo,  $F(1,20) = 11.28$ ,  $p = 0.0031$ ].

- **Sobreexpresión de SIRT1 reduce la patología A $\beta$  y tau en cultivos neuronales 3xTg-AD**

Los cultivos neuronales obtenidos a partir de ratones 3xTg-AD reproducen *in vitro* las patologías amiloide y tau. Se ha observado neuroprotección completa contra estas patologías en los cultivos de neuronas transducidos con SIRT1.

La inmunotinción con anticuerpos A $\beta$  (Figura 5a) y APP-CTF (Figura 5b) demostró una disminución de la carga de A $\beta$  en el grupo 3xTg-SIRT1 en comparación con 3xTg-GFP. Además, el análisis mediante Western blot confirmó la reducción de la APP total (Fig. 5c) [tratamiento,  $F(1,16) = 6.674$ ,  $p = 0.0200$ ; e interacción tratamiento  $\times$  genotipo,  $F(1,16) = 6.907$ ,  $p = 0.0183$ ] y del APP-CTF (Fig. 5d) [genotipo,  $F(1,16) = 8.363$ ,  $p = 0.0106$ ; tratamiento,  $F(1,16) = 7.675$ ,  $p = 0.0136$ ; e interacción tratamiento  $\times$  genotipo,  $F(1,16) = 11.20$ ,  $p = 0.0041$ ] en los cultivos neuronales 3xTg-SIRT1 en comparación con los 3xTg-GFP.

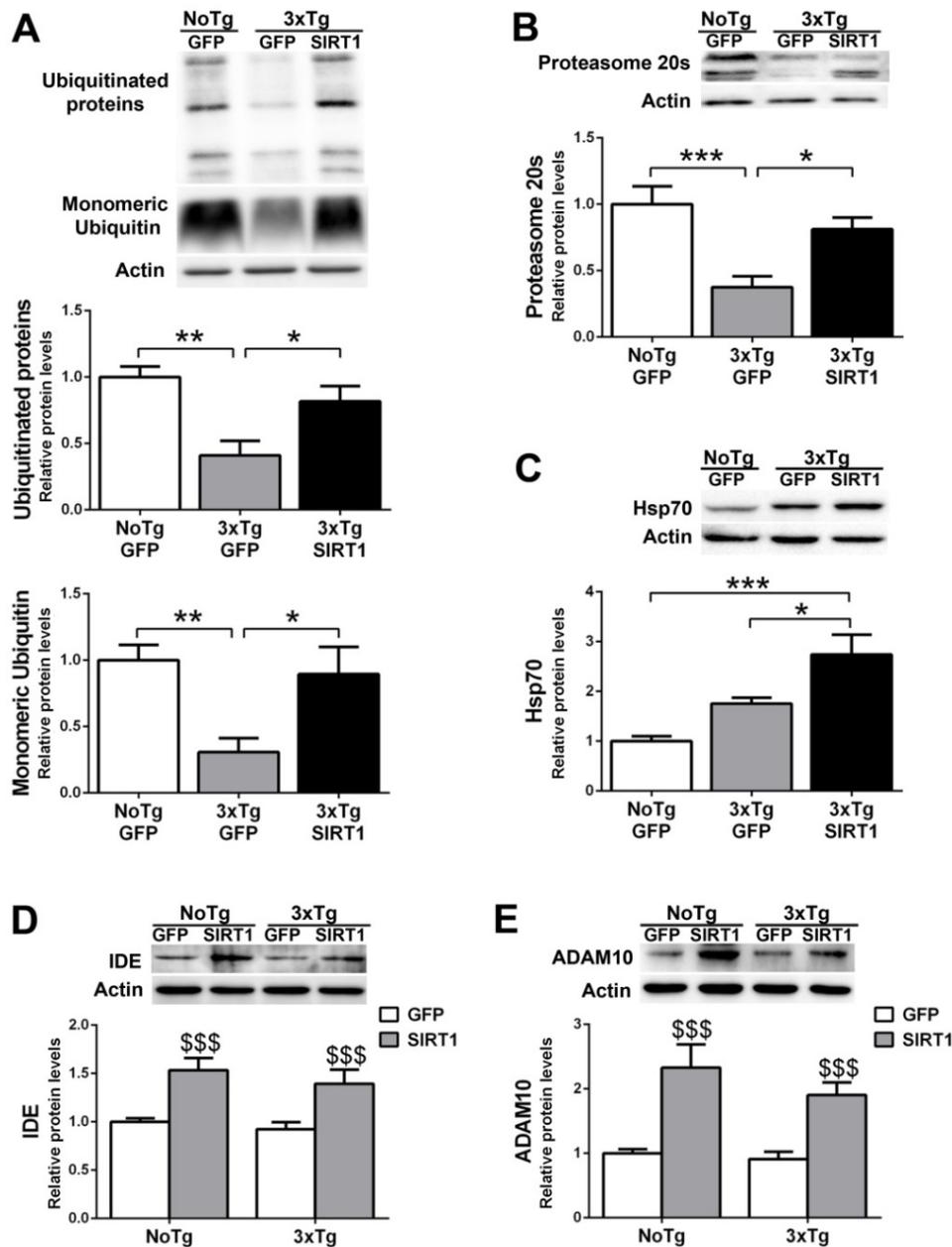
En cuanto a la patología tau se demostró mediante inmunotinción una disminución de los niveles de p-tau (Fig. 5e) y tau total (Fig. 5f) en los cultivos 3xTg-SIRT1 en comparación con los 3xTg-GFP. Los análisis mediante Western blot también confirmaron la reducción de p-tau (Fig. 5g) [genotipo,  $F(1,12) = 13.74$ ,  $p = 0.0030$ ; tratamiento,  $F(1,12) = 19.27$ ,  $p = 0.0009$ ; e interacción tratamiento  $\times$  genotipo  $F(1,12) = 13.26$ ,  $p = 0.0034$ ] y de ac-tau (Fig. 5h) [genotipo,  $F(1,28) = 22.49$ ,  $p < 0.0001$ ; tratamiento,  $F(1,28) = 8.451$ ,  $p = 0.0071$ ; e interacción tratamiento  $\times$  genotipo  $F(1,28) = 5.061$ ,  $p = 0.0325$ ] en cultivos 3xTg-SIRT1 debido a la acción desacetilasa de SIRT1 que induce la posterior degradación de p-tau mediante el UPS.



**Fig. 5** La sobreexpresión de SIRT1 reduce A $\beta$  y p-tau en cultivos neuronales de ratones 3xTg-AD. Imagen confocal de A $\beta$  (a), APP-CTF (b), p-tau (e) y tau total (f) en cultivos de ratones 3xTg-AD. A $\beta$  y tau se muestran en fluorescencia roja, mientras que GFP y SIRT1 se muestran en verde. Análisis proteico de APP total (c), APP-CTF (d), p-tau (g) y ac-tau (h) de cultivos neuronales NoTg y 3xTg-AD. Escala: a, b, e, f = 50  $\mu$ m. Estadística: Two-way ANOVA, Bonferroni, \*\*p < 0.01 y \*\*\*p < 0.001 comparado con NoTg; ##p < 0.01, ###p < 0.001 comparado con tratamiento GFP.

- **SIRT1 protege contra la disfunción de proteostasis e incrementa la vía no amiloidogénica**

La funcionalidad del complejo UPS, el sistema celular principal para la eliminación de proteínas aberrantes, se analizó mediante la determinación de los niveles de proteínas, y se observó una disfunción de las proteínas del UPS en los ratones 3xTg-AD.



**Fig. 6** SIRT1 revierte la disfunción del sistema UPS e incrementa la vía no amiloidogénica. Western blot de las proteínas ubiquitinadas y ubiquitina libre (a), subunidades 20S del proteasoma (b), Hsp70 (c), IDE (d), y ADAM10 (e) en cultivos neuronales NoTg y 3xTg-AD. Estadística: **a-c** One-way ANOVA, Bonferroni, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ; **d, e** Two-way ANOVA, efecto de tratamiento \$\$\$ $p < 0.001$ .

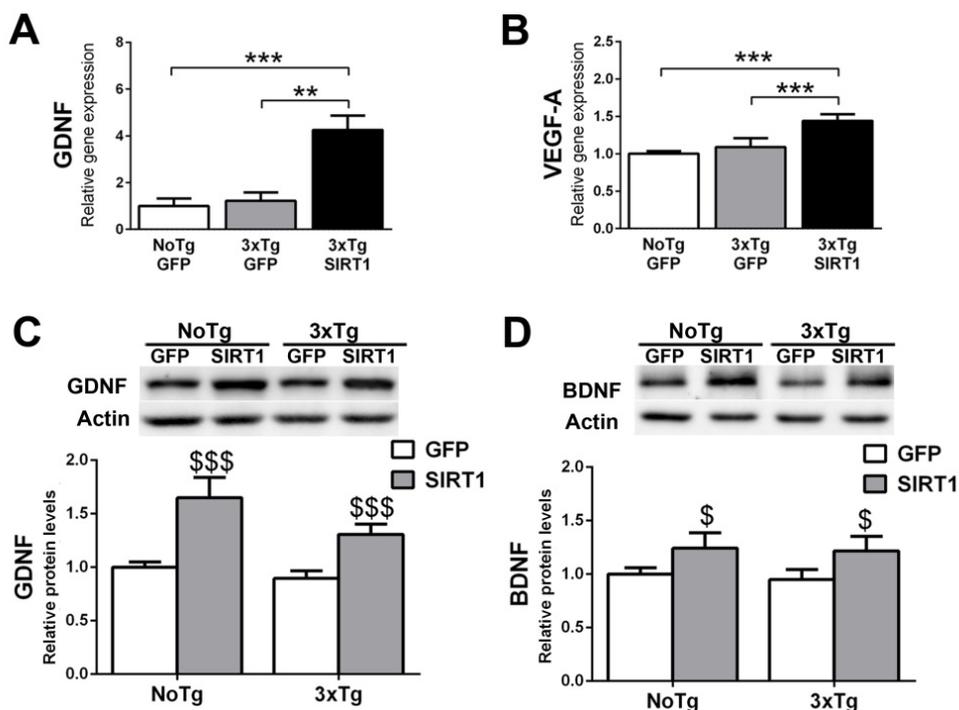
Los cultivos neuronales 3xTg-GFP mostraron una reducción de la expresión de las proteínas ubiquitinadas y de la ubiquitina libre (Fig. 6a), y una disminución de la expresión de la subunidad 20S del proteasoma (Fig. 6b), en comparación con los NoTg-GFP. La sobreexpresión de SIRT1 indujo la recuperación total de los niveles de proteínas de UPS en los cultivos 3xTg-SIRT1 [ $F(2,24) = 8.527$ ,  $p = 0.0016$ ;  $F(2,24) = 6.287$ ,  $p = 0.0064$ , y  $F(2,24) = 9.528$ ,  $p = 0.0009$ , respectivamente]. Se observó un patrón diferente para la proteína de choque térmico Hsp70, que mostró una mayor expresión en los cultivos 3xTg-GFP en comparación con NoTg-GFP y se incrementó adicionalmente en los cultivos de neuronas 3xTg-SIRT1 (Fig. 6c) [ $F(2,22) = 13.40$ ,  $p = 0.0002$ ].

Además, los cultivos transducidos con el vector lenti-SIRT1 presentaron una elevada expresión de IDE (Fig. 6d) [tratamiento,  $F(1,28) = 36.30$ ,  $p < 0.0001$ ] y de ADAM10 (Fig. 6e) [tratamiento,  $F(1,36) = 23.02$ ,  $p < 0.0001$ ] en ambas cepas, favoreciéndose de esta manera la vía de degradación de A $\beta$  y la vía no amiloidogénica, respectivamente.

- **La sobreexpresión de SIRT1 induce un aumento del neurotrofismo**

El análisis de los factores neurotróficos en el hipocampo de ratones 3xTg-SIRT1 mostró un aumento significativo de la expresión génica de GDNF (Fig. 7a) y VEGF-A (Fig. 7b) [ $F(2,12) = 17.79$ ,  $p = 0.0003$ ; y  $F(2,13) = 40.29$ ,  $p < 0.0001$ , respectivamente] en comparación con los 3xTg-GFP.

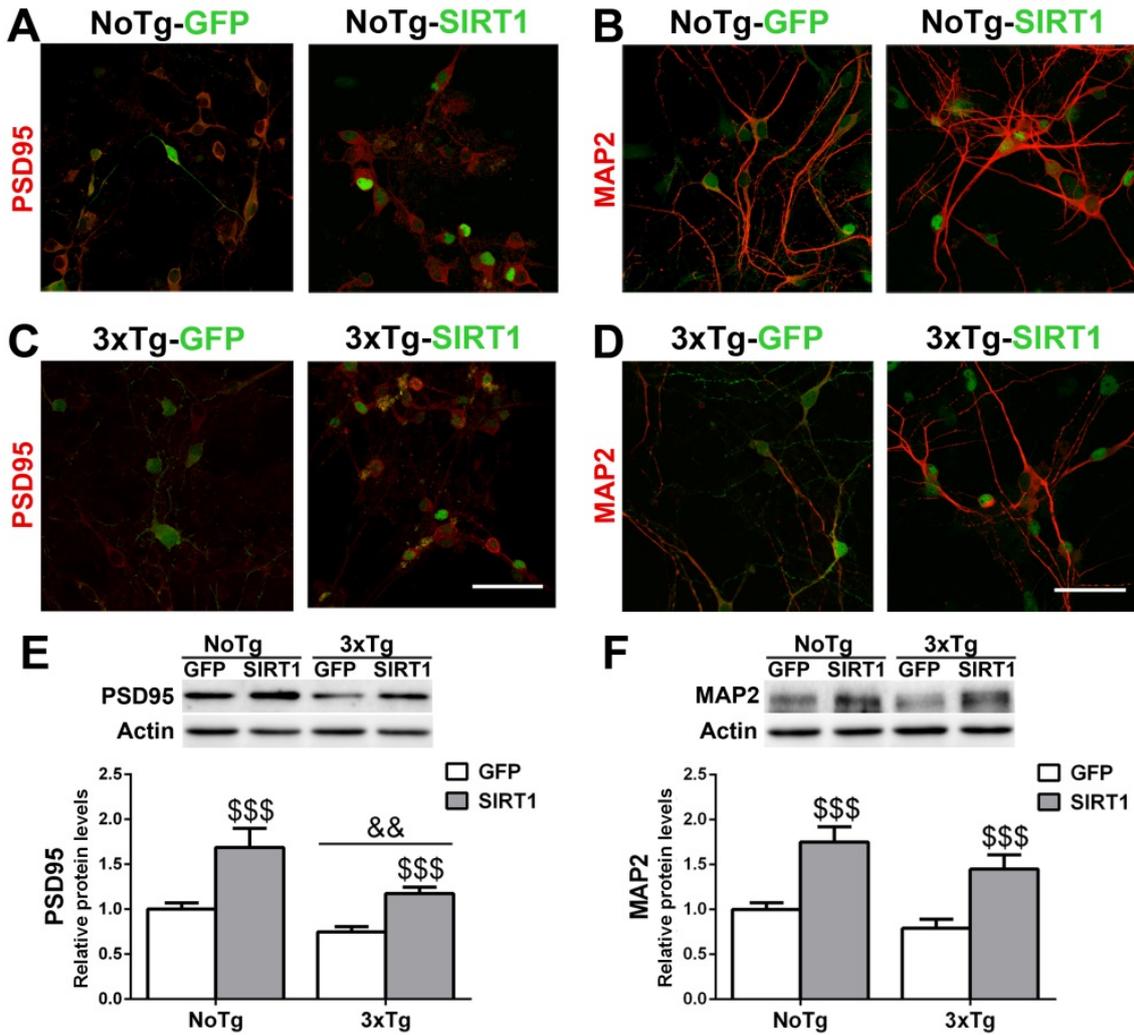
Además, los niveles de las proteínas GDNF (Fig. 7c) y BDNF (Fig. 7d) se incrementaron en los cultivos neuronales NoTg-SIRT1 y 3xTg-SIRT1 [tratamiento,  $F(1,36) = 21.15$ ,  $p < 0.0001$ ; y  $F(1,28) = 5.084$ ,  $p = 0.0322$ , respectivamente]. La sobreexpresión de SIRT1 incrementó las vías neurotróficas en los hipocampos y en los cultivos neuronales.



**Fig. 7** La sobreexpresión de SIRT1 induce un incremento del neurotrofismo. Expresión génica de GDNF (a) y VEGF-A (b) en el hipocampo. Análisis mediante Western blot de BDNF (c) y GDNF (d) en cultivos de neuronas. Estadística: a, b One-way ANOVA, Bonferroni, \*\*p < 0.01 y \*\*\*p < 0.001 comparado con el grupo indicado; c, d Two-way ANOVA, efecto de tratamiento \$p < 0.05 y \$\$\$p < 0.001.

- **SIRT1 incrementa la plasticidad sináptica en cultivos neuronales**

En cuanto a la sinapsis neuronal se observó mediante inmunohistoquímica que los cultivos neuronales transducidos con lenti-SIRT1 presentaron un aumento de la densidad sináptica (Fig. 8a, c) y de la arborización de neuritas (Fig. 8b, d) en comparación con los cultivos GFP. Mediante Western blot se observó que los niveles de la proteína PSD95 fueron inferiores en los cultivos 3xTg-AD en comparación con los NoTg (Fig. 8e) [genotipo,  $F(1,28) = 10.06$ ,  $p = 0.0037$ ], mientras que la sobreexpresión de SIRT1 indujo un incremento de la expresión de las proteínas PSD95 y MAP2 (Fig. 8f) tanto en cultivos neuronales NoTg-SIRT1 como en 3xTg-SIRT1 [tratamiento,  $F(1,28) = 21.19$ ,  $p < 0.0001$  y  $F(1,32) = 28.59$ ,  $p < 0.0001$ , respectivamente].



