



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Daño oxidativo y regulación redox en el envejecimiento cerebral: vulnerabilidad regional

Mayelín Domínguez González

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

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

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

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
Facultad de Medicina

**DAÑO OXIDATIVO Y REGULACIÓN REDOX EN
EL ENVEJECIMIENTO CEREBRAL:
VULNERABILIDAD REGIONAL**

TESIS DOCTORAL

Mayelín Domínguez González

2017

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
Facultad de Medicina
Programa de Doctorado en Biomedicina

**DAÑO OXIDATIVO Y REGULACIÓN REDOX EN EL
ENVEJECIMIENTO CEREBRAL: VULNERABILIDAD REGIONAL**

Memoria presentada por Mayelín Domínguez González para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Doctor Isidro Ferrer Abizanda del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Universidad de Barcelona, en el Instituto de Neuropatología del Hospital Universitario de Bellvitge y el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL).



Director/tutor:
Isidro Ferrer Abizanda



Autora:
Mayelín Domínguez González

Barcelona, 2017

A mis padres, por la fuerza que me impulsa

A Osmel

*The only way of discovering the limits of the possible is to venture a
little way past them into the impossible.*

Arthur C. Clarke

AGRADECIMIENTOS

Por hacer posible la práctica de este trabajo y de tantos otros en la ciencia, a todas esas personas que donaron una parte de si y a sus familias.

Por hacer posible este gran viaje, la tesis doctoral, y por el apoyo, la confianza y la dirección en su curso, al Dr. Isidro Ferrer.

Por contribuir a que este proyecto creciera y se enriqueciera, a los colaboradores, a las doctoras Eliandre Oliveira y María Antonia Odena del Parc Científic de Barcelona, a los doctores Reinald Pamplona, Manuel Portero-Otín y los miembros de su grupo del IRB de Lleida.

Por ayudarme a crecer como persona y profesional, a mis compañeros de grupo en esta experiencia, a Marga, Mercedes, Esther, Irene, Anusha, Karina, Pol, Paula, Belén, Jesús, Gerard, Lida, Raissa.

Por demostrar que cruzando la puerta del laboratorio también se encuentran amigos y compañeros, a Diana, Joan, Inma, Pablo.

Por hacer de un laboratorio un lugar donde hacer ciencia, pero también donde ser feliz, por ayudarme a conocer y querer su cultura, a la Meri y la Marta.

Por estar ahí, por darle sentido a la palabra incondicional, a mis amigos y mi familia, a Kari, Ta, Dani, mis padres, Osmel.

Por haber contribuido de una forma u otra a que lo que una vez fue una aspiración se haya tornado una realidad, a las personas que me condujeron al camino, a las personas con las que he compartido el camino.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	4
ABREVIATURAS	5
I. INTRODUCCIÓN	9
1. Envejecimiento	11
1.1. Aspectos a nivel de población y de especie	11
1.2. Aspectos a nivel de organismo	13
1.3. Aspectos celulares y moleculares	14
1.4. Teorías del envejecimiento	19
2. Balance redox	20
2.1. Oxígeno, radicales libres y su producción	21
2.2. Defensas antioxidantes	24
2.3. Señalización y regulación redox	26
3. Estrés y daño oxidativo	28
3.1. Daño oxidativo al ADN	28
3.2. Daño oxidativo a lípidos	29
3.3. Daño oxidativo a proteínas	31
3.3.1. Lipoxidación y daño oxidativo a proteínas	34
3.3.2. Glicación/glicoxidación y daño oxidativo a proteínas	36
3.3.3. Proteómica redox	38
3.4. Estrés y daño oxidativo en el envejecimiento	40
4. Envejecimiento en el cerebro	43
4.1. Características morfo-fisiológicas	43
4.2. Características moleculares	45
4.3. Envejecimiento y neuropatología	47
4.4. Vulnerabilidad al estrés y daño oxidativo en el cerebro	51
4.5. Estrés y daño oxidativo en el envejecimiento y la patología en el cerebro	52

II. OBJETIVOS.....	55
III. MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. Muestras	61
2. Extracción de proteínas.....	63
3. Detección de proteínas específicas modificadas por NKT mediante proteómica redox basada en geles.....	63
3.1. Electroforesis bidimensional	63
3.2. Western-blot anti-NKT	64
3.3. Identificación de proteínas aducidas por NKT mediante MS	65
3.4. Stripping	66
3.5. Caracterización proteica bioinformática.....	66
4. Slot-blot.....	67
5. Análisis de los niveles de proteínas y marcadores de oxidación proteica	67
5.1. Electroforesis SDS-PAGE monodimensional	67
5.2. Western-blot	68
5.3. Inactivación de la actividad peroxidasa	70
5.4. Cuantificación densitométrica.....	70
6. Análisis estadísticos	70
7. Análisis del conjunto de datos mediante IPA	70
IV. RESULTADOS.....	73
1. Identificación y caracterización de proteínas modificadas por NKT con el envejecimiento en el cerebro	75
1.1. Electroforesis bidimensional e identificación de proteínas modificadas por NKT	75
1.2. Proteínas modificadas por NKT respecto a la edad y regiones en el cerebro	79
1.3. Caracterización de las proteínas modificadas por NKT identificadas	84
1.4. Oligómeros solubles y niveles de NKT	86
2. Lipoxidación proteica global con el envejecimiento en el cerebro	89
2.1. Cambios en la aducción proteica por NKT con la edad en el cerebro.....	89