**Fig. 8** SIRT1 incrementa los marcadores de plasticidad sináptica. Imagen representativa de PSD95 (a, c) y MAP2 (b, d) marcadas en rojo, mientras que GFP y SIRT1 en verde. Análisis de Western blot de PSD95 (e) y MAP2 (f) en cultivos neuronales. Escala: a-d = 50  $\mu$ m. Estadística: Two-way ANOVA, efecto de genotipo &&p < 0.01; y efecto de tratamiento \$\$\$p < 0.001.

**ESTUDIO 3:****PROTECCIÓN DE LA PÉRDIDA COGNITIVA POR TRATAMIENTO CON RESVERATROL**

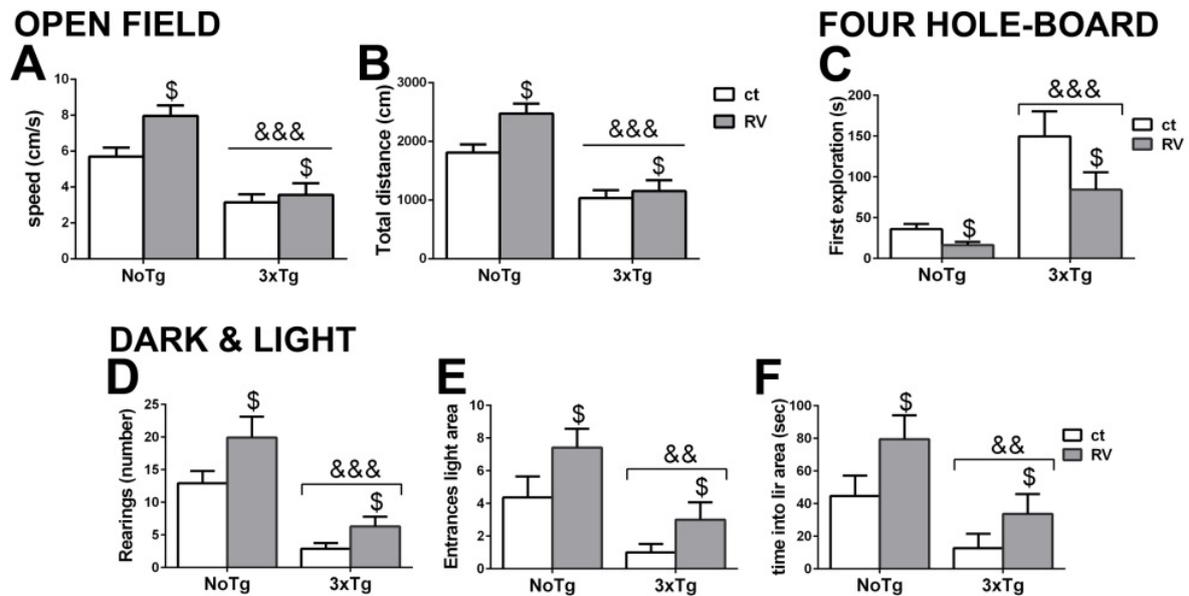
- **El tratamiento con resveratrol induce protección contra las alteraciones de comportamiento asociadas a demencia**

La administración de resveratrol con la dieta indujo protección contra las BPSD en ratones 3xTg-RV de 12 meses de edad (Fig. 9a-f).

En el ensayo de campo abierto, los ratones 3xTg-ct presentaron una menor movilidad en comparación con los ratones NoTg (Fig. 9a, b). El tratamiento con resveratrol incrementó la velocidad (Fig. 9a) [tratamiento,  $F(1,42) = 6.055$ ,  $p = 0.0181$ ; y genotipo,  $F(1,42) = 43.21$ ,  $p < 0.0001$ ] y la distancia total recorrida (Fig. 9b) [tratamiento,  $F(1,42) = 5.953$ ,  $p = 0.0190$ ; y genotipo,  $F(1,42) = 39.84$ ,  $p < 0.0001$ ] en ambas cepas.

En el ensayo de la tabla de los cuatro agujeros, los ratones 3xTg-ct presentaron una mayor latencia para realizar la primera exploración en comparación con los ratones NoTg (Fig. 9c). El tratamiento con resveratrol redujo la latencia de exploración en ambas cepas [tratamiento,  $F(1,42) = 6.349$ ,  $p = 0.0156$ ; y genotipo,  $F(1,42) = 28.88$ ,  $p < 0.0001$ ].

En la prueba de la caja oscura/iluminada, los ratones 3xTg-ct presentaron una menor capacidad exploratoria, en comparación con los ratones NoTg (Fig. 9d-f). El tratamiento con resveratrol incrementó en ambas cepas el número de rearings (Fig. 9d) [tratamiento,  $F(1,42) = 5.671$ ,  $p = 0.0219$ ; y genotipo,  $F(1,42) = 29.35$ ,  $p < 0.0001$ ], el número de entradas en la zona iluminada (Fig. 9e) [tratamiento,  $F(1,42) = 5.027$ ,  $p = 0.0303$ ; y genotipo,  $F(1,42) = 11.89$ ,  $p = 0.0013$ ], y el tiempo total de exploración en la zona iluminada (Fig. 9f) [tratamiento,  $F(1,42) = 4.844$ ,  $p = 0.0333$ ; y genotipo,  $F(1,42) = 9.360$ ,  $p = 0.0039$ ].



**Fig. 9** El tratamiento con resveratrol induce protección contra las alteraciones de comportamiento asociadas a demencia. Test de campo abierto con la velocidad de los ratones (a) y distancia total recorrida (b). Latencia de la primera exploración (c) en el test de la tabla de los cuatro agujeros. Ensayo de la caja oscura/iluminada, con el número de rearings (d), el número de entradas en la zona iluminada (e) y el tiempo de permanencia en el área iluminada (f). Estadística: a-f Two-way ANOVA, efecto de genotipo  $&\&p < 0.01$  y  $&&&p < 0.001$ ; y efecto de tratamiento  $\$p < 0.05$ .

- **El tratamiento con resveratrol induce protección contra la pérdida cognitiva en ratones 3xTg-AD**

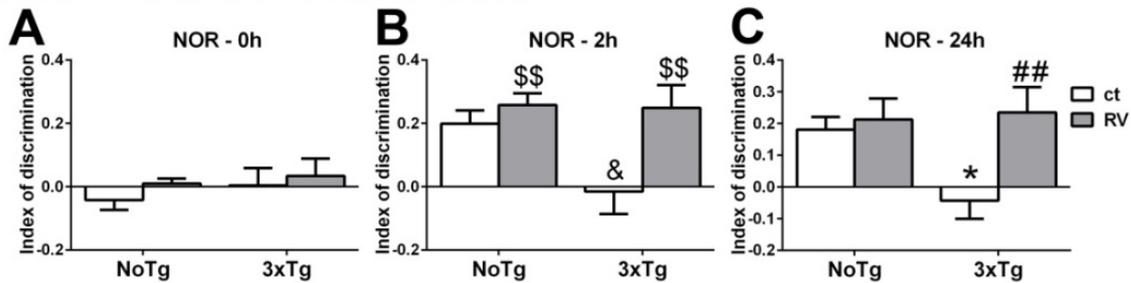
La administración de resveratrol conservó la cognición en ratones 3xTg-RV, además de inducir una mejora de la capacidad de memoria en ratones NoTg-RV (Fig. 10a-e).

En el test de NOR, los ratones 3xTg-ct mostraron un déficit de memoria de reconocimiento, mientras que los ratones NoTg-RV y 3xTg-RV aumentaron su capacidad de recordar objetos familiares a las 2 horas (Fig. 10b) [tratamiento,  $F(1,36) = 8.826$ ,  $p = 0.0053$ ; y genotipo,  $F(1,36) = 4.195$ ,  $p = 0.0479$ ] y a las 24 horas (Fig. 10c) [tratamiento,  $F(1,36) = 6.759$ ,  $p = 0.0134$ ; e interacción tratamiento  $\times$  genotipo,  $F(1,36) = 4.256$ ,  $p = 0.0464$ ].

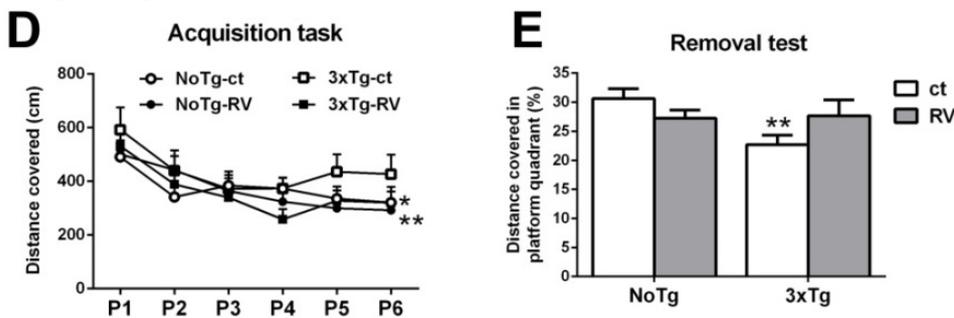
En el ensayo de MWM los ratones NoTg-ct, NoTg-RV y 3xTg-RV redujeron las distancias del recorrido para localizar la plataforma a lo largo de los días (Fig. 10d) [ $F(5,78) = 2.386$ ,  $p = 0.0456$ ;  $F(5,66) = 3.859$ ,  $p = 0.0040$ , y  $F(5,54) = 3.384$ ,  $p = 0.0099$  respectivamente], mientras que los ratones 3xTg-ct no aprendieron durante los días de la adquisición de la memoria [ $F(5,54) = 1.481$ ,  $p = 0.2113$ ]. Al retirar la plataforma ambos grupos NoTg y 3xTg-RV recordaron el cuadrante en el que había estado situada la plataforma (Fig. 10e),

mientras que los ratones 3xTg-ct nadaron al azar sin recordar la posición anterior de la plataforma de escape [interacción tratamiento × genotipo,  $F(1,42) = 4.956$ ,  $p = 0.0315$ ].

**NOVEL OBJECT RECOGNITION**



**MORRIS WATER MAZE**



**Fig. 10** El resveratrol induce neuroprotección. Test de NOR a tiempo 0h (a), 2h (b) y 24h (c). Test de MWM con las distancias recorridas hasta alcanzar la plataforma (d) y la distancia recorrida en el cuadrante de la plataforma (e). Estadística: **b** Two-way ANOVA, efecto de tratamiento \$\$ $p < 0.01$ ; y efecto de genotipo & $p < 0.05$ ; **c, e** Two-way ANOVA, Bonferroni, \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  comparado con NoTg; ## $p < 0.01$  comparado con tratamiento control; **d** One-way ANOVA, Bonferroni, \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  P1 comparado con P6.

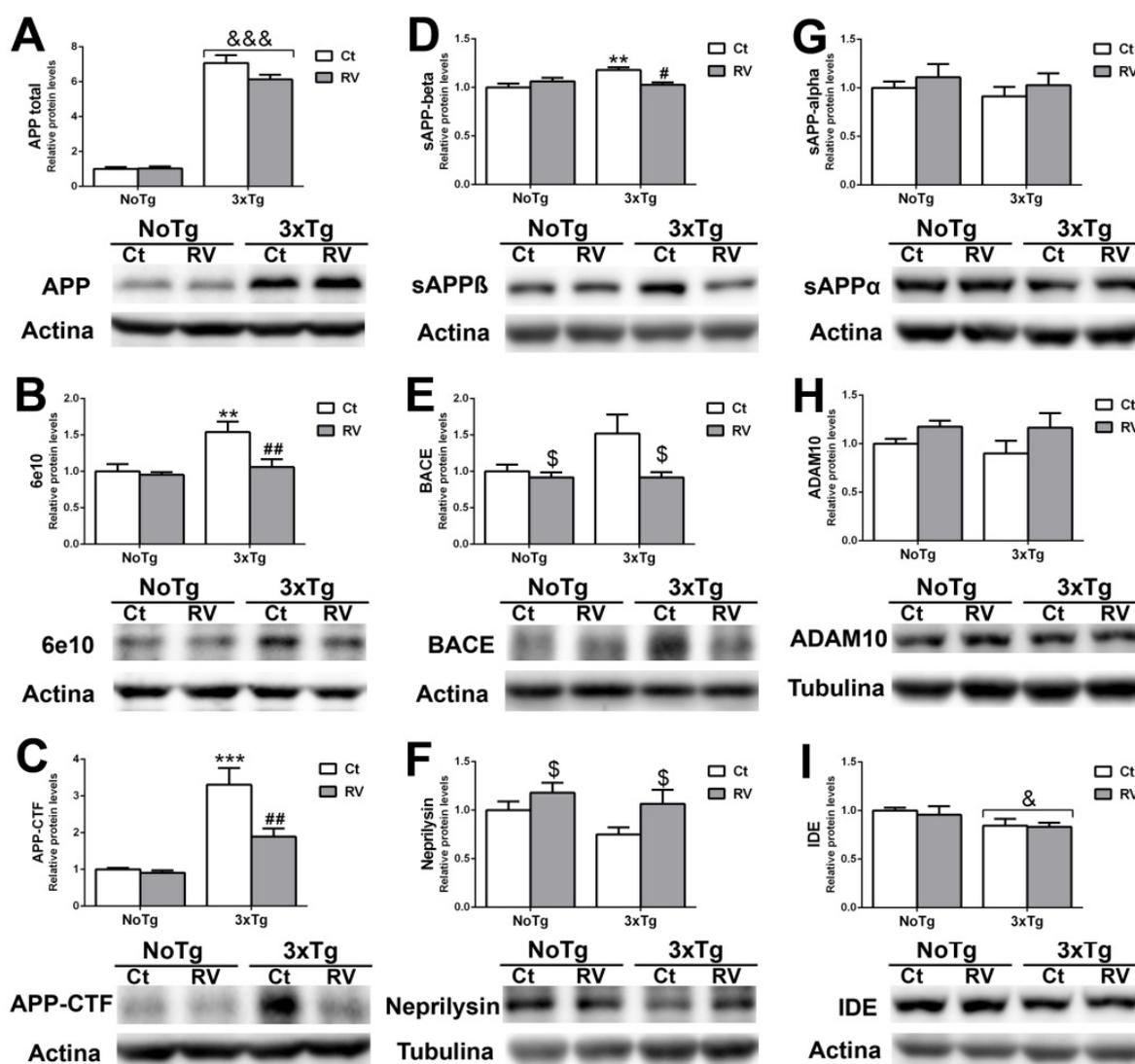
• **La administración de resveratrol protege contra la patología amiloide**

El análisis del extracto proteico mostró que los hipocampos de los ratones 3xTg-AD presentaban unos niveles elevados de la APP total (Fig. 11a) [genotipo,  $F(1,20) = 48.59$ ,  $p < 0.0001$ ], en comparación con los hipocampos de ratones NoTg.

Además, se observaron elevados niveles de los péptidos A $\beta$  (Fig. 11b) [genotipo,  $F(1,15) = 10.45$ ,  $p = 0.056$ ; tratamiento,  $F(1,15) = 6.976$ ,  $p = 0.0185$ ; e interacción genotipo × tratamiento,  $F(1,15) = 4.709$ ,  $p = 0,0465$ ], APP-CTF (Fig. 11c) [genotipo,  $F(1,20) = 41.45$ ,  $p < 0.0001$ ; tratamiento,  $F(1,20) = 8.680$ ,  $p = 0.0080$ ; e interacción genotipo × tratamiento,  $F(1,20) = 6.687$ ,  $p = 0,0177$ ], y sAPP $\beta$  (Fig. 11d) [genotipo,  $F(1,23) = 4.528$ ,  $p = 0.0443$ ; e interacción genotipo × tratamiento,  $F(1,23) = 9.954$ ,  $p = 0,0044$ ] en los hipocampos de ratones 3xTg-ct en comparación con los NoTg.

El tratamiento con resveratrol indujo una disminución de la patología amiloide, ya que normalizó los niveles de A $\beta$ , APP-CTF y sAPP $\beta$  en los ratones 3xTg-RV, debido en gran parte a una disminución de los niveles de la secretasa BACE1 (Fig. 11e) [tratamiento, F(1,19) = 4.993, p = 0.0377] y a un aumento de la proteasa neprilisina (Fig. 11f) [tratamiento, F(1,20) = 5.334, p = 0.0317].

La atenuación de la vía amiloidogénica y el aumento de la proteostasis tuvo efecto en ambas cepas tratadas con resveratrol, sin embargo no se observaron cambios en el péptido sAPP $\alpha$  (Fig. 11g) ni en la secretasa ADAM10 (Fig. 11h). La disminución de A $\beta$  mediante el tratamiento con resveratrol tampoco fue debida a la acción de la proteasa IDE (Fig. 11i).