2.2. Cambios en la aducción proteica por MDA con la edad en el cerebro....	89
3. Cambios en los niveles de COX-2 y CYP2J2 con la edad en el cerebro y relación con los productos de peroxidación lipídica NKT y MDA	92
3.1. Niveles de COX-2 y CYP2J2 con la edad en el cerebro	92
3.2. Relaciones entre los niveles de COX-2, CYP2J2 y los de los productos de peroxidación lipídica NKT y MDA en el cerebro.....	93
4. Glicoxidación proteica con el envejecimiento en el cerebro	96
4.1. Cambios en los niveles de CEL con la edad en el cerebro.....	96
4.2. Cambios en los niveles de CML con la edad en el cerebro	96
5. Variaciones en los niveles de componentes del sistema de defensa antioxidante con el envejecimiento en el cerebro	99
6. Variaciones en los niveles de componentes de la CTE y VDAC con el envejecimiento en el cerebro	103
7. Variaciones en los niveles de componentes de la vía NF- κ B con el envejecimiento en el cerebro	106
8. Diferencias significativas en las moléculas exploradas con el envejecimiento en el cerebro tras ajuste por FDR.....	108
9. Análisis global de datos mediante IPA	109
V. DISCUSIÓN.....	113
1. Modificación de proteínas específicas por NKT y envejecimiento en el cerebro	115
1.1. La lipoxidación de proteínas específicas por NKT ocurre en la mediana edad y aumenta con el envejecimiento en el cerebro	116
1.2. Lipoxidación proteica selectiva en el cerebro humano	116
1.3. Agrupación funcional de proteínas dañadas oxidativamente	117
1.4. Aducción por NKT y oligómeros solubles.....	120
2. Lipoxidación proteica y envejecimiento en el cerebro.....	121
2.1. NKT, producto de peroxidación lipídica del DHA, muestra variaciones discretas con la edad en el cerebro	121
2.2. MDA, producto de peroxidación lipídica del AA, muestra variaciones pronunciadas con la edad en el cerebro	122

2.3. Especificidad regional en el cerebro del daño lipoxidativo a proteínas durante el envejecimiento	122
3. Mediadores del metabolismo lipídico y envejecimiento en el cerebro, relaciones con productos de peroxidación lipídica	123
4. Glicosidación proteica y envejecimiento en el cerebro	126
5. Mediadores de la respuesta antioxidante y envejecimiento en el cerebro	127
6. Componentes de la CTE mitocondrial y VDAC en el envejecimiento en el cerebro.....	131
7. Componentes de la vía de respuesta celular NF- κ B y envejecimiento en el cerebro.....	133
8. Variaciones regionales en procesos moleculares y funcionales en el envejecimiento en el cerebro	134
VI. CONCLUSIONES	137
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	141
VIII. ANEXOS	169

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de supervivencia histórica en humanos	12
Figura 2. Variación de la estructura poblacional por grupos de edad en España entre los años 1950 y 2016.....	13
Figura 3. Sellos distintivos del envejecimiento a nivel celular y molecular.....	14
Figura 4. Categorías e interconexiones funcionales entre las marcas celulares y moleculares del envejecimiento	19
Figura 5. Generación de especies reactivas del oxígeno	22
Figura 6. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss.....	23
Figura 7. Modificaciones oxidativas de bases nitrogenadas del ADN.....	29
Figura 8. Etapas del proceso de peroxidación lipídica	30
Figura 9. Oxidación del esqueleto proteico	32
Figura 10. Especies carbonilo reactivas originadas por lipoxidación y el metabolismo de prostaglandinas	34
Figura 11. Vías de formación de productos finales de glicación avanzada.	37
Figura 12. Algunos productos finales de glicación avanzada	38
Figura 13. Estrategias analíticas utilizadas en la proteómica redox	40
Figura 14. Neurodegeneración y envejecimiento cerebral acelerado.....	50
Figura 15. Estadios de Braak y Braak.....	51
Figura 16. Electroforesis bidimensional y <i>Western-blot</i> anti-NKT en las regiones exploradas.....	77
Figura 17. Validación mediante <i>Western-blot</i> de las identidades proteicas generadas mediante espectrometría de masas	79
Figura 18. Número de casos por grupo de edad con presencia de aductos de NKT en el conjunto de proteínas identificadas en las regiones exploradas	81
Figura 19. Caracterización estructural del grupo de proteínas identificadas como modificadas por NKT empleando el programa PredictProtein	84
Figura 20. Red de interacciones proteína-proteína derivada del análisis con el programa STRING.....	85
Figura 21. Vías y conexiones sobrerrepresentadas resultantes del análisis con el programa Cytoscape.....	86

Figura 22. Niveles de oligómeros solubles y de NKT total por grupos de edad en la corteza parietal, la corteza frontal y el giro cingulado	87
Figura 23. Correlaciones entre los niveles de oligómeros solubles y de NKT total. Análisis de componentes principales	88
Figura 24. Niveles globales de proteínas modificadas por NKT en el cerebro por grupos de edad	90
Figura 25. Niveles globales de proteínas modificadas por MDA en el cerebro por grupos de edad	91
Figura 26. Niveles de la proteína COX-2 en el cerebro por grupos de edad	92
Figura 27. Niveles de la proteína CYP2J2 en el cerebro por grupos de edad	93
Figura 28. Gráficos de dispersión por región para las correlaciones significativas entre los marcadores evaluados (NKT, MDA, COX-2 y CYP2J2)	94
Figura 29. Análisis de componentes principales para los niveles de NKT, MDA, COX-2 y CYP2J2 en el cerebro con la edad	95
Figura 30. Niveles de CEL en el cerebro por grupos de edad.....	97
Figura 31. Niveles de CML en el cerebro por grupos de edad	98
Figura 32. Análisis de componentes principales para los niveles de CEL y CML en el cerebro con la edad.....	99
Figura 33. Niveles de SOD1 en el cerebro por grupos de edad	100
Figura 34. Niveles de SOD2 en el cerebro por grupos de edad	101
Figura 36. Niveles de GPX4 en el cerebro por grupos de edad	102
Figura 37. Niveles de TRX1 en el cerebro por grupos de edad	103
Figura 38. Niveles de Nrf2 en el cerebro por grupos de edad	104
Figura 39. Niveles de VDAC y subunidades de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en el cerebro por grupos de edad.....	105
Figura 40. Niveles de los componentes de la vía NF- κ B p65, p50 e I κ B α en el cerebro por grupos de edad	107
Figura 41. <i>Heatmap</i> para vías canónicas con comportamiento diferencial entre regiones cerebrales con la edad generado mediante análisis de comparación con el programa IPA.....	110