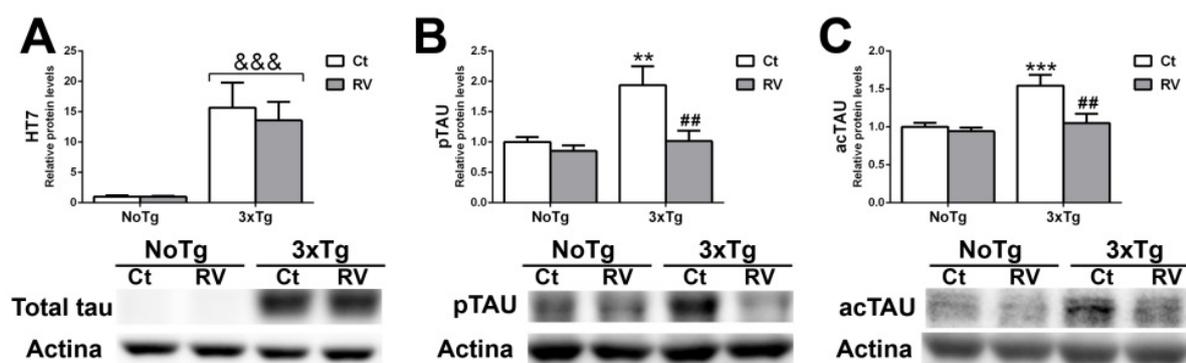


**Fig. 11** El resveratrol protege de la patología amiloide. Análisis de Western blot de APP total (a), A $\beta$  (b), APP-CTF (c), sAPP $\beta$  (d), BACE1 (e), Neprilisina (f), sAPP $\alpha$  (g), ADAM10 (h) e IDE (i) en hipocampos de ratones 3xTg-AD y NoTg. Estadística: **b, c, d** Two-way ANOVA, Bonferroni, \*\*p < 0.01 y \*\*\*p < 0.001 comparado con NoTg; #p < 0.05 y ##p < 0.01 comparado con tratamiento control; **a, e, f, i** Two-way ANOVA, efecto de tratamiento \$p < 0.05; y efecto de genotipo &p < 0.05 y &&&p < 0.001.

- **La administración de resveratrol protege contra la patología tau en ratones 3xTg-AD**

El análisis del extracto proteico mostró que los hipocampos de los ratones 3xTg-ct presentaban unos niveles elevados de la proteína tau total (Fig. 12a) [genotipo,  $F(1,20) = 24.36$ ,  $p < 0.0001$ ], de p-tau (Fig. 12b) [genotipo,  $F(1,24) = 10.72$ ,  $p = 0.0032$ ; tratamiento,  $F(1,24) = 10.11$ ,  $p = 0.0040$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,24) = 5.313$ ,  $p = 0,0301$ ] y de ac-tau (Fig. 12c) [genotipo,  $F(1,25) = 12.53$ ,  $p = 0.0016$ ; tratamiento,  $F(1,25) = 8.924$ ,  $p = 0.0062$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,25) = 5.562$ ,  $p = 0,0265$ ], en comparación con los de ratones NoTg.

El tratamiento con resveratrol protegió de la patología tau, ya que normalizó los niveles de p-tau y ac-tau (Fig. 12b-c) en los ratones 3xTg-RV. La desacetilación de la proteína tau permite que pueda ser degradada mediante el UPS.

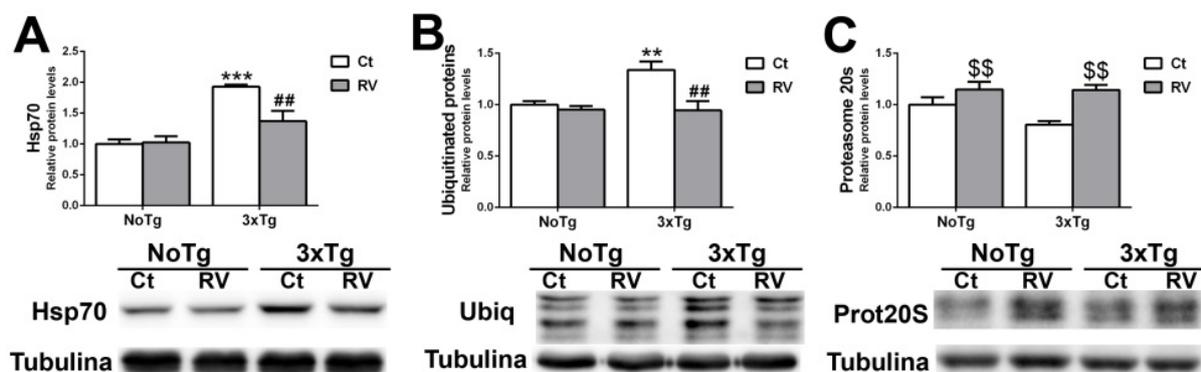


**Fig. 12** El resveratrol protege de la patología tau. Análisis proteico de tau total (a), p-tau (b) y ac-tau (c) en el hipocampo de ratones 3xTg y NoTg. Estadística: a Two-way ANOVA, efecto de genotipo  $\&\&p < 0.001$ ; b, c Two-way ANOVA, Bonferroni,  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$  comparado con NoTg;  $##p < 0.01$  comparado con tratamiento control.

- **Resveratrol aumenta la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma**

Los hipocampos de los ratones 3xTg-AD presentaron una elevada expresión de la proteína Hsp70 (Fig. 13a) [genotipo,  $F(1,20) = 35.84$ ,  $p < 0.0001$ ; tratamiento,  $F(1,20) = 6.283$ ,  $p = 0.0209$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,20) = 7.517$ ,  $p = 0,0126$ ] y de las proteínas ubiquitinadas (Fig. 13b) [genotipo,  $F(1,18) = 5.867$ ,  $p = 0.0262$ ; tratamiento,  $F(1,18) = 10.53$ ,  $p = 0.0045$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,18) = 6.450$ ,  $p = 0,0205$ ] en comparación con los hipocampos NoTg. El tratamiento con resveratrol normalizó los niveles de Hsp70 y de las proteínas ubiquitinadas en los ratones 3xTg-RV.

El tratamiento con resveratrol además indujo una potenciación de la expresión de la subunidad 20S del proteasoma, tanto en los hipocampos de los ratones NoTg-RV como los 3xTg-RV (Fig. 13c) [tratamiento,  $F(1,28) = 12.34$ ,  $p = 0.0015$ ].



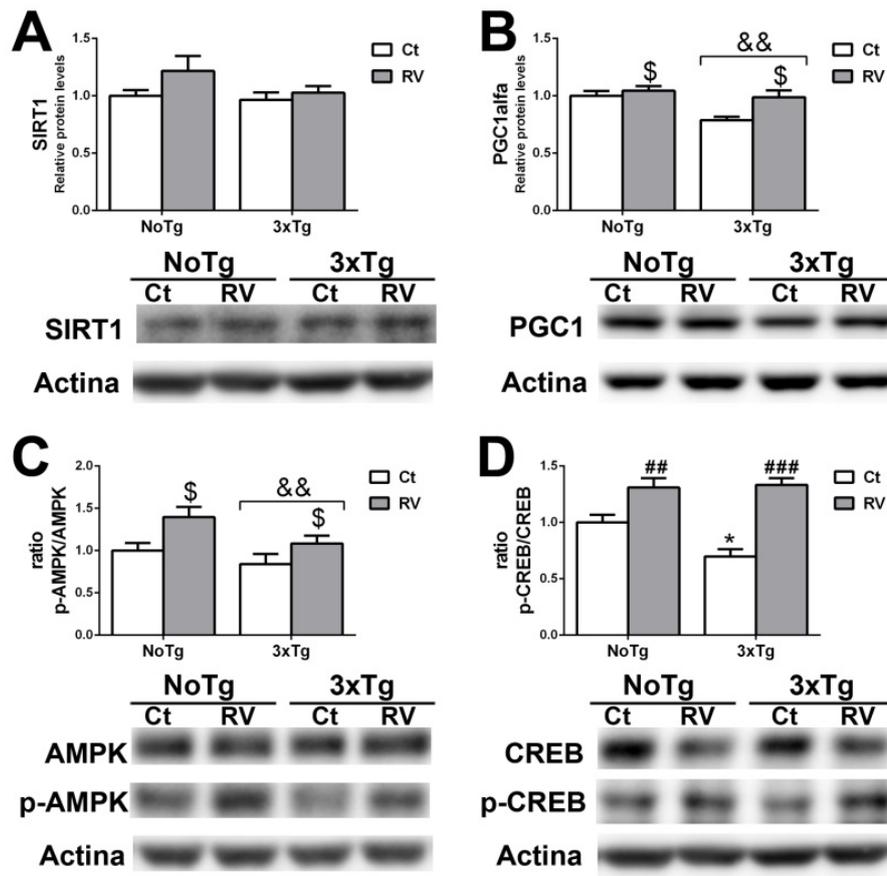
**Fig. 13** El resveratrol aumenta la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma. Análisis proteico de Hsp70 (a), proteínas ubiquitinadas (b) y subunidades del proteasoma 20S (c) en el hipocampo de ratones 3xTg y NoTg. Estadística: a, b Two-way ANOVA, Bonferroni, \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  comparado con NoTg; ## $p < 0.01$  comparado con tratamiento control; c Two-way ANOVA, efecto de tratamiento \$\$\$ $p < 0.001$ , \$\$ $p < 0.01$ .

- **La administración de resveratrol activa las vías reguladoras y efectoras de SIRT1**

No se detectaron variaciones de los niveles de la proteína SIRT1 en el hipocampo de los ratones (Fig. 14a).

Los hipocampos de ratones 3xTg-ct mostraron niveles inferiores de las proteínas PGC-1 $\alpha$  (Fig. 14b) [genotipo,  $F(1,23) = 8.937$ ,  $p = 0.0065$ ; tratamiento,  $F(1,23) = 7.419$ ,  $p = 0.0121$ ], p-AMPK (Fig. 14c) [genotipo,  $F(1,24) = 5.017$ ,  $p = 0.0346$ ; tratamiento,  $F(1,24) = 9.234$ ,  $p = 0.0057$ ] y p-CREB (Fig. 14d) [tratamiento,  $F(1,22) = 45.67$ ,  $p < 0.0001$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,22) = 5.424$ ,  $p = 0.0294$ ] en comparación con los hipocampos de ratones NoTg-ct.

La administración de resveratrol produjo un incremento de los niveles proteicos de PGC-1 $\alpha$ , p-AMPK y p-CREB en ambas cepas de ratón, indicativo de la activación de la vía de SIRT1. Esto es debido a que el aumento de p-AMPK produce un incremento del sustrato NAD<sup>+</sup>, que a su vez aumenta la actividad de SIRT1, acción que posteriormente genera una activación de p-CREB y PGC-1 $\alpha$ .



**Fig. 14** El resveratrol activa la vía de SIRT1 mediante la activación de p- AMPK. Análisis proteico de SIRT1 (a), PGC-1α (b), AMPK y p-AMPK (c), CREB y p-CREB (d) en el hipocampo de ratones 3xTg y NoTg. Estadística: **b**, **c** Two-way ANOVA, efecto de tratamiento \$p < 0.05; efecto de genotipo &&p < 0.01; **d** Two-way ANOVA, Bonferroni, \*p < 0.05 comparado con NoTg; ##p < 0.01 y ###p < 0.001 comparado con tratamiento control.

**ESTUDIO 4:****PROTECCIÓN DE LA PÉRDIDA COGNITIVA POR TRATAMIENTO CON MELATONINA**

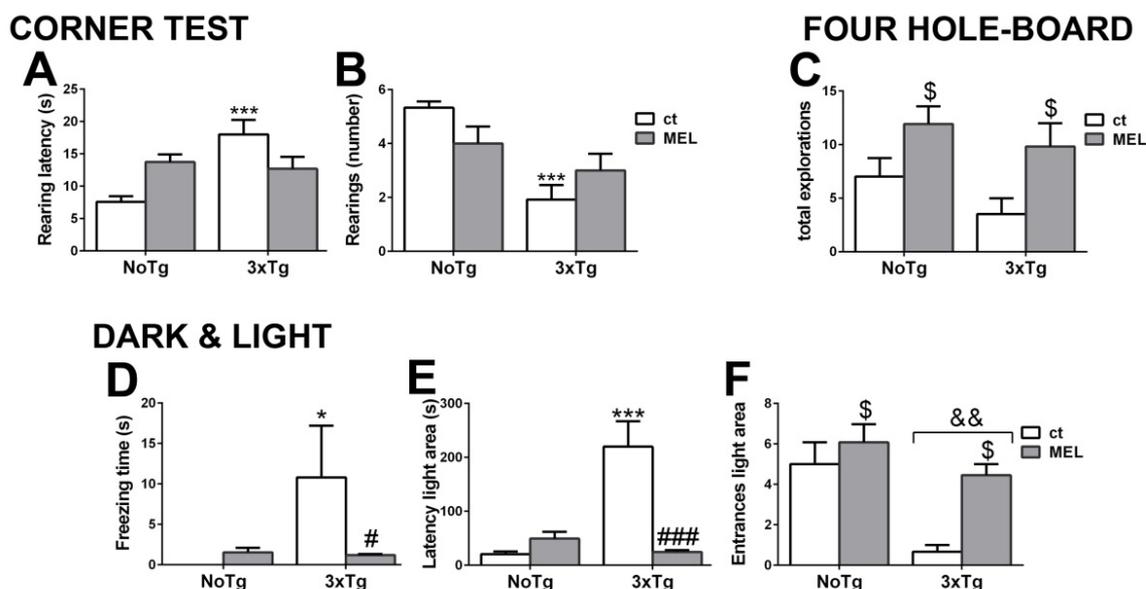
- **El tratamiento con melatonina induce protección contra las alteraciones de comportamiento asociadas a demencia**

La administración de melatonina durante 6 meses indujo protección contra las BPSD en ratones 3xTg-MEL de 12 meses de edad (Fig. 15a-f).

En el ensayo de las esquinas, los ratones 3xTg-ct presentaron una menor actividad exploratoria en comparación con los ratones NoTg (Fig. 15a, b). El tratamiento con melatonina disminuyó la latencia de rearing (Fig. 15a) [genotipo,  $F(1,45) = 8.295$ ,  $p = 0.0061$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,45) = 12.34$ ,  $p = 0,0010$ ] e incrementó el número total de rearings (Fig. 15b) [genotipo,  $F(1,45) = 19.41$ ,  $p < 0.0001$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,45) = 5.797$ ,  $p = 0,0202$ ], aunque no se observó mejora en el número de esquinas exploradas.

En el ensayo de campo abierto no se observaron cambios de comportamiento en los ratones tratados con melatonina. En el ensayo de la tabla de los cuatro agujeros ambas cepas mostraron una mejora exploratoria debida al tratamiento de melatonina, con un aumento del número de exploraciones realizadas (Fig. 15c) [tratamiento,  $F(1,28) = 5.476$ ,  $p = 0.0266$ ] y del tiempo total de exploración [genotipo,  $F(1,28) = 7.091$ ,  $p = 0.0127$ ].

En la prueba de la caja oscura/iluminada, los ratones 3xTg-ct presentaron una mayor latencia de movimiento (Fig. 15d) y mayor latencia de entrada a la zona iluminada (Fig. 15e) en comparación con los ratones NoTg. El tratamiento con melatonina normalizó el tiempo de freezing en los ratones 3xTg-MEL [genotipo,  $F(1,26) = 5.169$ ,  $p = 0.0315$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,26) = 5.884$ ,  $p = 0,0225$ ] y la latencia de entrada a la caja iluminada [genotipo,  $F(1,28) = 15.88$ ,  $p = 0.0004$ ; tratamiento,  $F(1,28) = 14.31$ ,  $p = 0.0008$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,28) = 26.09$ ,  $p < 0.0001$ ], además de aumentar en ambas cepas el número de entradas a la zona iluminada (Fig. 15f) [genotipo,  $F(1,29) = 11.25$ ,  $p = 0.0022$ , y tratamiento,  $F(1,29) = 7.481$ ,  $p = 0.0105$ ].



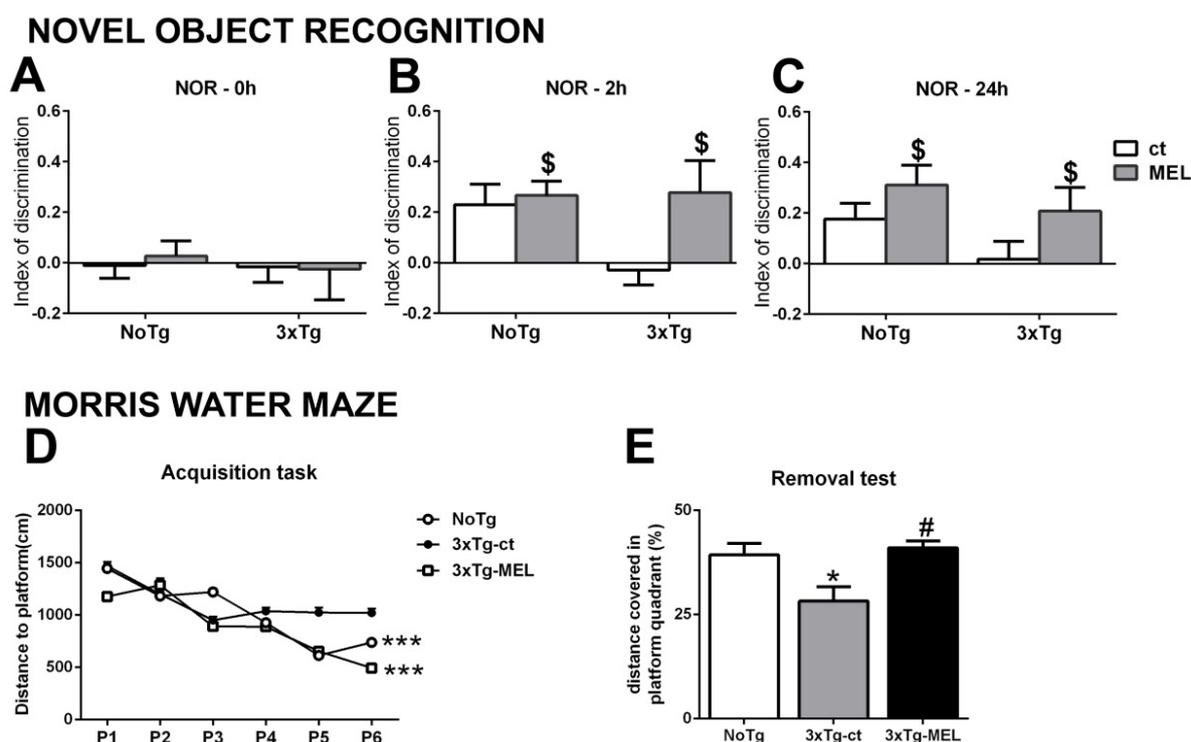
**Fig. 15** La melatonina induce protección contra las BPSD. Latencia de exploración vertical (a) y número de exploraciones verticales (b) en el test de las esquinas. Exploraciones totales en el ensayo de la tabla de los cuatro agujeros (c). Ensayo de la caja oscura/iluminada, con el tiempo de freezing (d), latencia de entrada a la zona iluminada (e) y número de entradas en la zona iluminada (f). Estadística: **a, b, d, e** Two-way ANOVA, Bonferroni, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparado con NoTg; # $p < 0.05$  y ### $p < 0.001$  comparado con tratamiento control; **c, f** Two-way ANOVA, efecto de tratamiento \$ $p < 0.05$ ; y efecto de genotipo && $p < 0.01$

- **La administración de melatonina protege contra la pérdida cognitiva en ratones 3xTg-AD**

La administración de melatonina indujo una acción neuroprotección en los ratones 3xTg-MEL de 12 meses de edad (Fig. 16a-e).