Figura 42. *Heatmap* para enfermedades y funciones que muestra el comportamiento diferencial entre regiones cerebrales con la edad generado mediante análisis de comparación con el programa IPA111

Figura 43. Representación esquemática de la producción y eliminación de especies reactivas del oxígeno en la célula128

Figura 44. Representación esquemática de las variaciones con la edad en el cerebro de los niveles de las enzimas antioxidantes exploradas y su posible efecto sobre el nivel de radicales libres.....129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno y su descripción.	23
Tabla 2. Modificaciones oxidativas de la cadenas laterales de los residuos aminoacídicos.....	32
Tabla 3. Características generales de las enfermedades neurodegenerativas más comunes.....	48
Tabla 4. Características de los casos en estudio.....	62
Tabla 5. Anticuerpos empleados en <i>Western-blot</i>	69
Tabla 6. Identificación de proteínas modificadas por NKT mediante espectrometría de masas.	78
Tabla 7. Localización y funciones de las proteínas modificadas por NKT.....	80
Tabla 8. Patrones de variación de las proteínas modificadas por NKT entre grupos de edad en cada región cerebral.....	83
Tabla 9. Diferencias significativas en cada región cerebral tras ajuste por FDR..	108
Tabla 10. Vías canónicas de señalización modificadas con la edad en el cerebro.	109

ABREVIATURAS

- ¹O₂**: oxígeno singlete
- 8-oxodG**: 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina
- AA**: ácido araquidónico
- ADN**: ácido desoxirribonucleico
- ADNmt**: ADN mitocondrial
- AE**: avanzada edad
- AGE**: *advanced glycation end-products*
- ALE**: *advanced lipoxidation end-products*
- APX**: ascorbato peroxidasa
- ARE**: *antioxidant response element*
- ARN**: ácido ribonucleico
- βA**: β-amiloide
- CI**: complejo I
- CII**: complejo II
- CIII**: complejo III
- CIV**: complejo IV
- CV**: complejo V
- CEL**: N-ε-carboxietil-lisina
- CML**: N-ε-carboximetil-lisina
- COX**: ciclooxigenasa
- CTE**: cadena de transporte electrónico
- CYP450**: citocromo P450
- DBI**: *double bond index*
- DHA**: *docosahexaenoic acid*
- EA**: enfermedad de Alzheimer
- EP**: enfermedad de Parkinson
- ESI**: *electrospray ionization*
- FDR**: *fase discovery rate*
- Ft**: ferritina
- GH**: *growth hormone*
- GO**: *gene ontology*
- GPX**: glutatión peroxidasa
- GR**: glutatión reductasa

GRX: glutaredoxinas
GSH: glutatión reducido
GSSG: glutatión oxidado
HNE: 4-hidroxinonenal
HO₂•: radical perhidroxilo
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
IEF: isoelectroenfoque
IGF-1: *insulin-like growth factor 1*
IIS: *insulin and IGF-1 signaling*
IPA: *ingenuity pathway analysis*
L•: radical alquilo
LOO•: radical peroxilo de origen lipídico
LOOH: hidroperóxido lipídico
LOX: lipooxigenasa
MAA: aducto estable de MDA y acetaldehído
MALDI-TOF: *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*
MDA: malondialdehído
ME: mediana edad
MIF: *macrophage migration inhibitory factor*
MS: *mass spectrometry*
MS/MS: *tandem mass spectrometry*
NF-κB: *nuclear factor kappa beta*
NFT: *neurofibrillary tangles*
NKT: neuroketals
NM: neuromelanina
NO: óxido de nítrico
O₂: molécula de oxígeno
O₂•: radical superóxido
OH•: radical hidroxilo
ONOO•: peroxinitrito
PEDF: *pigment epithelium derived factor*
PG: prostaglandina
PI: *peroxidizability index*
PL: peroxidación lipídica
PPAR: *nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor*

PRX: peroxiredoxinas

PS: placas seniles

PUFA: *polyunsaturated fatty acids*

RC: restricción calórica

RCS: *reactive carbonyl species*

RHM: *Rel homology domain*

RNS: *reactive nitrogen species*

RO: alcoxi-

ROO: peroxi-

ROOH: hidroperóxido orgánico

ROS: *reactive oxygen species*

SAM: *senescence accelerated mice*

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SNC: sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

TRX: tioredoxina

I. INTRODUCCIÓN

1. Envejecimiento

El proceso de envejecer, envejecimiento, constituye uno de los aspectos más familiares de la biología para el ser humano; sin embargo, dista mucho de ser completamente entendido.

El envejecimiento, o senescencia del organismo, escapa a definiciones simples, y muchas se han hecho. En términos generales, se puede conceptualizar como el conjunto de cambios deletéreos, morfológicos y fisiológicos, que aparecen en la mayor parte de los seres vivos debido a la acción del tiempo (Harman, 2001; López-Otín et al., 2013). Dichos cambios involucran el deterioro de órganos y sistemas, ocasionando un declive en las funciones y la capacidad de respuesta ante agentes dañinos, e incrementando el riesgo de enfermedad y muerte del individuo (Harman, 2001; López-Otín et al., 2013).

Un conjunto de cuatro propiedades define o caracteriza el envejecimiento (Strehler, 1987):

1) Es un proceso; es decir, no se produce de repente, sino que es el resultado de eventos individuales acumulados.

2) Sus resultados son deletéreos, en el sentido de que disminuyen la capacidad del individuo para sobrevivir a medida que envejece.

3) Es universal dentro de una especie; sin embargo, puede no ocurrir en todas las especies. Ciertos “accidentes” como los que resultan de una infección específica no forman parte del proceso de envejecimiento.

4) Es intrínseco al sistema vivo en el cual ocurre; es decir, refleja las cualidades del ácido desoxirribonucleico (ADN), el ácido ribonucleico (ARN) y otras estructuras u orgánulos heredados de la generación parental.

Este proceso ha sido el objeto de numerosos estudios científicos; sin embargo, su complejidad intrínseca ha hecho que su comprensión siga planteando un apasionante desafío: constituye el centro de atención del presente trabajo de tesis.

1.1. Aspectos a nivel de población y de especie

El estudio del envejecimiento abarca diferentes niveles de organización, que se expanden desde el poblacional hasta el molecular. Desde los puntos de vista poblacional y específico, son destacables dos conceptos independientes pero interconectados: longevidad media y longevidad máxima.

La longevidad media, o esperanza de vida, es una estimación del promedio de años que vivirá un grupo de individuos nacidos el mismo año en un área determinada (cohorte), si los movimientos en la tasa de mortalidad de la región se mantienen constantes, es la vida funcional del individuo. Es una medida poblacional determinada en gran medida por factores externos, dependientes del ambiente en que vive dicha población.

La longevidad máxima (*maximum life span*) es una medida de la cantidad máxima de tiempo que se ha observado que uno o más miembros de una población sobreviven entre el nacimiento y la muerte. Indica, también, una estimación de la cantidad máxima de tiempo que un miembro de una especie dada podría sobrevivir entre el nacimiento y la muerte, en circunstancias óptimas para su longevidad. La longevidad máxima es constante y característica de cada especie, independientemente del lugar de nacimiento, determinada por características fijadas en su genoma (Dong et al., 2016). Se correlaciona con la resistencia al proceso de envejecer y es inversamente proporcional a la velocidad máxima de envejecimiento de las especies (Cutler, 1991).

En la especie humana, la acumulación de cambios del envejecimiento en condiciones de vida óptimas ha situado la esperanza de vida en unos 85 años y la longevidad máxima alrededor de 122 años (Harman, 2001). La mejora en las condiciones de vida (ej. nutrición, salud pública, etc.) ha propiciado un incremento en la esperanza de vida, especialmente en los países desarrollados, ocurriendo una rectangularización de las curvas de supervivencia (figura 1). No obstante, este aumento de la supervivencia no se ha acompañado de una modificación de la longevidad máxima de la especie; aunque en menor cuantía, se han descrito individuos centenarios en todas las épocas.

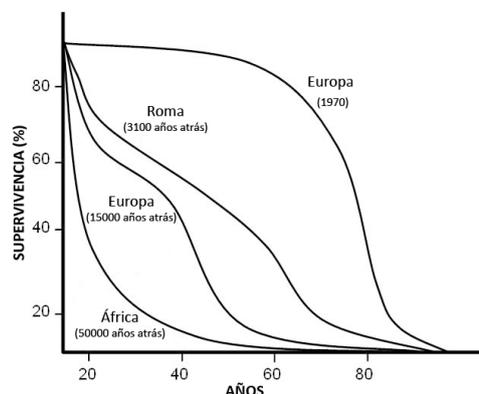


Figura 1. Curva de supervivencia histórica en humanos, evidencia su rectangularización progresiva sin modificación de la longevidad máxima (adaptado de Cutler, 1984).

El aumento en la esperanza de vida y el rápido crecimiento de la población a inicios del siglo XXI han conllevado a que el número de personas mayores de 60 años, alrededor de 600 millones en el año 2000, llegará a casi 2000 millones en el 2050. Así, la ganancia en supervivencia es a su vez responsable de la inversión de la pirámide poblacional en países desarrollados (figura 2). Existe una disminución en el número de individuos jóvenes respecto al de individuos de edad avanzada; con ello, un aumento en la incidencia de enfermedades relacionadas con la edad (ej. cardiovasculares, neurológicas, cáncer), causantes de alta mortalidad e inhabilidad. Por tanto, los cambios en la estructura social han generado una serie de problemas críticos en el ámbito médico y social, que hacen que hoy más que nunca el estudio del envejecimiento y las patologías asociadas a la edad constituya un foco de preocupación central.

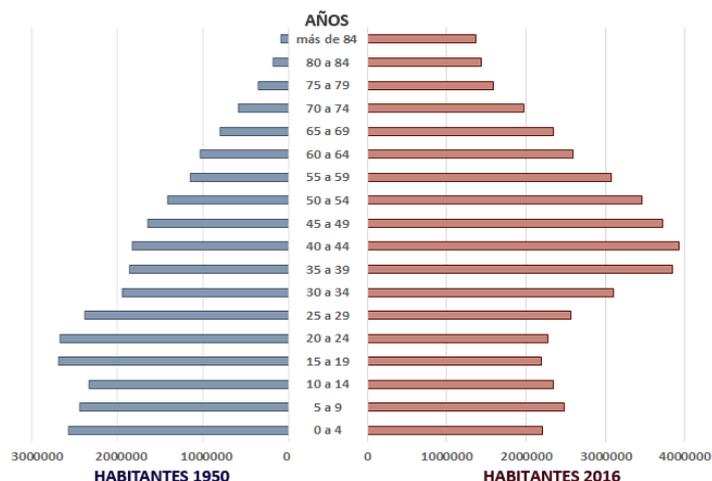


Figura 2. Variación de la estructura poblacional por grupos de edad en España entre los años 1950 y 2016, según los datos del Instituto Nacional de Estadística de España.