En el ensayo de NOR (Fig. 16a-c) los ratones 3xTg-ct presentaron un déficit de memoria de reconocimiento. La melatonina produjo en los ratones 3xTg-MEL y NoTg-MEL una mejora de la capacidad de recordar objetos familiares, a las 2 horas (Fig. 16b) [tratamiento,  $F(1,48) = 4.182$ ,  $p = 0.0464$ ] y a las 24 horas (Fig. 16c) [tratamiento,  $F(1,48) = 4.632$ ,  $p = 0.0364$ ].

En el test de MWM (Fig. 16d, e) se observó la acción neuroprotectora de la melatonina en los ratones 3xTg-MEL, ya que aprendieron a localizar la posición de la plataforma de forma similar a los ratones NoTg (Fig. 16d) [genotipo,  $F(2,210) = 53.17$ ,  $p < 0.0001$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(10,210) = 16.98$ ,  $p < 0.0001$ ], mientras que los ratones 3xTg-ct no aprendieron. Al retirar la plataforma, los grupos NoTg y 3xTg-MEL recordaron el cuadrante en el que había estado situada la plataforma de escape (Fig. 16e) [ $F(2,31) = 5.315$ ,  $p = 0.0104$ ], mientras que los ratones 3xTg-ct nadaron al azar sin recordar la posición anterior de la plataforma. El test MWM fue reproducido anteriormente (Garcia-Mesa et al., 2012).

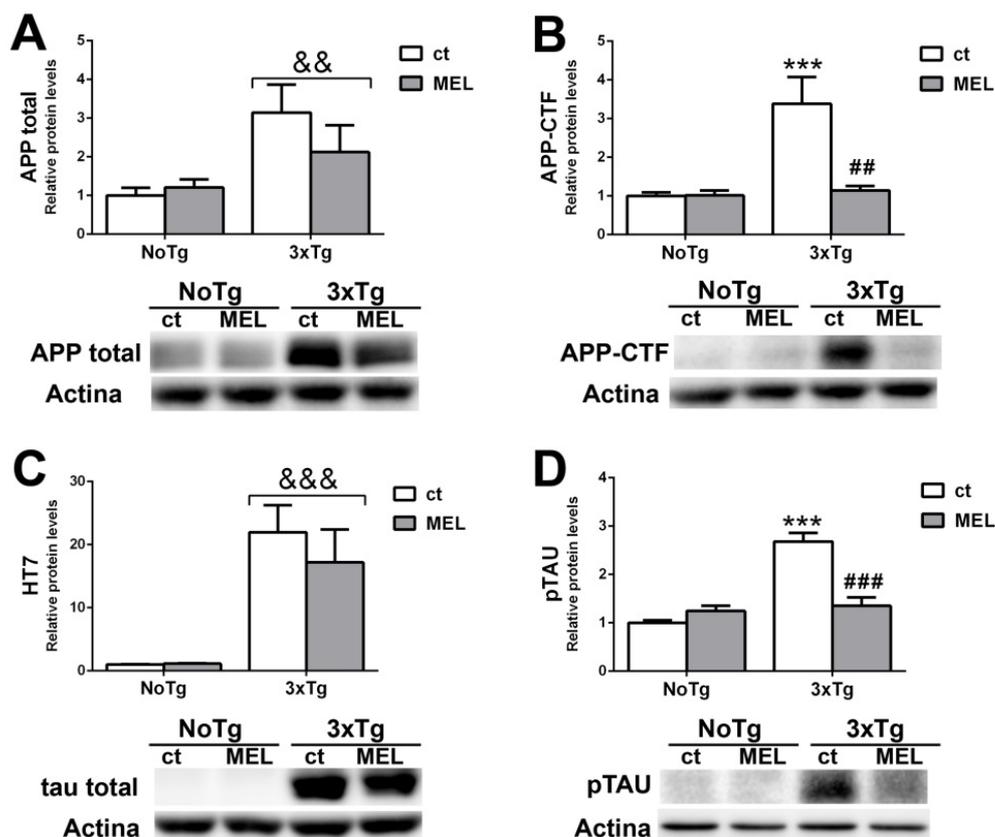


**Fig. 16** La melatonina induce neuroprotección. Test de NOR a tiempo 0h (a), 2h (b) y 24h (c). Test de MWM con las distancias recorridas hasta alcanzar la plataforma (d) y la distancia recorrida en el cuadrante de la plataforma (e). Estadística: a-c Two-way ANOVA, efecto de tratamiento \$p < 0.05; d Two-way ANOVA, Bonferroni, \*\*\*p < 0.001 comparado con ratones 3xTg-ct; e One-way ANOVA, Bonferroni, \*p < 0.05 comparado con NoTg; #p < 0.05 comparado con 3xTg-ct.

- **La administración de melatonina protege contra la patología amiloide y tau en ratones 3xTg-AD**

Mediante técnicas de Western blot se observó que los hipocampos de ratones 3xTg-ct mostraban niveles elevados de APP total (Fig. 17a) [genotipo,  $F(1,29) = 8.745$ ,  $p = 0.0061$ ], APP-CTF (Fig. 17b), tau total (Fig. 17c) [genotipo,  $F(1,32) = 30.09$ ,  $p < 0.0001$ ], y p-tau (Fig. 17d) en comparación con NoTg.

El tratamiento con melatonina normalizó los niveles proteicos de APP-CTF [genotipo,  $F(1,28) = 9.461$ ,  $p = 0.0047$ ; tratamiento,  $F(1,28) = 7.439$ ,  $p = 0.0109$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,28) = 7.655$ ,  $p = 0.0069$ ] y también de p-tau [genotipo,  $F(1,28) = 41.96$ ,  $p < 0.0001$ ; tratamiento,  $F(1,28) = 15.39$ ,  $p = 0.0005$ ; e interacción genotipo  $\times$  tratamiento,  $F(1,28) = 32.45$ ,  $p < 0.0001$ ] en los hipocampos de ratones 3xTg-MEL.

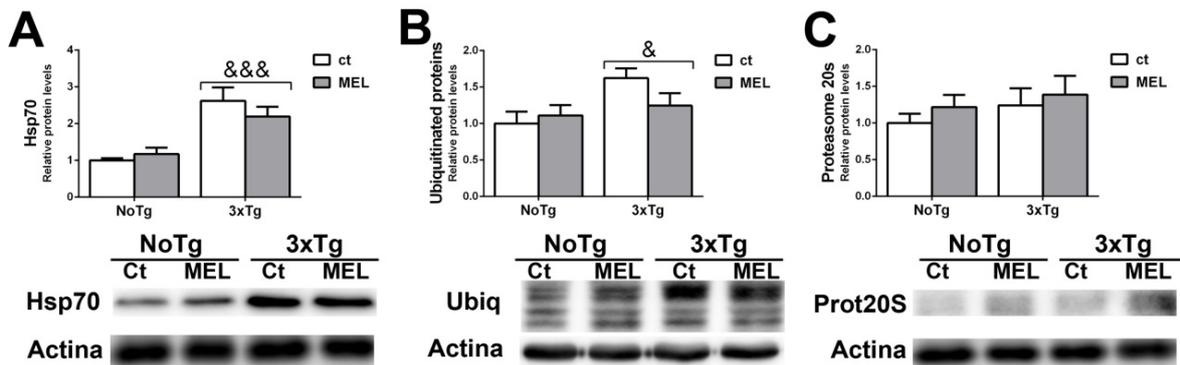


**Fig. 17** La melatonina protege contra la patología amiloide y tau. Análisis proteico de APP total (a), APP-CTF (b), tau total (c) y p-tau (d) en el hipocampo de ratones 3xTg y NoTg. Estadística: a, c Two-way ANOVA, efecto de genotipo  $&&p < 0.01$  y  $&&&p < 0.001$ ; b, d Two-way ANOVA, Bonferroni,  $***p < 0.001$  comparado con NoTg;  $##p < 0.01$  y  $####p < 0.001$  comparado con tratamiento control.

- **La administración de melatonina no modifica el sistema ubiquitina-proteasoma**

Los hipocampos de ratones 3xTg-AD presentaron una elevada expresión de la proteína Hsp70 (Fig. 18a) [genotipo,  $F(1,41) = 28.74$ ,  $p < 0.0001$ ] y de las proteínas ubiquitinadas (Fig. 18b) [genotipo,  $F(1,17) = 6.123$ ,  $p = 0.0242$ ] en comparación con los hipocampos NoTg. Los niveles elevados de Hsp70 y de proteínas ubiquitinadas no se restauraron mediante el tratamiento con melatonina.

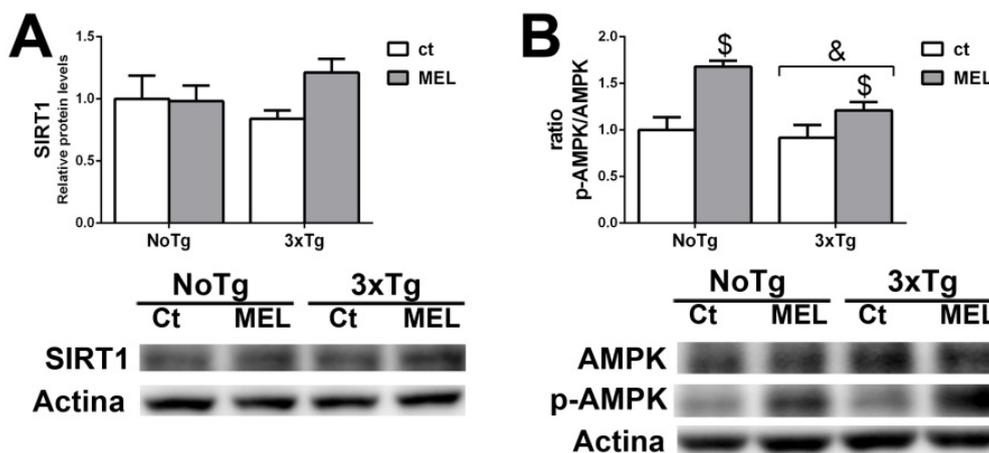
Los niveles proteicos de la subunidad 20S del proteasoma no presentaron variaciones significativas tras el tratamiento con melatonina (Fig. 18c).



**Fig. 18** La melatonina no modifica los niveles de proteínas relacionadas con el sistema ubiquitina-proteasoma. Análisis mediante Western blot de Hsp70 (a), proteínas ubiquitinadas (b) y subunidades del proteasoma 20S (c) en el hipocampo de ratones NoTg y 3xTg-AD. Estadística: Two-way ANOVA, efecto de genotipo &  $p < 0.05$  y &&  $p < 0.01$ .

- **La administración de melatonina activa las vías reguladoras de SIRT1**

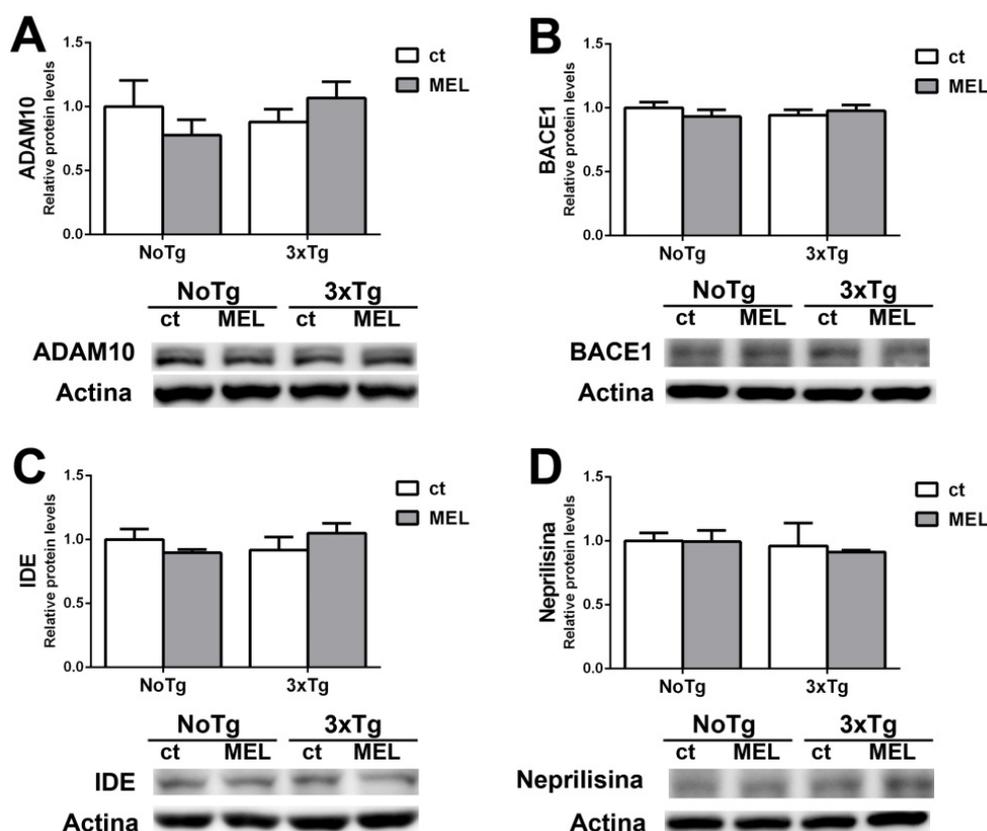
Mediante técnicas de Western blot no se detectaron variaciones de los niveles de la proteína SIRT1 en el hipocampo de los ratones NoTg, ni en los ratones 3xTg-AD (Fig. 19a). Sin embargo, se observó que la administración de melatonina incrementó los niveles proteicos de p-AMPK en ambas cepas de ratón (Fig. 19b) [genotipo,  $F(1,8) = 6.128$ ,  $p = 0.0384$ ; y tratamiento,  $F(1,8) = 18.94$ ,  $p = 0.0024$ ]. El aumento de p-AMPK es indicativo de la activación de la vía de SIRT1, ya que produce un incremento del sustrato  $NAD^+$ .



**Fig. 19** La melatonina activa la vía de SIRT1 mediante la activación de p-AMPK. Análisis proteico de SIRT1 (a), AMPK y p-AMPK (b) en el hipocampo de ratones 3xTg y NoTg. Estadística: Two-way ANOVA, efecto de tratamiento \$  $p < 0.05$ ; efecto de genotipo &  $p < 0.05$ .

- **La administración de melatonina no modifica la proteólisis de APP y A $\beta$**

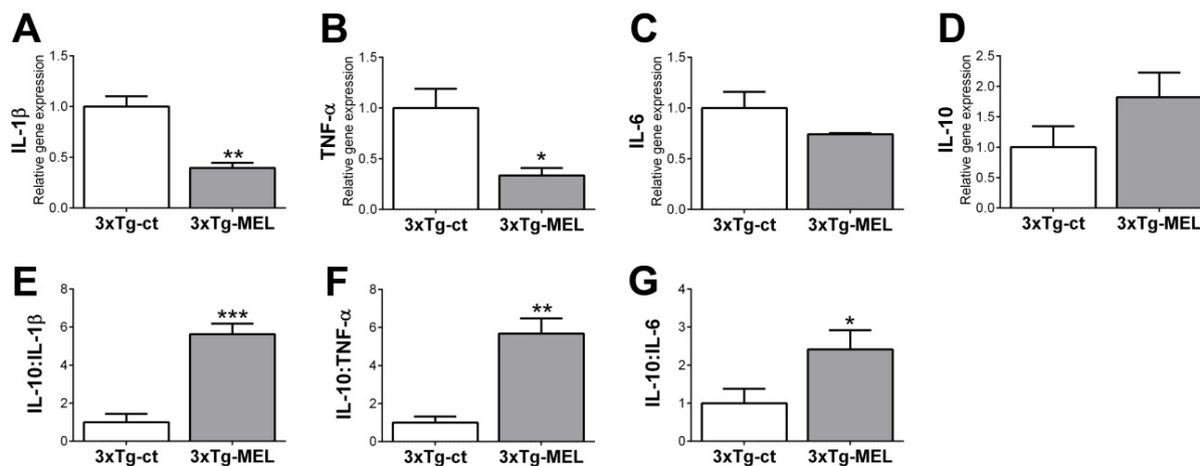
Mediante técnicas de Western blot no se observaron modificaciones en los niveles proteicos de las secretasas ADAM10 (Fig. 20a) y BACE1 (Fig. 20b) en los hipocampos de ratones NoTg y 3xTg-AD. De la misma manera, tampoco se observó variación de las proteínas IDE (Fig. 20c) y neprilisina (Fig. 20d), proteínas con acción degradadora de A $\beta$ .