1.2. Aspectos a nivel de organismo

Existe una relación fundamental entre la reproducción y el envejecimiento. En las especies animales con reproducción múltiple, una reproducción precoz está ligada estadísticamente a una disminución de la esperanza de vida (Travers et al., 2015). El proceso de envejecimiento comienza una vez alcanzada la edad reproductora, en el caso del ser humano se sitúa en los 18-20 años de edad, y finaliza con la muerte del individuo. Ocurren pues, tras la madurez, los cambios progresivos que acompañan al envejecimiento y un aumento exponencial de la mortalidad con la edad (Gompertz, 1825). En el ser humano, el ritmo de envejecimiento es lento y la capacidad de reserva elevada; transcurre un largo tiempo para que exista una disminución funcional incompatible con la vida, estimado sobre los 120 años.

Al estudiar los cambios que tienen lugar en el organismo con la edad, es importante distinguir entre envejecimiento normal y patológico. El primero, es la etapa final de la vida los organismos que se acompaña de una pérdida progresiva del rendimiento. El otro, se da junto a procesos patológicos específicos, a los que se es más susceptible con la edad. El proceso biológico que representa el envejecimiento es diferente de las enfermedades individuales que aparecen con el mismo.

Considerando el envejecimiento normal en el ser humano, existen cambios progresivos en la composición bioquímica de los tejidos con la edad. Se han descrito diversos marcadores de los mismos; dos de los más evidentes son el aumento de la acumulación intracelular de lipofuscina (pigmento de la edad) (Gray, 2005) y el aumento de la reticulación en las moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno (Makrantonaki y Zouboulis, 2007).

Ocurre una disminución progresiva de la capacidad fisiológica con la edad en prácticamente todos los órganos y sistemas (Cefalu, 2011) (descrito según la revisión citada). Así, se reducen la masa corporal magra, haciendo que la fuerza disminuya, y la masa ósea total, reduciendo la estatura corporal y predisponiendo a la osteoporosis; y aumenta el porcentaje de tejido adiposo. Hay, entre otros ejemplos,

deterioro de la función digestiva, de la renal, alteraciones en la regulación electrolítica, descensos en la frecuencia cardiaca máxima y en la capacidad respiratoria. La capacidad de estos sistemas para responder a los esfuerzos decae: en la vejez es posible realizar toda una serie de tareas, pero sin ritmo rápido o intensidad elevada. Estos cambios ocurren aproximadamente desde los 30 años; no obstante, la tasa de disminución fisiológica es heterogénea entre órganos e individuos.

Se afectan, también, con la edad los sistemas claves de control del organismo (nervioso, endocrino e inmunitario) y sus interrelaciones. Disminuye la capacidad reguladora del organismo ante el cambio, interno (ej. niveles de glucemia) o externo (ej. respuesta al estrés). Ocurre pues, al envejecer, una caída en la capacidad de mantener la homeostasis y de responder adaptativamente a los estímulos ambientales.

Así, aumenta la susceptibilidad y vulnerabilidad a las enfermedades. Las tasas de incidencia y mortalidad de muchas enfermedades aumentan con la edad, paralelamente al aumento exponencial de la mortalidad (Wang et al., 2016). La base de estos dramáticos aumentos se entiende incompletamente, implica cambios funcionales de muchos tipos celulares, que conducen a la disfunción tejido/órgano y a enfermedad sistémica. Curiosamente, un estudio retrospectivo en centenarios mostró que viven el 90-95 % de sus vidas con buena salud y un alto nivel de independencia funcional, con una marcada compresión de la morbilidad hacia el final de la vida (Hitt et al., 1999).

1.3. Aspectos celulares y moleculares

En un intento por identificar/categorizar los marcadores celulares y moleculares del envejecimiento, se han propuesto nueve sellos (*hallmarks*) que contribuyen a este proceso y juntos determinan su fenotipo (figura 3). Se describen a continuación en base a la comprensión del envejecimiento en mamíferos (López-Otín et al., 2013).



Figura 3. Sellos distintivos del envejecimiento a nivel celular y molecular (adaptado de López-Otín et al., 2013).

1) Inestabilidad genómica:

La acumulación de daños genéticos a lo largo de la vida, por la acción de agentes exógenos y/o endógenos, es un denominador común del envejecimiento (Moskalev et al., 2013). En el caso del ADN nuclear, ocurre con la edad la acumulación de mutaciones somáticas (Moskalev et al., 2013), aneuploidias cromosómicas y variaciones en el número de copias (Forsberg et al., 2012), y un aumento del mosaicismo clonal para grandes anomalías (Jacobs et al., 2012). En el ADN mitocondrial (ADNmt), se ha descrito el aumento de mutaciones y deleciones con la edad (Park y Larsson, 2011); además, mutaciones en el ADNmt causan trastornos multisistémicos humanos que fenocopian parcialmente al envejecimiento (Wallace, 2005). Por otra parte, deficiencias en los mecanismos de reparación del ADN causan envejecimiento acelerado en ratones y subyacen a varios síndromes progeroides humanos (Hoeijmakers, 2009). Adicionalmente, los defectos en la arquitectura nuclear, conocidos como laminopatías, pueden causar inestabilidad del genoma y resultar en síndromes de envejecimiento prematuro (ej. síndrome de Werner y síndrome de Bloom) (Burtner y Kennedy, 2010).

2) Acortamiento de la longitud de los telómeros:

La acumulación en el tiempo de daño en el ADN parece ser aleatoria, pero existen regiones cromosómicas, como los telómeros, particularmente susceptibles al deterioro relacionado con la edad (Blackburn et al., 2006). Los telómeros son secuencias cortas localizadas en los extremos de los cromosomas; permiten su replicación y evitan que se fusionen entre sí. La replicación de los telómeros es realizada por una ADN polimerasa especializada: la telomerasa. Sin embargo, la mayoría de las células somáticas de mamíferos no expresan telomerasa, lo cual conduce a la pérdida progresiva de los telómeros (Olovnikov, 1996). El agotamiento de telómeros explica la capacidad proliferativa limitada de algunos tipos celulares cultivados *in vitro*, la llamada senescencia replicativa o límite de Hayflick (Hayflick y Moorhead, 1961; Juckett, 1987; Shay y Wright, 2000). Por ello, la longitud de los telómeros puede considerarse como un marcador de historia celular. El acortamiento de los telómeros se observa durante el envejecimiento normal tanto en humanos como en ratones (Blasco, 2007).

3) Alteraciones epigenéticas:

Múltiples líneas de evidencia sugieren que ocurren cambios epigenéticos con la edad (Talens et al., 2012). La relación entre metilación del ADN y envejecimiento es compleja: se ha descrito una hipometilación global asociada a la edad, pero también, una hipermetilación en loci específicos (ej. genes supresores de tumor) (Maegawa et al., 2010). En cuanto a la modificación postraduccional de las histonas, el aumento de la acetilación de H4K16, la trimetilación de H4K20 o de H3K4, así como la disminución de la metilación de H3K9 o la trimetilación de H3K27, son marcas epigenéticas asociadas a la edad (Fraga y Esteller, 2007). Las sirtuinas, una familia de deacetilasas NAD-dependientes, se han relacionado con el envejecimiento. En mamíferos, la sobreexpresión transgénica de SIRT1 mejora aspectos de la salud

con la edad, pero no aumenta la longevidad (Herranz et al., 2010); sin embargo, la pérdida de función de SIRT6 reduce la longevidad y su ganancia la prolonga en ratones (Kanfi et al., 2012; Mostoslavsky et al., 2006). También, proteínas cromosómicas clave (ej. HP1 α , proteínas Polycomb, complejo NuRD) disminuyen sus niveles en células envejecidas (Pollina y Brunet, 2011), determinando cambios en la arquitectura de la cromatina (Tsurumi y Li, 2012). Así, aumenta el ruido transcripcional y, la producción y maduración aberrantes de muchos ARN con la edad (Harries et al., 2011).

4) Pérdida de la proteostasis:

La homeostasis de las proteínas, o proteostasis, depende de mecanismos celulares que preservan la estabilidad y funcionalidad del proteoma. El correcto plegamiento y la estabilización de proteínas son mediados mayoritariamente por chaperonas de la familia de proteínas de choque térmico. Existe un deterioro con el envejecimiento en la actividad del factor de transcripción HSF1, encargado de la inducción mediada por estrés de estas proteínas, y en la síntesis de chaperonas citosólicas y organelo-específicas (ej. Hsp27, Hsp70, Hsp72) (Calderwood et al., 2009). Por otra parte, los principales sistemas proteolíticos que controlan la calidad de las proteínas, el sistema de autofagia lisosómica y el sistema ubiquitina-proteasoma, declinan con la edad (Rubinsztein et al., 2011; Tomaru et al., 2012). También, existen proteínas reguladoras de la proteotoxicidad relacionada con la edad (sistema MOAG-4/SERF), que actúan a través de una vía alternativa distinta de las chaperonas y proteasas moleculares (van Ham et al., 2010). Así, numerosa evidencia muestra que la proteostasis se altera con el envejecimiento (Koga et al., 2012), y que la expresión crónica de proteínas mal plegadas o agregadas contribuye al desarrollo de patologías relacionadas con la edad (Powers et al., 2009).

5) Desregulación en la detección de nutrientes:

El eje somatotrófico de los mamíferos comprende la hormona de crecimiento (GH, del inglés *growth hormone*), y su mediador secundario, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, del inglés *insulin-like growth factor 1*). La vía de señalización intracelular del IGF-1 es la misma que la inducida por la insulina, se conoce como vía de señalización de insulina e IGF-1 (IIS, del inglés *insulin and IGF-1 signaling*). Esta vía controla el proceso de envejecimiento en la mayoría de las especies y ha sido notablemente conservada en la evolución (van Heemst, 2010). Polimorfismos genéticos o mutaciones que reducen las funciones de la GH, el receptor de IGF-1, los receptores de insulina y sus efectores intracelulares (ej. Akt, factores de transcripción FOXO), tanto en humanos como en organismos modificados, se han relacionado con la longevidad (Barzilai et al., 2012; Fontana et al., 2010; Rollo, 2010). Adicionalmente, tres sistemas de detección de nutrientes interconectados son de interés respecto al envejecimiento: mTOR, detecta altas concentraciones de aminoácidos; AMPK, detecta estados de baja energía mediante los niveles de AMP; y las sirtuinas, detectan estados de baja energía mediante los niveles de NAD⁺ (Houtkooper et al., 2010). De manera general, la intensa actividad

trófica y anabólica, señalizada por las vías IIS o mTOR, aceleran el proceso de envejecimiento; por su parte, la regulación positiva de las vías AMPK y de sirtuinas, que señalan la escasez de nutrientes y promueven el catabolismo, favorece el envejecimiento saludable y la longevidad (Fontana et al., 2010). En consonancia, la restricción calórica (RC) incrementa la esperanza de vida o el estado de salud en numerosas especies eucariotas, incluidos también los primates no humanos (Brosens et al., 2009; Colman et al., 2009; Plank et al., 2012).