**Fig. 20** La melatonina no induce cambios en enzimas proteolíticos de APP y A $\beta$ . Análisis mediante Western blot de ADAM10 (a), BACE1 (b), IDE (c) y neprilisin (d) en el hipocampo de ratones NoTg y 3xTg-AD.

- **La melatonina protege contra la neuroinflamación en ratones 3xTg-AD**

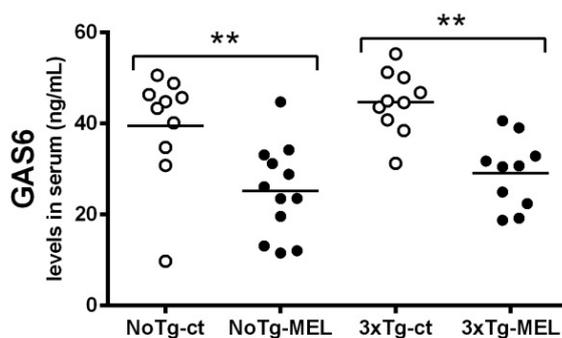
El tratamiento con melatonina indujo una reducción significativa de la expresión génica de los factores proinflamatorios IL-1 $\beta$  (Fig. 21a) [t(5) = 4.739, p = 0.0026] y TNF- $\alpha$  (Fig. 21b) [t(4) = 3.286, p = 0.0152] en el hipocampo de ratones 3xTg-MEL. No se observaron cambios significativos en los niveles de IL-6 (Fig. 21c) e IL-10 (Fig. 21d). En todos los casos, el cálculo de la relación citoquina antiinflamatoria IL-10 con las diversas citoquinas proinflamatorias, demostró la capacidad antiinflamatoria de la melatonina; IL-10:IL-1 $\beta$  (Fig. 21e) [t(5) = 6.688, p = 0.0006], IL-10:TNF- $\alpha$  (Fig. 21f) [t(5) = 5.412, p = 0.0028] e IL-10:IL-6 (Fig. 21g) [t(4) = 2.229, p = 0.0449].



**Fig. 21** La melatonina reduce la inflamación en ratones 3xTg-AD .Expresión génica de IL-1 $\beta$  (a), TNF- $\alpha$  (b), IL-6 (c) e IL-10 (d) en el hipocampo de ratones 3xTg-AD. Ratio de la expresión de IL-10:IL-1 $\beta$  (e),IL-10:TNF- $\alpha$  (f) e IL-10:IL-6 (g). Estadística: t-test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 y \*\*\*p < 0.001 comparado con el grupo control.

- **La administración de melatonina reduce la inflamación sistémica**

Mediante ELISA (DuoSet mGas6 ELISA, I+D) se determinaron los niveles de Gas6 en el suero sanguíneo de ratones NoTg-MEL y 3xTg-MEL (Fig. 22). La administración de melatonina produjo una disminución de los niveles de Gas6 en ambas cepas [F(3, 38) = 9,850, p < 0,0001], indicando que produce una reducción generalizada de la inflamación y una disminución de los mecanismos inflamatorios.



**Fig. 22** La melatonina reduce la inflamación sistémica en ratones NoTg y 3xTg-AD. Niveles de Gas6 en suero sanguíneo de ratones NoTg y 3xTg-AD. Estadística: One-way ANOVA, Bonferroni, \*\*p < 0.01 comparado con el grupo indicado.



# **DISCUSIÓN**



En esta tesis se confirma la existencia de un importante vínculo entre la proteína SIRT1 y la neuroprotección y se describen nuevas vías efectoras. A lo largo de los tres estudios que componen esta tesis se han investigado los efectos neuroprotectores de la sobreexpresión de SIRT1 *in vivo* e *in vitro* a través del uso de vectores lentivirales (Corpas et al., 2016) y de la activación de SIRT1 *in vivo* mediante la administración de los compuestos resveratrol y melatonina (publicaciones en preparación). La activación de la vía de SIRT1 ha inducido niveles extraordinariamente elevados de protección contra la pérdida cognitiva y neuropatología AD en el modelo de ratón 3xTg-AD. Sumamente importante es también el hallazgo de efectos pro-cognitivos en ratones control, no previamente descrito. En cuanto a los mecanismos implicados se han hecho también nuevos hallazgos basados en la mejora de la proteostasis y el neurotrofismo. Los resultados obtenidos refuerzan también la implicación del resveratrol y la melatonina en la modulación de la vía de SIRT1.

### **Comportamiento cognitivo y no cognitivo**

El aprendizaje y la memoria espacial detectados en el test de MWM se consideran asociados al funcionamiento óptimo de circuitos hipocampales (Riedel et al., 1999; Laeremans et al., 2015). En la memoria de reconocimiento de objetos detectados en el test de NOR también está implicado el hipocampo (Assini et al., 2009; Broadbent et al., 2010). El análisis de la expresión génica de SIRT1 en el hipocampo de los ratones 3xTg-AD transducidos con lenti-SIRT1 o con lenti-GFP ha confirmado la deficiencia de SIRT1 en este modelo animal, previamente descrita por técnicas de inmunodetección por Western blot (Revilla et al., 2014a). Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de SIRT1 en el hipocampo induce total protección frente a la pérdida cognitiva en los ratones 3xTg-AD y efectos de mejora de la memoria en ratones control en ambos ensayos.

El hipocampo es una zona afectada de forma selectiva por AD (Mu and Gage, 2011), y el deterioro de los circuitos hipocampales contribuye en gran medida a los efectos devastadores de la pérdida de memoria en la enfermedad (Apostolova et al., 2015). No existían estudios previos de sobreexpresión de SIRT1 específicamente en el hipocampo, aunque en un modelo de ratón transgénico de SIRT1 cuya sobreexpresión incluía zonas del hipocampo no se detectaron efectos similares de incremento de memoria (Oberdoerffer et al., 2008). Los tratamientos con resveratrol y melatonina también fueron totalmente protectores contra la pérdida cognitiva en los ratones modelo de AD. La neuroprotección de

resveratrol contra el deterioro cognitivo en ratones 3xTg-AD confirma estudios previos en ratones SAMP8 modelo de envejecimiento patológico y AD (Liu et al., 2012; Porquet et al., 2013) y en ratones doble transgénicos de AD APP/PS1 (Porquet et al., 2014).

También la protección por melatonina confirma nuestro estudio previo en 3xTg-AD (García-Mesa et al., 2012) y estudios de otros autores indicando la presencia de mejoras cognitivas en SAMP8 (Cheng et al., 2008; Gutierrez-Cuesta et al., 2008) y otros modelos transgénicos de AD, APP695 (Feng et al., 2004) y APP/PS1 (Olcese et al., 2009). En el presente estudio también hemos detectado un efecto pro-cognitivo de resveratrol y melatonina en ratones control, aunque menos potente que con la sobreexpresión de SIRT1 en hipocampo. Así, la mejora generalizada de memoria se detectó en el test NOR a las 2 h pero no en el test más estresante y complejo de MWM.

Junto a la protección contra la pérdida cognitiva, la activación de la vía de SIRT1 protegió contra las alteraciones de comportamiento de neofobia, ansiedad, apatía, etc. que componen los comportamientos de tipo BPSD. Los BPSD son principalmente impulsados por la patología AD en las áreas cerebrales corticales y los ganglios basales, indicando un efecto de los beneficios inducidos por activación de SIRT1 en todo el cerebro. Estos síntomas neuropsiquiátricos son muy prevalentes en los enfermos de AD y una fuente importante de carga física y psicológica para los cuidadores (Shin et al., 2005), con lo cual una terapia integral cognitiva y no cognitiva es muy importante. Cabe destacar que se ha detectado también una mejor respuesta en los animales control, indicando que los tratamientos ensayados permiten una mejor gestión de las situaciones de estrés y mayor interacción con los estímulos externos. La protección contra los comportamientos de tipo BPSD resultó igualmente potente con los tres tratamientos de sobreexpresión génica de SIRT1 y de administración de resveratrol y melatonina en la dieta.

En conjunto, considerando los resultados de comportamiento cognitivo y no cognitivo, se ha demostrado un efecto preventivo y terapéutico de la activación de SIRT1 contra la demencia de AD. Los beneficios en la actividad neuronal demostrados en los ratones de cepa control sugieren un aumento de resiliencia cerebral que disminuiría el riesgo de AD.

### **Neuropatología**

El análisis de los cambios cerebrales que sustentan la neuroprotección inducida por activación de SIRT1 en ratones 3xTg-AD, ha demostrado la disminución de la patología amiloide y tau hasta niveles prácticamente indistinguibles de los del cerebro de la cepa control. Los resultados de inmunodetección por Western blot de fragmentos amiloidogénicos

(A $\beta$  y CTF) son concluyentes de protección total en todos los tratamientos ensayados. Los efectos se corroboraron por inmunohistoquímica en el hipocampo de ratones que sobreexpresaban SIRT1. Esta reducción de los péptidos tóxicos intraneuronales y también segregados al parénquima cerebral y a las sinapsis, en los estadios de patología estudiados, es muy importante para evitar la disfuncionalidad neuronal. La lucha contra el exceso cerebral de A $\beta$  es uno de los principales objetivos de las terapias en estudio clínico (Selkoe and Hardy, 2016). Igualmente se demostró una disminución a niveles controles de p-tau en los tres tratamientos ensayados, que se amplió al estudio de ac-tau en el estudio de sobreexpresión de SIRT1 y el de suplementación de la dieta con resveratrol. En todos los casos, se observó una total normalización de la proteína tau que sugiere la funcionalidad correcta de los microtúbulos neuronales. Tau es una de las dianas terapéuticas en AD (Avila et al., 2016). La disminución de la patología amiloide y tau también se hizo patente en el modelo *in vitro* de AD desarrollado con neuronas de 3xTg-AD. Estos resultados confirman nuestros resultados previos con melatonina en 3xTg-AD (Garcia-Mesa et al., 2012) y publicaciones de otros autores que describieron que melatonina reducía los niveles de A $\beta$  en ratones de AD Tg2576 (Matsubara et al., 2003) y de placas amiloideas en ratones APP/PS1 (Olcese et al., 2009), y p-tau en ratones SAMP8 (Gutierrez-Cuesta et al., 2007; Caballero et al., 2008); y resveratrol inducía una disminución de placas amiloideas en APP/PS1 (Porquet et al., 2014) y de los niveles de A $\beta$  en líneas celulares transfectadas con APP mutada (Marambaud et al., 2005). Un efecto directo de la inyección de lentivirus expresando SIRT1 sobre la patología tau fue también observado en un modelo de tauopatía por inducción de p25 (Kim et al., 2007).

### **Proteostasis**

El ratón 3xTg-AD usado en esta tesis modela las dos patologías, amiloide y tau. El grado máximo de protección observada frente a la presencia de ambos tipos de proteínas anormales generadas por transgenes específicos, indica un elevado grado de respuesta funcional de los mecanismos de proteostasis celular. A este respecto hemos comprobado que la sobreexpresión de SIRT1 activa la vía no amiloidogénica de procesamiento de la APP mediante el incremento de ADAM10. El análisis de enzimas procesadores de A $\beta$  nos ha llevado a descubrir que SIRT1 activa la enzima IDE y el proteasoma. Aumentando su catabolismo, SIRT1 disminuye la acumulación del péptido A $\beta$  generado por la vía amiloidogénica. IDE se ha descrito como un enzima que proteoliza A $\beta$  (Himeno et al., 2011). Ratones deficientes en ADAM10 (Epis et al., 2010) e IDE (Farris et al., 2003) han mostrado un aumento de la acumulación cerebral de A $\beta$  endógena. En cuanto al

procesado de la proteína tau, se ha comprobado que SIRT1 induce la desacetilación de tau, de manera que favorece la degradación de p-tau mediante la vía del proteasoma. Ratones con delección de SIRT1 experimentan una acumulación de ac-tau en el cerebro (Min et al., 2010; Min et al., 2015). La sobreexpresión de SIRT1 normalizó los niveles de la proteína 20S del proteasoma y de las proteínas ubiquitinadas en los cultivos neuronales 3xTg-AD, lo que sugiere una recuperación de la funcionalidad de UPS. Además, por estudios en líneas celulares deficientes en SIRT1, se conoce que SIRT1 participa en el mantenimiento de control de calidad de las proteínas mediado por Hsp70 (Tomita et al., 2015). La chaperona Hsp70 interviene en la degradación de proteínas aberrantes mediante la interacción con la proteína CHIP y la ligasa de ubiquitina E3 (Westerheide et al., 2009). El aumento de los niveles de la Hsp70 facilita la ligación de las proteínas mal plegadas a la ubiquitina para su posterior degradación, de modo que disminuye A $\beta$  y p-tau (Petrucci et al., 2004). La proteólisis de A $\beta$  es compleja, en su procesamiento independiente de proteasoma puede intervenir IDE, neprilisina y otros enzimas cuya participación *in vivo* no se ha aclarado (Wang et al., 2006). Sin embargo, UPS es el principal sistema proteolítico que degrada proteínas aberrantes, incluyendo A $\beta$  y p-tau (Ciechanover and Kwon, 2015).

En el estudio de activación de SIRT1 por tratamiento con resveratrol, el incremento producido de los niveles de las proteínas del proteasoma en el tejido cerebral conduciría a la degradación total de las proteínas aberrantes A $\beta$  y p-tau, de modo que las proteínas ubiquitinadas y de Hsp70 se restauran a los niveles basales. La disminución de ac-tau por resveratrol indica que se ha inducido la activación de desacetilación por SIRT1. Resveratrol también indujo un aumento de niveles de la enzima neprilisina. A destacar el incremento del proteasoma y de neprilisina en la cepa de ratones control que induciría resiliencia contra la acumulación de proteínas anormales. Es interesante destacar que el resveratrol también sería activo en disminuir la vía amiloidogénica y en activar la vía no amiloidogénica del procesado de APP. Efectivamente, aunque el incremento de ADAM10 es solo una tendencia no estadísticamente significativa, se detecta una disminución de BACE1 que es generalizada para ambas cepas de ratones, contribuyendo a la neuroprotección y a la resiliencia cerebral. Por lo tanto, resveratrol actuaría activando la proteólisis y restaurando la proteostasis celular. Estos hallazgos en el ratón 3xTg-AD confirman los resultados obtenidos en un estudio con el modelo AD del gusano *C.elegans* transgénico para la expresión de A $\beta$  en músculo. Estos autores demostraron que resveratrol inhibía la parálisis que constituye el fenotipo de este modelo a través de su

acción sobre la actividad proteasomal y otras vías de proteólisis de A $\beta$  (Regitz et al., 2016).

En el estudio con melatonina no hemos detectado cambios significativos en los mecanismos de proteostasis estudiados que indiquen un aumento de vías de degradación de las proteínas A $\beta$  y p-tau generadas en el modelo 3xTg-AD. Tampoco se han detectado cambios en las vías de degradación de la APP. El potente poder antioxidante de la melatonina (Reiter et al., 2000), junto con las ligeras tendencias observadas en el sistema UPS, podría explicar la mejora de la patología cerebral de amiloide y tau.

La pérdida de proteostasis aumenta el riesgo de AD, lo que representa un vínculo claro de esta enfermedad neurodegenerativa con los procesos de envejecimiento (Vilchez et al., 2014). Hemos visto en la introducción de esta tesis como la pérdida de proteostasis es uno de los marcadores moleculares del envejecimiento. La vía de SIRT1 podría tener un papel relevante contra este colapso de los sistemas de proteostasis (Sampaio-Marques and Ludovico, 2015). La activación de sistemas de defensa contra la acumulación de proteínas aberrantes es una línea de investigación importante para aumentar la resiliencia contra la neurodegeneración (Deger et al., 2015; Sulistio and Heese, 2016; Yerbury et al., 2016).

### **Neuroinflamación**

El aumento de los procesos inflamatorios tiene un papel determinante en el desarrollo y progresión de AD (McGeer et al., 2016). Hemos comprobado el poder antiinflamatorio de la melatonina (Hu et al., 2016) en los ratones 3xTg-AD. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 son mediadores bien establecidos de los procesos inflamatorios, y su disminución determinará un efecto beneficioso contra la neuroinflamación. Además el incremento de IL-10 puede suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias. Esta acción antiinflamatoria de la melatonina podría deberse al menos parcialmente a la activación de la vía de SIRT1 y subsecuente modulación de NF- $\kappa$ B. A este respecto, se ha descrito que el tratamiento con melatonina disminuye la activación de NF- $\kappa$ B en ratones viejos (Mukda et al., 2016).

La administración de melatonina determina un perfil favorable como posible terapia antiinflamatoria para la prevención de las enfermedades asociadas con la edad que cursan con neuroinflamación, como es la AD.

### Neurotrofismo

El aumento de los niveles de factores neurotróficos es un factor importante para la supervivencia de las neuronas y para mejorar la plasticidad sináptica. Ratones deficientes para SIRT1 muestran defectos en plasticidad sináptica (Michan et al., 2010). La sobreexpresión de SIRT1 en el hipocampo de ratones 3xTg-AD indujo un aumento de la expresión génica de los factores neurotróficos BDNF, GDNF y VEGF-A. BDNF es un regulador crucial de los mecanismos de plasticidad sináptica que intervienen en el aprendizaje y la memoria (Cunha et al., 2010), y sus niveles están disminuidos en los cerebros con Alzheimer (Connor et al., 1997), mientras que la sobreexpresión induce neuroprotección (Nagahara et al., 2009). GDNF es un factor neurotrófico menos estudiado en AD, pero también se ha demostrado como potente agente neuroprotector contra la pérdida cognitiva en ratones 3xTg-AD por sobreexpresión en hipocampo (Revilla et al., 2014b). El incremento de VEGF-A induciría angiogénesis que es un proceso íntimamente ligado a los mecanismos de plasticidad cerebral. Además, se ha propuesto que VEGF-A protegería las células endoteliales contra A $\beta$  (Religa et al., 2013). Es interesante destacar que la neuroprotección de BDNF contra la atrofia neuronal y la pérdida cognitiva en ratones transgénicos de AD tiene lugar por mecanismos independientes de cualquier efecto sobre los depósitos cerebrales de A $\beta$  (Nagahara et al., 2009). Por tanto, el incremento de neurotrofismo sería un efecto complementario con la mejora de proteostasis.