6) Disfunción mitocondrial:

A medida que las células y los organismos envejecen, la eficacia de la cadena de transporte electrónico (CTE) mitocondrial tiende a disminuir, aumentando la fuga de electrones y reduciéndose la generación de ATP (Green et al., 2011). La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) por la mitocondria y su relación con el envejecimiento es objeto de intensa investigación (se trata como acápite independiente). La disfunción mitocondrial puede acelerar el envejecimiento a través de mecanismos independientes de ROS (Kujoth et al., 2005). Por ejemplo, afectando la señalización apoptótica y aumentando la propensión de la mitocondria a permeabilizarse (Kroemer et al., 2007), desencadenando reacciones inflamatorias (Green et al., 2011), e interfiriendo en la señalización celular y la comunicación entre orgánulos (Raffaello y Rizzuto, 2011). La reducción de la eficiencia bioenergética mitocondrial con la edad puede resultar de múltiples factores, incluyendo una biogénesis mitocondrial reducida, acumulación de daño en el ADNmt, desestabilización de la organización macromolecular de los complejos de la CTE, cambios en la composición lipídica de las membranas mitocondriales, alteraciones en la dinámica de fisión/fusión mitocondrial y control defectuoso de la mitofagia (López-Otín et al., 2013). Se explora si el mejoramiento de la función mitocondrial (ej. mediante mitohormesis) puede prolongar la vida sana, en este sentido existe evidencia que lo sugiere (Haigis y Yankner, 2010).

7) Senescencia celular:

La senescencia celular se define como una detención estable del ciclo celular acoplada a cambios fenotípicos estereotipados (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007). Este fenómeno fue descrito por Hayflick en fibroblastos humanos en cultivo pasados en serie (Hayflick y Moorhead, 1961), debido en este caso al acortamiento de los telómeros (Shay y Wright, 2000). Otros estímulos asociados al envejecimiento también desencadenan la senescencia celular; entre los más notables: el daño (no telomérico) al ADN y la desrepresión del locus *INK4/ARF* (Collado et al., 2007). Dado que el número de células senescentes aumenta con el envejecimiento, aunque no en todos los tejidos (Wang et al., 2009), se ha asumido que la senescencia contribuye a este proceso. Este punto de vista subvalora el posible efecto de la misma en prevenir la propagación de células dañadas y desencadenar su eliminación por el sistema inmune (Hoenicke y Zender, 2012). Dos intervenciones conceptualmente opuestas son capaces de extender la vida sana: una potenciación moderada de la vía *INK4/ARF* puede prolongar la longevidad (Matheu et al., 2009), y al mismo tiempo,

la eliminación de células senescentes en un modelo experimental de progeria retarda patologías relacionadas con la edad (Baker et al., 2011). Se propone la senescencia celular como un mecanismo compensatorio beneficioso en respuesta al daño, que se convierte en deletéreo y acelera el envejecimiento cuando el tejido agota su capacidad regenerativa.

8) Agotamiento de células madre:

Las células madre soportan el mantenimiento y la reparación de los tejidos, gracias a su capacidad de autorrenovarse y diferenciarse a distintos tipos celulares nicho-específicos (Sharpless y DePinho, 2007). La disminución del potencial regenerativo de los tejidos es una de las características mejor descritas del envejecimiento (Yun, 2015). Existe un desgaste funcional en prácticamente todos los nichos de células madre adultas, incluyendo el cerebro anterior del ratón (Molofsky et al., 2006), el hueso (Gruber et al., 2006) y las fibras musculares (Conboy y Rando, 2012). Estudios en ratones envejecidos han revelado una disminución general en la actividad del ciclo celular de las células madre hematopoyéticas, relacionada con el daño en el ADN (Rossi et al., 2007) y con la sobreexpresión de proteínas inhibidoras del ciclo celular tales como p16^{Ink4A} (Janzen et al., 2006). El acortamiento de telómeros es también causa de la disminución de células madre con el envejecimiento en múltiples tejidos (Flores, 2005; Sharpless y DePinho, 2007).

9) Comunicación intercelular alterada:

Más allá de alteraciones en células autónomas, el envejecimiento implica cambios en la comunicación intercelular, ya sea endocrina, neuronal o neuroendocrina. La señalización neurohormonal (ej. renina-angiotensina, adrenérgica, IIS) tiende a la desregulación con la edad, las reacciones inflamatorias aumentan, la inmunovigilancia contra patógenos y células premalignas decae, y la composición del ambiente peri y extracelular varía (López-Otín et al., 2013). Una alteración prominente de la comunicación intercelular asociada al envejecimiento es el fenómeno denominado *inflammaging*, es decir, un fenotipo proinflamatorio crónico de bajo grado que acompaña al envejecimiento en mamíferos (Salminen et al., 2012). La inflamación puede resultar de múltiples causas, tales como la acumulación de daño proinflamatorio en los tejidos, disfunción del sistema inmunológico, propensión de las células senescentes a secretar citocinas proinflamatorias, potenciación de la activación de la vía del factor nuclear kappa beta (NF-κB, del inglés *nuclear factor kappa beta*) o la autofagia defectuosa (Salminen et al., 2012). Estas alteraciones resultan en la activación aumentada del inflamasoma NLRP3 y otras vías proinflamatorias, con lo que aumenta la producción de IL-1β, TNFα e interferones (Salminen et al., 2012). Más allá de la inflamación, existe evidencia de que cambios relacionados con el envejecimiento en un tejido pueden producir deterioro en otros tejidos, lo que explica la coordinación interorgánica del fenotipo de envejecimiento (López-Otín et al., 2013).

Una visión global de las marcas celulares y moleculares del envejecimiento sugiere tres categorías: marcas principales, marcas antagonicas y marcas integradoras (figura 4) (López-Otín et al., 2013). Las marcas principales son inequívocamente negativas, las antagonicas tienen efectos opuestos dependiendo de su intensidad (a niveles bajos efectos beneficiosos, a niveles altos, efectos deletéreos) y las integradoras afectan directamente la homeostasis y la función de los tejidos.