Por otra parte, la sobreexpresión de SIRT1 en las neuronas cultivadas mejoró el crecimiento de neuritas, la complejidad del árbol dendrítico, la densidad de espinas dendríticas, y la supervivencia, confirmando los efectos de neurotrofismo previstos a partir de los resultados *in vivo* y también trabajos previos *in vitro* (Guo et al., 2011; Codocedo et al., 2012; Godoy et al., 2014). El incremento de BDNF y de GDNF, del marcador sináptico PSD95 y del marcador de neuritas MAP2, detectado en los cultivos neuronales transducidos con lenti-SIRT1 fue significativo por igual en neuronas de ratones de la cepa control y de 3xTg-AD. Por tanto, la mejora del neurotrofismo permitiría un aumento de la capacidad de resiliencia contra la neurodegeneración, además de un efecto neuroprotector directo. En concreto para los efectos de plasticidad mediados a través de BDNF, se han propuesto dos mecanismos, ya sea desacetilación de TORC1 (del inglés, *CREB-regulated transcription coactivator 1*) con la consiguiente activación de CREB (Jeong et al., 2012) o la inhibición de miR-134 (Gao et al., 2010). El tratamiento con resveratrol demostró un aumento de p-CREB, indicador de la activación de este factor de transcripción. También está descrito que la melatonina activa la vía de señalización de CREB (Liu et al., 2016). Deficiencias en la señalización de CREB se han relacionado con procesos neurodegenerativos y AD (Saura and Valero, 2011).

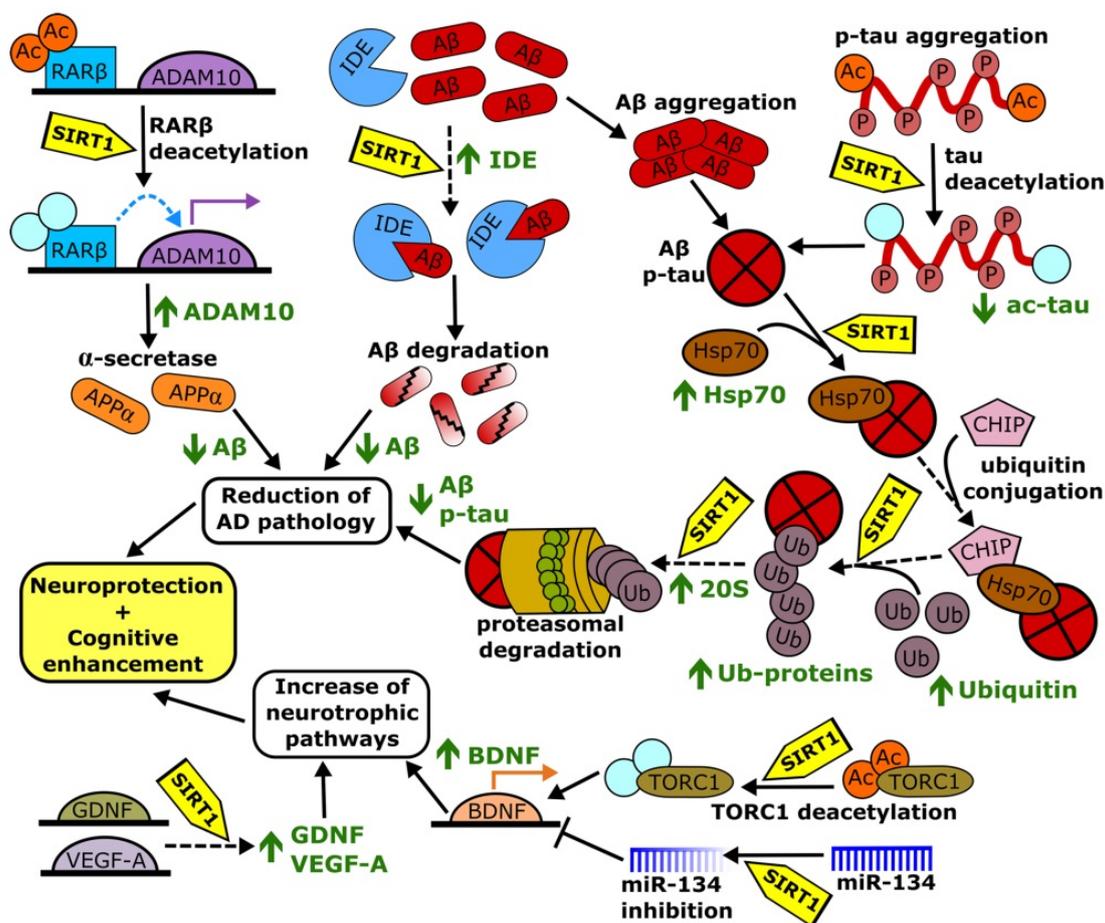
Los resultados de neurotrofismo obtenidos sugieren que la activación de SIRT1 tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la plasticidad sináptica y la protección de las sinapsis. La disminución de la plasticidad de las espinas dendríticas y de la capacidad de establecer nuevas sinapsis es un primer paso importante en la disminución de las capacidades cognitivas en el envejecimiento (van der Zee, 2015). El envejecimiento sináptico aumentaría el riesgo de AD, ya que el estado de activación de las sinapsis puede afectar directamente a la homeostasis de A $\beta$  y tau (Tampellini, 2015).

### **Mitocondria**

La disfunción mitocondrial es otro de los marcadores moleculares del envejecimiento que permite establecer una conexión entre envejecimiento y riesgo de AD. Los fallos mitocondriales inducirían estrés oxidativo y deficiencias energéticas con lo cual están íntimamente relacionados con las pérdidas funcionales en el envejecimiento y en AD (Cadonic et al., 2016; Huang et al., 2016). Una de las dianas antienvjecimiento de SIRT1 es la mitocondria. SIRT1 puede regular la biogénesis mitocondrial y la mitofagia, contribuyendo al mantenimiento de mitocondrias funcionales (Tang, 2016). La mitocondria también es una diana de los efectos protectores de melatonina (Ganie et al., 2016) y resveratrol (Valenti et al., 2016). En esta tesis no se ha analizado la funcionalidad mitocondrial, aunque por estudios anteriores conocemos las deficiencias de complejos mitocondriales en ratones 3xTg-AD (Garcia-Mesa et al., 2012) y los niveles elevados de lesiones oxidativas y alteraciones de enzimas antioxidantes (Garcia-Mesa et al., 2011; Garcia-Mesa et al., 2015). La demostración de la activación de PGC-1 $\alpha$  (Sweeney and Song, 2016) y AMPK (Price et al., 2012) en los ratones tratados con resveratrol corrobora la activación de mecanismos sensores del estado metabólico y mitocondrial que inducirán las vías efectoras de protección de las mitocondrias. Por otra parte la melatonina restauró las deficiencias mitocondriales en los ratones 3xTg-AD (Garcia-Mesa et al., 2012).

### **Mecanismos mediados por SIRT1**

Una representación esquemática de los mecanismos propuestos activados por la sobreexpresión de SIRT1 en este estudio se muestra en la figura 23. Por lo tanto, el doble efecto de mejora y protección neuronal contra la AD como patología convierte la vía de SIRT1 en un objetivo prometedor para el desarrollo de tratamientos preventivos o terapéuticos contra la fragilidad y la demencia.



**Fig. 23** Propuesta de las vías implicadas en los efectos neuroprotectores y de mejora cognitiva por sobreexpresión de SIRT1. Representación esquemática de los mecanismos regulados por SIRT1, ya sean conocidos (flechas negras) o descubiertos aquí (flechas negras punteadas). Ver texto para la discusión de los mecanismos. La sobreexpresión de SIRT1 en neuronas de ratón condujo a una reducción en la patología similar a la AD y a una función neuronal reforzada.

Esta tesis se ha centrado en el estudio de los mecanismos neuroprotectores de la vía de SIRT1. Resveratrol y melatonina son activadores de SIRT1, pero son moléculas de actividad pleiotrópica y no se puede descartar la contribución de efectos independientes de SIRT1 en su actividad neuroprotectora en los ratones 3xTg-AD. En un sistema experimental de fragilidad neuronal *in vitro*, la protección por ambos agentes se inhibía solo parcialmente con un inhibidor de SIRT1 (Cristofol et al., 2012). Entre los posibles efectos del resveratrol y la melatonina, se puede considerar la contribución de un efecto directo antioxidante de estos compuestos, dado que la patología en este modelo animal cursa con marcado estrés oxidativo cerebral (García-Mesa et al., 2015).

Mediante las dos estrategias utilizadas, la sobreexpresión de SIRT1 y su modulación farmacológica por resveratrol y melatonina, se ha demostrado una protección contra la pérdida de memoria en los ratones modelo de Alzheimer 3xTg-AD, además de una mejora

cognitiva en los ratones normales. Los cultivos de neuronas de ratones 3xTg-AD muestran rasgos de patología AD, y mediante la sobreexpresión de SIRT1 hemos descubierto nuevas vías de neuroprotección de SIRT1.

### **Clínica**

Previamente los tratamientos con resveratrol y melatonina han estado muy poco estudiados en modelos animales de AD, como hemos descrito, pero ya se han realizado ensayos clínicos de como suplementos dietéticos en pacientes de AD y en pacientes con pérdida cognitiva leve. En Alzaforum ([www.alzform.org/therapeutics](http://www.alzform.org/therapeutics)) existen actualmente registrados dos estudios con melatonina y uno con resveratrol. En los estudios clínicos finalizados hasta la fecha no se detectaron beneficios cognitivos con resveratrol en 6 estudios (Mazzanti and Di Giacomo, 2016) o con melatonina en 7 estudios publicados (Wang et al., 2016). Sin embargo, la falta de resultados positivos en los ensayos clínicos de AD se atribuye en general a la dificultad de superar la patología AD en grado avanzado. La tendencia actual es a intentar realizar los ensayos en fases muy incipientes de pérdida cognitiva y si es posible en la fase preclínica. El uso de ratones modelo de AD nos permite analizar fases de la enfermedad tempranas e incluso asintomáticas, con lo cual los tratamientos altamente beneficiosos en estos modelos animales son prometedores como preventivos para disminuir el riesgo de AD o como modificadores del curso de la enfermedad si se inician con antelación suficiente. La síntesis de nuevas moléculas activadoras de SIRT1 es un área de investigación muy activa. Se están desarrollando activadores de SIRT1 con la idea de luchar contra el envejecimiento y aumentar la longevidad (Wang et al., 2010; Mitchell et al., 2014), que podrían ensayarse contra la demencia.

### **Epílogo**

SIRT1 induce efectos neuroprotectores muy potentes, de modo que es una diana farmacológica para poder obtener un envejecimiento saludable y prevenir los procesos neurodegenerativos. Los resultados de esta tesis sugieren que los efectos anti-demencia y pro-cognitivos obtenidos en las pruebas de comportamiento, además del incremento de la funcionalidad de la sinapsis neuronal por acción neurotrófica, están relacionados con los mecanismos que favorecen la activación de SIRT1. Finalmente, proponemos que los niveles de los factores neurotróficos y de la actividad de los enzimas clave de los mecanismos proteostáticos pueden ser biomarcadores útiles de la adquisición de la capacidad de recuperación neuronal frente al estrés y las lesiones, y ayudará a luchar contra la fragilidad del cerebro en el envejecimiento.



# **CONCLUSIONES**



1. La sobreexpresión de SIRT1 en el hipocampo de ratones 3xTg-AD protege contra la pérdida cognitiva y las alteraciones de comportamiento asociadas a demencia. Además, la sobreexpresión de SIRT1 induce mejora cognitiva en los ratones de la cepa control.
2. La sobreexpresión de SIRT1 protege contra la patología amiloide y tau en tejido de hipocampo y en cultivos neuronales de ratones 3xTg-AD.
3. SIRT1 incrementa los niveles de proteínas implicadas en la proteólisis de proteínas aberrantes y potencia la vía no amiloidogénica de procesamiento de la APP, tanto en el hipocampo como en cultivos neuronales 3xTg-AD. SIRT1 también induce un incremento de vías proteolíticas en cultivos neuronales control.
4. SIRT1 incrementa los niveles de factores neurotróficos en hipocampo y en cultivos neuronales 3xTg-AD. También se produce un incremento en cultivos de neuronas de ratones control.
5. SIRT1 induce un incremento de marcadores de plasticidad neuronal en cultivos de neuronas de ratones 3xTg-AD y control.
6. La administración con la dieta de resveratrol y melatonina protege a los ratones 3xTg-AD contra la pérdida cognitiva y las alteraciones de comportamiento asociadas a demencia. Resveratrol y melatonina también inducen mejora cognitiva en los ratones de la cepa control.
7. Resveratrol y melatonina protegen contra la patología amiloide y tau en tejido de hipocampo de ratones 3xTg-AD.
8. Resveratrol aumenta los niveles de proteínas implicadas en mecanismos de proteólisis de proteínas aberrantes y la vía no amiloidogénica de procesamiento de la APP en hipocampo y en cultivos neuronales 3xTg-AD. También induce un incremento de vías proteolíticas en cultivos neuronales control. Melatonina no induce cambios significativos.
9. Resveratrol activa vías activadoras y efectoras de SIRT1 relacionadas con la biogénesis mitocondrial y la plasticidad neuronal.
10. Melatonina reduce el estado de neuroinflamación en ratones 3xTg-AD y control.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Lopez LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ (2014) Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 71:2997-3025.
- Akiyama H et al. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383-421.
- Albani D, Polito L, Batelli S, De Mauro S, Fracasso C, Martelli G, Colombo L, Manzoni C, Salmona M, Caccia S, Negro A, Forloni G (2009) The SIRT1 activator resveratrol protects SK-N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by alpha-synuclein or amyloid-beta (1-42) peptide. *J Neurochem* 110:1445-1456.
- Alonso AD, Zaidi T, Novak M, Barra HS, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein. *J Biol Chem* 276:37967-37973.
- Alonso E, Vale C, Vieytes MR, Botana LM (2013) Translocation of PKC by yessotoxin in an in vitro model of Alzheimer's disease with improvement of tau and beta-amyloid pathology. *ACS Chem Neurosci* 4:1062-1070.
- Alonso E, Vale C, Vieytes MR, Laferla FM, Gimenez-Llort L, Botana LM (2011a) The cholinergic antagonist gymnodimine improves Abeta and tau neuropathology in an in vitro model of Alzheimer disease. *Cell Physiol Biochem* 27:783-794.
- Alonso E, Vale C, Vieytes MR, Laferla FM, Gimenez-Llort L, Botana LM (2011b) 13-Desmethyl spiroside-C is neuroprotective and reduces intracellular Abeta and hyperphosphorylated tau in vitro. *Neurochem Int* 59:1056-1065.
- Altmann A, Tian L, Henderson VW, Greicius MD, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative I (2014) Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Ann Neurol* 75:563-573.
- Allard JS, Perez E, Zou S, de Cabo R (2009) Dietary activators of Sirt1. *Mol Cell Endocrinol* 299:58-63.
- Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74:342-352.
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
- Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA (2006) Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta* 1757:573-589.
- Apostolova LG, Zarow C, Biado K, Hurtz S, Boccardi M, Somme J, Honarpisheh H, Blanken AE, Brook J, Tung S, Lo D, Ng D, Alger JR, Vinters HV, Bocchetta M, Duvernoy H, Jack CR, Jr., Frisoni GB, Segmentation E-AWGotHPfMH (2015) Relationship between hippocampal atrophy and neuropathology markers: a 7T MRI validation study of the EADC-ADNI Harmonized Hippocampal Segmentation Protocol. *Alzheimers Dement* 11:139-150.
- Assini FL, Duzzioni M, Takahashi RN (2009) Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav Brain Res* 204:206-211.

- Avila J, Pallas N, Bolos M, Sayas CL, Hernandez F (2016) Intracellular and extracellular microtubule associated protein tau as a therapeutic target in Alzheimer disease and other tauopathies. *Expert Opin Ther Targets* 20:653-661.
- Axelrod J (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184:1341-1348.
- Baas PW (2013) Microtubule stability in the axon: new answers to an old mystery. *Neuron* 78:3-5.
- Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, Wang Y, Raederstorff D, Morrow JD, Leeuwenburgh C, Allison DB, Saupe KW, Cartee GD, Weindruch R, Prolla TA (2008) A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One* 3:e2264.
- Barnard ND, Bush AI, Ceccarelli A, Cooper J, de Jager CA, Erickson KI, Fraser G, Kesler S, Levin SM, Lucey B, Morris MC, Squitti R (2014) Dietary and lifestyle guidelines for the prevention of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35 Suppl 2:S74-78.
- Barranco-Quintana JL, Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RF (2005) [Risk factors for Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* 40:613-618.
- Baur JA, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493-506.
- Beher D, Wu J, Cumine S, Kim KW, Lu SC, Atangan L, Wang M (2009) Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chem Biol Drug Des* 74:619-624.
- Belsky DW, Caspi A, Houts R, Cohen HJ, Corcoran DL, Danese A, Harrington H, Israel S, Levine ME, Schaefer JD, Sugden K, Williams B, Yashin AI, Poulton R, Moffitt TE (2015) Quantification of biological aging in young adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E4104-4110.
- Bellido-Martin L, de Frutos PG (2008) Vitamin K-dependent actions of Gas6. *Vitam Horm* 78:185-209.
- Bertram L, Tanzi RE (2005) The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 115:1449-1457.
- Bird TD (2008) Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med* 10:231-239.
- Bitterman JL, Chung JH (2015) Metabolic effects of resveratrol: addressing the controversies. *Cell Mol Life Sci* 72:1473-1488.
- Bjorksten J (1968) The crosslinkage theory of aging. *J Am Geriatr Soc* 16:408-427.
- Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 12:1133-1138.
- Bordone L, Guarente L (2005) Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:298-305.
- Borra MT, Smith BC, Denu JM (2005) Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem* 280:17187-17195.
- Bosch-Presegue L, Vaquero A (2015) Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. *FEBS J* 282:1745-1767.
- Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE (2010) Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem* 17:5-11.
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3:186-191.
- Brown GC, Bal-Price A (2003) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 27:325-355.

- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303:2011-2015.
- Burnet FM (1970) An immunological approach to ageing. *Lancet* 2:358-360.
- Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2008) Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 45:302-311.
- Cacquevel M, Lebourrier N, Cheenne S, Vivien D (2004) Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 5:529-534.
- Cadonic C, Sabbir MG, Albensi BC (2016) Mechanisms of Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 53:6078-6090.
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (2001) BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4:233-234.
- Calsolaro V, Edison P (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement* 12:719-732.
- Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Darpoux F, Brice A, Frebourg T (1999) Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65:664-670.
- Canto C, Auwerx J (2009) PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 20:98-105.
- Cao X, Sudhof TC (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120.
- Cardinali DP, Pevet P (1998) Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev* 2:175-190.
- Cardinali DP, Brusco LI, Liberczuk C, Furio AM (2002) The use of melatonin in Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinol Lett* 23 Suppl 1:20-23.
- Caroni P (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 71:3-9.
- Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK (2012) Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol* 3:141.
- Ciechanover A, Kwon YT (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med* 47:e147.
- Codocedo JF, Allard C, Godoy JA, Varela-Nallar L, Inestrosa NC (2012) SIRT1 regulates dendritic development in hippocampal neurons. *PLoS One* 7:e47073.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305:390-392.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325:201-204.

- Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M (1997) Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 49:71-81.
- Corpas R, Revilla S, Ursulet S, Castro-Freire M, Kaliman P, Petegnief V, Gimenez-Llort L, Sarkis C, Pallas M, Sanfeliu C (2016) SIRT1 Overexpression in Mouse Hippocampus Induces Cognitive Enhancement Through Proteostatic and Neurotrophic Mechanisms. *Mol Neurobiol*.
- Cosgrove KP, Mazure CM, Staley JK (2007) Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biol Psychiatry* 62:847-855.
- Cox EP, O'Dwyer N, Cook R, Vetter M, Cheng HL, Rooney K, O'Connor H (2016) Relationship between physical activity and cognitive function in apparently healthy young to middle-aged adults: A systematic review. *J Sci Med Sport* 19:616-628.
- Cras P, Smith MA, Richey PL, Siedlak SL, Mulvihill P, Perry G (1995) Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 89:291-295.
- Cristofol R, Porquet D, Corpas R, Coto-Montes A, Serret J, Camins A, Pallas M, Sanfeliu C (2012) Neurons from senescence-accelerated SAMP8 mice are protected against frailty by the sirtuin 1 promoting agents melatonin and resveratrol. *J Pineal Res* 52:271-281.
- Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS (2004) Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci* 82:614-619.
- Crump CJ, Johnson DS, Li YM (2013) Development and mechanism of gamma-secretase modulators for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 52:3197-3216.
- Cummings JL (2004) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 351:56-67.
- Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3:1.
- Cheng S, Ma C, Qu H, Fan W, Pang J, He H (2008) Differential effects of melatonin on hippocampal neurodegeneration in different aged accelerated senescence prone mouse-8. *Neuro Endocrinol Lett* 29:91-99.
- Chicurel ME, Harris KM (1992) Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 325:169-182.
- Chung EY, Kim BH, Hong JT, Lee CK, Ahn B, Nam SY, Han SB, Kim Y (2011) Resveratrol down-regulates interferon-gamma-inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation. *J Nutr Biochem* 22:902-909.
- Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C (2009) Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 8:18-30.
- Dai H, Kustigian L, Carney D, Case A, Considine T, Hubbard BP, Perni RB, Riera TV, Szczepankiewicz B, Vlasuk GP, Stein RL (2010) SIRT1 activation by small molecules: kinetic and biophysical evidence for direct interaction of enzyme and activator. *J Biol Chem* 285:32695-32703.
- De Strooper B, Beullens M, Contreras B, Levesque L, Craessaerts K, Cordell B, Moechars D, Bollen M, Fraser P, George-Hyslop PS, Van Leuven F (1997) Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem* 272:3590-3598.

- Deger JM, Gerson JE, Kaye R (2015) The interrelationship of proteasome impairment and oligomeric intermediates in neurodegeneration. *Aging Cell* 14:715-724.
- DeKosky ST, Scheff SW (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457-464.
- Delacourte A, Defossez A (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 76:173-186.
- DeMartino GN, Slaughter CA (1999) The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 274:22123-22126.
- Donmez G (2012) The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration. *Trends Pharmacol Sci* 33:494-501.
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, Muller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K (1988) Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 7:949-957.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5:486-488.
- Epis R, Marcello E, Gardoni F, Vastagh C, Malinverno M, Balducci C, Colombo A, Borroni B, Vara H, Dell'Agli M, Cattabeni F, Giustetto M, Borsello T, Forloni G, Padovani A, Di Luca M (2010) Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease. *Brain* 133:3323-3335.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122-1124.
- Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4162-4167.
- Feng Z, Chang Y, Cheng Y, Zhang BL, Qu ZW, Qin C, Zhang JT (2004) Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pineal Res* 37:129-136.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M, Alzheimer's Disease I (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-2117.
- Fonseca R, Vabulas RM, Hartl FU, Bonhoeffer T, Nagerl UV (2006) A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron* 52:239-245.
- Frazzini V, Guarnieri S, Bomba M, Navarra R, Morabito C, Mariggio MA, Sensi SL (2016) Altered Kv2.1 functioning promotes increased excitability in hippocampal neurons of an Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Dis* 7:e2100.
- Fremont L (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66:663-673.
- Gadhawe K, Bolshette N, Ahire A, Pardeshi R, Thakur K, Trandafir C, Istrate A, Ahmed S, Lahkar M, Muresanu DF, Balea M (2016) The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 20:1392-1407.

- Gan L, Mucke L (2008) Paths of convergence: sirtuins in aging and neurodegeneration. *Neuron* 58:10-14.
- Ganie SA, Dar TA, Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A (2016) Melatonin: A Potential Anti-Oxidant Therapeutic Agent for Mitochondrial Dysfunctions and Related Disorders. *Rejuvenation Res* 19:21-40.
- Gao J, Wang WY, Mao YW, Graff J, Guan JS, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC, Tsai LH (2010) A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466:1105-1109.
- Garcia-Mesa Y, Gimenez-Llort L, Lopez LC, Venegas C, Cristofol R, Escames G, Acuna-Castroviejo D, Sanfeliu C (2012) Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiol Aging* 33:1124 e1113-1129.
- Garcia-Mesa Y, Colie S, Corpas R, Cristofol R, Comellas F, Nebreda AR, Gimenez-Llort L, Sanfeliu C (2015) Oxidative Stress Is a Central Target for Physical Exercise Neuroprotection Against Pathological Brain Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.
- Garcia-Mesa Y, Lopez-Ramos JC, Gimenez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, Laferla FM, Cristofol R, Delgado-Garcia JM, Sanfeliu C (2011) Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis* 24:421-454.
- Gimenez-Llort L, Blazquez G, Canete T, Johansson B, Oddo S, Tobena A, LaFerla FM, Fernandez-Teruel A (2007) Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neurosci Biobehav Rev* 31:125-147.
- Godoy JA, Zolezzi JM, Braidly N, Inestrosa NC (2014) Role of Sirt1 during the ageing process: relevance to protection of synapses in the brain. *Mol Neurobiol* 50:744-756.
- Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314:777-781.
- Goldberg AL (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426:895-899.
- Gonatas NK, Anderson W, Evangelista I (1967) The contribution of altered synapses in the senile plaque: an electron microscopic study in Alzheimer's dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* 26:25-39.
- Gray EG, Paula-Barbosa M, Roher A (1987) Alzheimer's disease: paired helical filaments and cytomembranes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 13:91-110.
- Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386:463-471.
- Gu Y, Misonou H, Sato T, Dohmae N, Takio K, Ihara Y (2001) Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. *J Biol Chem* 276:35235-35238.
- Guarente L (2005) Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism. *Mech Ageing Dev* 126:923-928.
- Guo W, Qian L, Zhang J, Zhang W, Morrison A, Hayes P, Wilson S, Chen T, Zhao J (2011) Sirt1 overexpression in neurons promotes neurite outgrowth and cell survival through inhibition of the mTOR signaling. *J Neurosci Res* 89:1723-1736.
- Gutierrez-Cuesta J, Tajés M, Jimenez A, Coto-Montes A, Camins A, Pallas M (2008) Evaluation of potential pro-survival pathways regulated by melatonin in a murine senescence model. *J Pineal Res* 45:497-505.

- Gutierrez-Cuesta J, Sureda FX, Romeu M, Canudas AM, Caballero B, Coto-Montes A, Camins A, Pallas M (2007) Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8. *J Pineal Res* 42:394-402.
- Haass C (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23:483-488.
- Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268:3021-3024.
- Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1:1291-1296.
- Haigis MC, Sinclair DA (2010) Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5:253-295.
- Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR (2011) Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol* 93:350-384.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Harikumar KB, Aggarwal BB (2008) Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 7:1020-1035.
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300.
- Harrison SM, Harper AJ, Hawkins J, Duddy G, Grau E, Pugh PL, Winter PH, Shilliam CS, Hughes ZA, Dawson LA, Gonzalez MI, Upton N, Pangalos MN, Dingwall C (2003) BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes. *Mol Cell Neurosci* 24:646-655.
- Hasegawa K, Yoshikawa K (2008) Necdin regulates p53 acetylation via Sirtuin1 to modulate DNA damage response in cortical neurons. *J Neurosci* 28:8772-8784.
- Hempfen B, Brion JP (1996) Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:964-972.
- Heneka MT, O'Banion MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184:69-91.
- Herranz D, Munoz-Martin M, Canamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, Serrano M (2010) Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* 1:3.
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479.
- Herskovits AZ, Guarente L (2014) SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron* 81:471-483.
- Himeno E, Ohyagi Y, Ma L, Nakamura N, Miyoshi K, Sakae N, Motomura K, Soejima N, Yamasaki R, Hashimoto T, Tabira T, LaFerla FM, Kira J (2011) Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid-beta degradation. *Ann Neurol* 69:248-256.

- Hiona A, Leeuwenburgh C (2008) The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Exp Gerontol* 43:24-33.
- Holmes C (2013) Review: systemic inflammation and Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39:51-68.
- Holliman BJ, Chyka PA (1997) Problems in assessment of acute melatonin overdose. *South Med J* 90:451-453.
- Hong L, Koelsch G, Lin X, Wu S, Terzyan S, Ghosh AK, Zhang XC, Tang J (2000) Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science* 290:150-153.
- Houtkooper RH, Canto C, Wanders RJ, Auwerx J (2010) The secret life of NAD<sup>+</sup>: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev* 31:194-223.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196.
- Hu W, Ma Z, Jiang S, Fan C, Deng C, Yan X, Di S, Lv J, Reiter RJ, Yang Y (2016) Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis? *J Pineal Res* 60:121-131.
- Huang WJ, Zhang X, Chen WW (2016) Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep* 4:519-522.
- Hubbard BP, Sinclair DA (2014) Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends Pharmacol Sci* 35:146-154.
- Hubbard BP et al. (2013) Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* 339:1216-1219.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL (1984) Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225:1168-1170.
- Imai S, Guarente L (2010) Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci* 31:212-220.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403:795-800.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295:580-623.
- Jeong H, Cohen DE, Cui L, Supinski A, Savas JN, Mazzulli JR, Yates JR, 3rd, Bordone L, Guarente L, Krainc D (2012) Sirt1 mediates neuroprotection from mutant huntingtin by activation of the TORC1 and CREB transcriptional pathway. *Nat Med* 18:159-165.
- Jesko H, Wencel P, Strosznajder RP, Strosznajder JB (2016) Sirtuins and Their Roles in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. *Neurochem Res*.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.
- Karpova A, Mikhaylova M, Thomas U, Knopfel T, Behnisch T (2006) Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *J Neurosci* 26:4949-4955.

- Kazui H, Matsuda A, Hirono N, Mori E, Miyoshi N, Ogino A, Tokunaga H, Ikejiri Y, Takeda M (2005) Everyday memory impairment of patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* 19:331-337.
- Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, Delalle I, Baur JA, Sui G, Armour SM, Puigserver P, Sinclair DA, Tsai LH (2007) SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 26:3169-3179.
- Kim SM, Ganguli S, Frank LM (2012) Spatial information outflow from the hippocampal circuit: distributed spatial coding and phase precession in the subiculum. *J Neurosci* 32:11539-11558.
- Knutson MD, Leeuwenburgh C (2008) Resveratrol and novel potent activators of SIRT1: effects on aging and age-related diseases. *Nutr Rev* 66:591-596.
- Koudinov AR, Koudinova NV (2001) Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *FASEB J* 15:1858-1860.
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29:3020-3032.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010) The essence of senescence. *Genes Dev* 24:2463-2479.
- Kumar A, Singh A, Ekavali (2015) A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep* 67:195-203.
- Kupis W, Palyga J, Tomal E, Niewiadomska E (2016) The role of sirtuins in cellular homeostasis. *J Physiol Biochem* 72:371-380.
- Kutner RH, Zhang XY, Reiser J (2009) Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc* 4:495-505.
- Laeremans A, Sabanov V, Ahmed T, Nys J, Van de Plas B, Vinken K, Woolley DG, Gantois I, D'Hooge R, Arckens L, Balschun D (2015) Distinct and simultaneously active plasticity mechanisms in mouse hippocampus during different phases of Morris water maze training. *Brain Struct Funct* 220:1273-1290.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8:499-509.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-1122.
- Lalla R, Donmez G (2013) The role of sirtuins in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 5:16.
- Laurberg S, Sorensen KE (1981) Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield CA3). *Brain Res* 212:287-300.
- Laursen B, Mork A, Plath N, Kristiansen U, Bastlund JF (2014) Impaired hippocampal acetylcholine release parallels spatial memory deficits in Tg2576 mice subjected to basal forebrain cholinergic degeneration. *Brain Res* 1543:253-262.

- Lavenex P, Suzuki WA, Amaral DG (2004) Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: Intrinsic projections and interconnections. *J Comp Neurol* 472:371-394.
- Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS (2005) Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120:701-713.
- Lee HR, Shin HK, Park SY, Kim HY, Lee WS, Rhim BY, Hong KW, Kim CD (2014) Cilostazol suppresses beta-amyloid production by activating a disintegrin and metalloproteinase 10 via the upregulation of SIRT1-coupled retinoic acid receptor-beta. *J Neurosci Res* 92:1581-1590.
- Leissring MA, Turner AJ (2013) Regulation of distinct pools of amyloid beta-protein by multiple cellular proteases. *Alzheimers Res Ther* 5:37.
- Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ (2004) Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 75:765-790.
- Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J (2000) Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1456-1460.
- Liu GS, Zhang ZS, Yang B, He W (2012) Resveratrol attenuates oxidative damage and ameliorates cognitive impairment in the brain of senescence-accelerated mice. *Life Sci* 91:872-877.
- Liu Y, Ni C, Li Z, Yang N, Zhou Y, Rong X, Qian M, Chui D, Guo X (2016) Prophylactic Melatonin Attenuates Isoflurane-induced Cognitive Impairment in Aged Rats through Hippocampal Melatonin Receptor 2 - CREB Signalling. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194-1217.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4:231-232.
- Lutz MI, Milenkovic I, Regelsberger G, Kovacs GG (2014) Distinct patterns of sirtuin expression during progression of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 16:405-414.
- Macchi MM, Bruce JN (2004) Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 25:177-195.
- Mahley RW, Huang Y (1999) Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol* 10:207-217.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y (2006) Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5644-5651.
- Marambaud P, Zhao H, Davies P (2005) Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem* 280:37377-37382.
- Marchal J, Pifferi F, Aujard F (2013) Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. *Ann N Y Acad Sci* 1290:67-73.

- Marques SC, Lemos R, Ferreiro E, Martins M, de Mendonca A, Santana I, Outeiro TF, Pereira CM (2012) Epigenetic regulation of BACE1 in Alzheimer's disease patients and in transgenic mice. *Neuroscience* 220:256-266.
- Mastrangelo MA, Bowers WJ (2008) Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neurosci* 9:81.
- Matsubara E et al. (2003) Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 85:1101-1108.
- Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de Cabo R (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489:318-321.
- Mazzanti G, Di Giacomo S (2016) Curcumin and Resveratrol in the Management of Cognitive Disorders: What is the Clinical Evidence? *Molecules* 21.
- McGeer PL, Rogers J, McGeer EG (2016) Inflammation, Antiinflammatory Agents, and Alzheimer's Disease: The Last 22 Years. *J Alzheimers Dis* 54:853-857.
- Michan S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W, Mervis RF, Chen J, Guerin KI, Smith LE, McBurney MW, Sinclair DA, Baudry M, de Cabo R, Longo VD (2010) SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci* 30:9695-9707.
- Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 16:4623-4635.
- Min SW, Cho SH, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, Huang EJ, Shen Y, Masliah E, Mukherjee C, Meyers D, Cole PA, Ott M, Gan L (2010) Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 67:953-966.
- Min SW et al. (2015) Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits. *Nat Med* 21:1154-1162.
- Miquel J (1998) An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol* 33:113-126.
- Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Matsumoto Y, Hishikawa Y, Okawa M (1999) Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biol Psychiatry* 45:417-421.
- Mitchell SJ, Martin-Montalvo A, Mercken EM, Palacios HH, Ward TM, Abulwerdi G, Minor RK, Vlasuk GP, Ellis JL, Sinclair DA, Dawson J, Allison DB, Zhang Y, Becker KG, Bernier M, de Cabo R (2014) The SIRT1 activator SRT1720 extends lifespan and improves health of mice fed a standard diet. *Cell Rep* 6:836-843.
- Molinuevo JL, Cami J, Carne X, Carrillo MC, Georges J, Isaac MB, Khachaturian Z, Kim SY, Morris JC, Pasquier F, Ritchie C, Sperling R, Karlawish J (2016) Ethical challenges in preclinical Alzheimer's disease observational studies and trials: Results of the Barcelona summit. *Alzheimers Dement* 12:614-622.
- Morris MC (2004) Diet and Alzheimer's disease: what the evidence shows. *MedGenMed* 6:48.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.

- Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE (2013) The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev* 12:661-684.
- Mu Y, Gage FH (2011) Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6:85.
- Mudher A, Lovestone S (2002) Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci* 25:22-26.
- Mukda S, Panmanee J, Boontem P, Govitrapong P (2016) Melatonin administration reverses the alteration of amyloid precursor protein-cleaving secretases expression in aged mouse hippocampus. *Neurosci Lett* 621:39-46.
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH (2009) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 15:331-337.
- Nair NP, Hariharasubramanian N, Pilapil C, Isaac I, Thavundayil JX (1986) Plasma melatonin--an index of brain aging in humans? *Biol Psychiatry* 21:141-150.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457:981-989.
- Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Naslund J, Lannfelt L (2001) The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* 4:887-893.
- Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258:304-307.
- O'Mara S (2005) The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J Anat* 207:271-282.
- Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, Hartlerode A, Stegmuller J, Hafner A, Loerch P, Wright SM, Mills KD, Bonni A, Yankner BA, Scully R, Prolla TA, Alt FW, Sinclair DA (2008) SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135:907-918.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Oellerich MF, Potente M (2012) FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging. *Circ Res* 110:1238-1251.
- Olcese JM, Cao C, Mori T, Mamcarz MB, Maxwell A, Runfeldt MJ, Wang L, Zhang C, Lin X, Zhang G, Arendash GW (2009) Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res* 47:82-96.
- Olivares J, Juárez E, García F (2015) El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV*.
- Olovnikov AM (1996) Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol* 31:443-448.

- Orgel LE (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 49:517-521.
- Osterweil E, Wells DG, Mooseker MS (2005) A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J Cell Biol* 168:329-338.
- Paraiso AF, Mendes KL, Santos SH (2013) Brain activation of SIRT1: role in neuropathology. *Mol Neurobiol* 48:681-689.
- Park CB, Larsson NG (2011) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol* 193:809-818.
- Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, Ke H, Rehmann H, Taussig R, Brown AL, Kim MK, Beaven MA, Burgin AB, Manganiello V, Chung JH (2012) Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* 148:421-433.
- Parsons CG, Danysz W, Dekundy A, Pulte I (2013) Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 24:358-369.
- Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V (1987) Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3033-3036.
- Pertusa M, Garcia-Matas S, Mammeri H, Adell A, Rodrigo T, Mallet J, Cristofol R, Sarkis C, Sanfeliu C (2008) Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats. *Neurobiol Aging* 29:1366-1379.
- Petrucelli L, Dickson D, Kehoe K, Taylor J, Snyder H, Grover A, De Lucia M, McGowan E, Lewis J, Prihar G, Kim J, Dillmann WH, Browne SE, Hall A, Voellmy R, Tsuboi Y, Dawson TM, Wolozin B, Hardy J, Hutton M (2004) CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum Mol Genet* 13:703-714.
- Porquet D, Grinan-Ferre C, Ferrer I, Camins A, Sanfeliu C, Del Valle J, Pallas M (2014) Neuroprotective role of trans-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 42:1209-1220.
- Porquet D, Casadesus G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, Pelegri C, Sanfeliu C, Camins A, Pallas M, del Valle J (2013) Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age (Dordr)* 35:1851-1865.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456-1464.
- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* 78:959-991.
- Price NL et al. (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab* 15:675-690.
- Qin W, Zhao W, Ho L, Wang J, Walsh K, Gandy S, Pasinetti GM (2008) Regulation of forkhead transcription factor FoxO3a contributes to calorie restriction-induced prevention of Alzheimer's disease-type amyloid neuropathology and spatial memory deterioration. *Ann N Y Acad Sci* 1147:335-347.
- Qiu WQ, Folstein MF (2006) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 27:190-198.

- Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273:32730-32738.
- Quintas A, de Solis AJ, Diez-Guerra FJ, Carrascosa JM, Bogonez E (2012) Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus: prevention by late onset caloric restriction. *Exp Gerontol* 47:198-201.
- Raber J, Huang Y, Ashford JW (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 25:641-650.
- Rajadas J, Sun W, Li H, Inayathullah M, Cereghetti D, Tan A, de Mello Coelho V, Chrest FJ, Kusiak JW, Smith WW, Taub D, Wu JC, Rifkind JM (2013) Enhanced Aβ(1-40) production in endothelial cells stimulated with fibrillar Aβ(1-42). *PLoS One* 8:e58194.
- Ramadori G, Lee CE, Bookout AL, Lee S, Williams KW, Anderson J, Elmquist JK, Coppari R (2008) Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. *J Neurosci* 28:9989-9996.
- Ramis MR, Esteban S, Miralles A, Tan DX, Reiter RJ (2015) Caloric restriction, resveratrol and melatonin: Role of SIRT1 and implications for aging and related-diseases. *Mech Ageing Dev* 146-148:28-41.
- Reddy PH, Beal MF (2005) Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Brain Res Rev* 49:618-632.
- Regitz C, Fitzenberger E, Mahn FL, Dussling LM, Wenzel U (2016) Resveratrol reduces amyloid-beta (Aβ(1-42))-induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Nutr* 55:741-747.
- Reiter RJ (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 12:151-180.
- Reiter RJ (1995) The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol* 30:199-212.
- Reiter RJ, Tan DX (2002) Role of CSF in the transport of melatonin. *J Pineal Res* 33:61.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 7:444-458.
- Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L (2016) Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 61:253-278.
- Reitz C, Brayne C, Mayeux R (2011) Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 7:137-152.
- Religa P, Cao R, Religa D, Xue Y, Bogdanovic N, Westaway D, Marti HH, Winblad B, Cao Y (2013) VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival. *Sci Rep* 3:2053.
- Revilla S, Sunol C, Garcia-Mesa Y, Gimenez-Llort L, Sanfeliu C, Cristofol R (2014a) Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain. *Neuropharmacology* 81:55-63.
- Revilla S, Ursulet S, Alvarez-Lopez MJ, Castro-Freire M, Perpina U, Garcia-Mesa Y, Bortolozzi A, Gimenez-Llort L, Kaliman P, Cristofol R, Sarkis C, Sanfeliu C (2014b) Lenti-GDNF gene therapy protects against Alzheimer's disease-like neuropathology in 3xTg-AD mice and MC65 cells. *CNS Neurosci Ther* 20:961-972.

- Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, Martin SJ, Bridge H, de Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RG (1999) Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2:898-905.
- Roberds SL et al. (2001) BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10:1317-1324.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113-118.
- Rogina B, Helfand SL (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15998-16003.
- Saftig P, Lichtenthaler SF (2015) The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain. *Prog Neurobiol* 135:1-20.
- Sainaghi PP, Bellan M, Lombino F, Alciato F, Carecchio M, Galimberti D, Fenoglio C, Scarpini E, Cantello R, Pirisi M, Comi C (2016) Growth Arrest Specific 6 Concentration is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 55:59-65.
- Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y (2004) Predominant expression of Sir2alpha, an NAD-dependent histone deacetylase, in the embryonic mouse heart and brain. *FEBS Lett* 556:281-286.
- Sampaio-Marques B, Ludovico P (2015) Sirtuins and proteolytic systems: implications for pathogenesis of synucleinopathies. *Biomolecules* 5:735-757.
- Sarroca S, Molina-Martinez P, Areste C, Etzrodt M, Garcia de Frutos P, Gasa R, Antonell A, Molinuevo JL, Sanchez-Valle R, Saura CA, Llado A, Sanfeliu C (2016) Preservation of cell-survival mechanisms by the presenilin-1 K239N mutation may cause its milder clinical phenotype. *Neurobiol Aging* 46:169-179.
- Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, Teplow DB, Haass C (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2:835-841.
- Satoh A, Brace CS, Rensing N, Cliften P, Wozniak DF, Herzog ED, Yamada KA, Imai S (2013) Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab* 18:416-430.
- Saura CA, Valero J (2011) The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Rev Neurosci* 22:153-169.
- Scheff SW, Price DA (1993) Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 33:190-199.
- Schenk D, Basi GS, Pangalos MN (2012) Treatment strategies targeting amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006387.
- Selkoe DJ (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* 6:1054-1061.
- Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8:595-608.
- Sensi SL, Rapposelli IG, Frazzini V, Mascetra N (2008) Altered oxidant-mediated intraneuronal zinc mobilization in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 43:488-492.

- Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM (2010) Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 22:507-513.
- Shin IS, Carter M, Masterman D, Fairbanks L, Cummings JL (2005) Neuropsychiatric symptoms and quality of life in Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 13:469-474.
- Sinha S et al. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540.
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248:492-495.
- Smith IF, Hitt B, Green KN, Oddo S, LaFerla FM (2005) Enhanced caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> release in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 94:1711-1718.
- Smith JJ, Kenney RD, Gagne DJ, Frushour BP, Ladd W, Galonek HL, Israelian K, Song J, Razvadauskaite G, Lynch AV, Carney DP, Johnson RJ, Lavu S, Iffland A, Elliott PJ, Lambert PD, Elliston KO, Jirousek MR, Milne JC, Boss O (2009) Small molecule activators of SIRT1 replicate signaling pathways triggered by calorie restriction in vivo. *BMC Syst Biol* 3:31.
- Steiner H, Fluhrer R, Haass C (2008) Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem* 283:29627-29631.
- Stephan A, Laroche S, Davis S (2001) Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci* 21:5703-5714.
- Sulistio YA, Heese K (2016) The Ubiquitin-Proteasome System and Molecular Chaperone Deregulation in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 53:905-931.
- Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY (2010) Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 41:375-383.
- Suzuki WA, Amaral DG (2003) Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cytoarchitectonic and chemoarchitectonic organization. *J Comp Neurol* 463:67-91.
- Sweeney G, Song J (2016) The association between PGC-1alpha and Alzheimer's disease. *Anat Cell Biol* 49:1-6.
- Tajes M, Gutierrez-Cuesta J, Ortuno-Sahagun D, Camins A, Pallas M (2009) Anti-aging properties of melatonin in an in vitro murine senescence model: involvement of the sirtuin 1 pathway. *J Pineal Res* 47:228-237.
- Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, Suchiman HE, Slagboom PE, Boomsma DI, Heijmans BT (2012) Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 11:694-703.
- Tampellini D (2015) Synaptic activity and Alzheimer's disease: a critical update. *Front Neurosci* 9:423.
- Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1993) The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 70:65-71.
- Tang BL (2016) Sirt1 and the Mitochondria. *Mol Cells* 39:87-95.

- Tanzi RE, Bertram L (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120:545-555.
- Tchantchou F, Chan A, Kifle L, Ortiz D, Shea TB (2005) Apple juice concentrate prevents oxidative damage and impaired maze performance in aged mice. *J Alzheimers Dis* 8:283-287.
- Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410:227-230.
- Tomita T, Hamazaki J, Hirayama S, McBurney MW, Yashiroda H, Murata S (2015) Sirt1-deficiency causes defective protein quality control. *Sci Rep* 5:12613.
- Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H, Takuma H, Kuwano R, Imagawa M, Ataka S, Wada Y, Yoshioka E, Nishizaki T, Watanabe Y, Mori H (2008) A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* 63:377-387.
- Touitou Y (2001) Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp Gerontol* 36:1083-1100.
- Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B (2002) Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 143:84-90.
- Tuppo EE, Arias HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:289-305.
- Vale C, Alonso E, Rubiolo JA, Vieytes MR, LaFerla FM, Gimenez-Llort L, Botana LM (2010) Profile for amyloid-beta and tau expression in primary cortical cultures from 3xTg-AD mice. *Cell Mol Neurobiol* 30:577-590.
- Valenti D, de Bari L, de Rasmio D, Signorile A, Henrion-Caude A, Contestabile A, Vacca RA (2016) The polyphenols resveratrol and epigallocatechin-3-gallate restore the severe impairment of mitochondria in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model. *Biochim Biophys Acta* 1862:1093-1104.
- van der Zee EA (2015) Synapses, spines and kinases in mammalian learning and memory, and the impact of aging. *Neurosci Biobehav Rev* 50:77-85.
- Vassar R (2004) BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 23:105-114.
- Vassar R et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.
- Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C (2007) Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* 128:83-91.
- Vetrivel KS, Thinakaran G (2006) Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* 66:S69-73.
- Vidavalur R, Otani H, Singal PK, Maulik N (2006) Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp Clin Cardiol* 11:217-225.
- Vilchez D, Saez I, Dillin A (2014) The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat Commun* 5:5659.
- Villalba JM, Alcain FJ (2012) Sirtuin activators and inhibitors. *Biofactors* 38:349-359.
- Vina J, Borrás C, Miquel J (2007) Theories of ageing. *IUBMB Life* 59:249-254.
- Viswanathan M, Kim SK, Berdichevsky A, Guarente L (2005) A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev Cell* 9:605-615.

- von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* 117:4435-4448.
- Waldemar G, Dubois B, Emre M, Georges J, McKeith IG, Rossor M, Scheltens P, Tariska P, Winblad B, Efn (2007) Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur J Neurol* 14:e1-26.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193.
- Wallenstein GV, Eichenbaum H, Hasselmo ME (1998) The hippocampus as an associator of discontinuous events. *Trends Neurosci* 21:317-323.
- Wang DS, Dickson DW, Malter JS (2006) beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol* 2006:58406.
- Wang J, Fivecoat H, Ho L, Pan Y, Ling E, Pasinetti GM (2010) The role of Sirt1: at the crossroad between promotion of longevity and protection against Alzheimer's disease neuropathology. *Biochim Biophys Acta* 1804:1690-1694.
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2007) Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* 25:59-68.
- Wang YY, Zheng W, Ng CH, Ungvari GS, Wei W, Xiang YT (2016) Meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials of melatonin in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*.
- Weinert BT, Timiras PS (2003) Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* (1985) 95:1706-1716.
- Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Jr., Sistonen L, Morimoto RI (2009) Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323:1063-1066.
- Wimo A, Winblad B, Aguero-Torres H, von Strauss E (2003) The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 17:63-67.
- Witte AV, Kerti L, Margulies DS, Floel A (2014) Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J Neurosci* 34:7862-7870.
- Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T (2000) Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* 911:1-24.
- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398:513-517.
- World Alzheimer Report (2015) The Global Impact of Dementia. Alzheimer's Disease International (ADI) London.
- World Health Statistics (2016) Monitoring health for the SDGs. World Health Organisation (WHO).
- Wu Z, Yu J, Zhu A, Nakanishi H (2016) Nutrients, Microglia Aging, and Brain Aging. *Oxid Med Cell Longev* 2016:7498528.
- Wyss-Coray T (2006) Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 12:1005-1015.

- Yagami T, Ueda K, Asakura K, Sakaeda T, Nakazato H, Kuroda T, Hata S, Sakaguchi G, Itoh N, Nakano T, Kambayashi Y, Tsuzuki H (2002) Gas6 rescues cortical neurons from amyloid beta protein-induced apoptosis. *Neuropharmacology* 43:1289-1296.
- Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14670-14675.
- Yeleswaram K, McLaughlin LG, Knipe JO, Schabdach D (1997) Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *J Pineal Res* 22:45-51.
- Yerbury JJ, Ooi L, Dillin A, Saunders DN, Hatters DM, Beart PM, Cashman NR, Wilson MR, Ercroft H (2016) Walking the tightrope: proteostasis and neurodegenerative disease. *J Neurochem* 137:489-505.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23:2369-2380.
- Yu BP, Chung HY (2006) Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech Ageing Dev* 127:436-443.
- Zare-Shahabadi A, Masliah E, Johnson GV, Rezaei N (2015) Autophagy in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 26:385-395.
- Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, Li B, Liu G, Cai D (2013) Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature* 497:211-216.
- Zhang SJ, Ye J, Couey JJ, Witter M, Moser EI, Moser MB (2014) Functional connectivity of the entorhinal-hippocampal space circuit. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20120516.
- Zhou J, Zhang S, Zhao X, Wei T (2008) Melatonin impairs NADPH oxidase assembly and decreases superoxide anion production in microglia exposed to amyloid-beta1-42. *J Pineal Res* 45:157-165.
- Zolezzi JM, Bastias-Candia S, Santos MJ, Inestrosa NC (2014) Alzheimer's disease: relevant molecular and physiopathological events affecting amyloid-beta brain balance and the putative role of PPARs. *Front Aging Neurosci* 6:176.