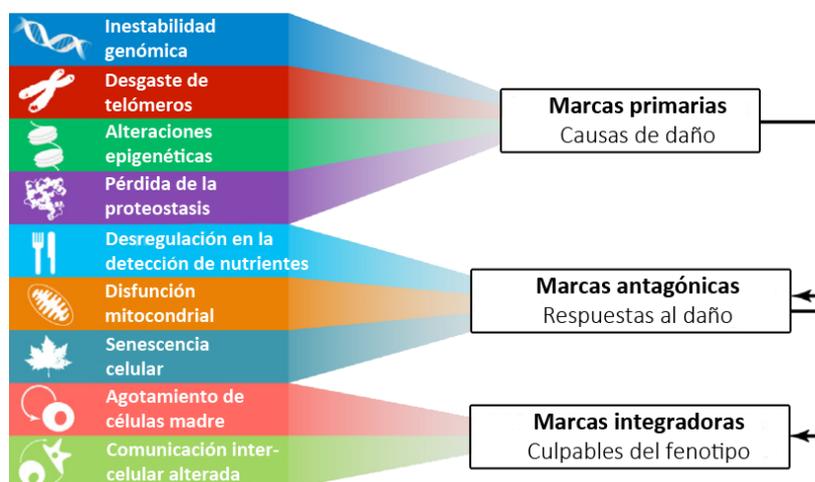


Figura 4. Categorías e interconexiones funcionales entre las marcas celulares y moleculares del envejecimiento (adaptado de López-Otín et al., 2013).

A pesar de la interconexión entre todas ellas se ha propuesto un cierto grado de relación jerárquica que se representa en la figura 4. Las marcas principales podrían ser desencadenantes cuyas consecuencias perjudiciales se van acumulando progresivamente con el tiempo. Las antagonicas, en principio beneficiosas, se tornan progresivamente negativas, siendo esto promovido o acelerado en parte por las marcas primarias. Por último, las marcas integradoras se presentan cuando el daño acumulado causado por las primarias y antagonicas no puede ser compensado por los mecanismos homeostáticos de los tejidos.

1.4. Teorías del envejecimiento

¿Cómo y por qué envejecemos? En el intento por responder estas preguntas, dentro de un único marco teórico, se han generado cientos de teorías; una revisión al respecto de 1990 recogió más de 300 (Medvedev, 1990). Su clasificación resulta difícil, especialmente porque algunas se solapan entre sí; sin embargo, se pueden describir en el contexto dos categorías generales: teorías deterministas y teorías estocásticas.

Las teorías deterministas proponen que el proceso de envejecimiento es un programa codificado genéticamente que conduce a un fin particular, a una velocidad determinada en cada especie, en este caso al deterioro fisiológico y la muerte.

En este grupo se encuentran teorías como la telomérica, basadas en la capacidad replicativa finita de las células y en como esto puede conducir a senescencia celular (Olovnikov, 1996). Sin embargo, resulta difícil de explicar el envejecimiento de

células postmitóticas, de escasa o nula proliferación (ej. neuronas), en base a este supuesto. También, pueden incluirse las teorías evolutivas, las cuales exploran en el hecho de que existe una longevidad máxima asociada a cada especie. Entre ellas, la teoría del soma desechable es la que cuenta con mayor base experimental (Kirkwood, 2005). Explica el envejecimiento como el resultado de un desajuste entre la supervivencia tardía y la fecundidad temprana, a consecuencia de genes beneficiosos para conseguir el máximo rendimiento funcional en la edad de la reproducción que pueden resultar desventajosos después. Además, incluye teorías basadas en el decaimiento funcional con la edad de bases genéticas de determinados sistemas, como la endocrina o la inmunológica (Jin, 2010). Aunque es evidente que la longevidad máxima tiene una base genética, solo un 1.8 % de los genes investigados muestran cambios de expresión con la edad (Vijg, 1999), y su efecto se describe como indirecto. Por ello, resulta difícil explicar el envejecimiento solo en base al efecto genético.

Las teorías estocásticas interpretan el proceso de envejecimiento como el resultado de la acumulación de errores o daño a lo largo de la vida que deterioran la homeostasis celular, debido a que la eficacia de los sistemas de reparación y mantenimiento no es del 100 %, conduciendo al deterioro fisiológico y la muerte.

En este grupo se encuentran teorías que explican el envejecimiento basándose en la acumulación de daño en el ADN, como la de la inestabilidad genómica o la de la mutación somática (Goldsmith, 2014). Incluye, también, teorías que se centran en las alteraciones del metabolismo con la edad, como la de la velocidad de vida (*rate of living*) que apunta que existe una correlación inversa entre la tasa metabólica y la longevidad máxima, o la del error catastrófico que se enfoca en los errores asociados a la síntesis de proteínas (Jin, 2010). En este grupo, ha recibido particular atención la teoría de los radicales libres o ROS, que postula que las ROS producidas durante la respiración aerobia son agentes causales de daño por oxidación y que este aumenta en el tiempo (Harman, 1956); y que la generación de las ROS ocurre *in vivo* como subproducto del funcionamiento de la CTE mitocondrial (Harman, 1972).

Dada la complejidad del envejecimiento, es poco probable que una teoría basada en un único mecanismo pueda ofrecer una explicación satisfactoria de todos sus aspectos, la reconciliación entre varias de ellas podría ofrecer una aproximación satisfactoria. El fin último de dichas teorías es explicar la causa universal del envejecimiento; en este sentido, el fenómeno del envejecimiento parece ser multicausal por lo que podría no haber una causa universal de envejecimiento válida para todos los organismos vivos.

2. Balance redox

En el proceso evolutivo, el aumento del nivel de oxígeno ambiental permitió el empleo de esta molécula como aceptor final de electrones. Así, las células desarrollaron sistemas de producción de energía altamente eficientes basados en el acoplamiento de la glicólisis y la fosforilación oxidativa, ruta por la cual se producen

hasta 38 moléculas de ATP por la oxidación de una molécula de glucosa. Esta ventaja de los organismos aerobios, trajo como efecto colateral la producción de ROS por la reducción incompleta del oxígeno (Circu y Aw, 2010); lo que implicó la evolución de sistemas de defensa antioxidantes para mantener un necesario equilibrio redox (Trachootham et al., 2008). A su vez, las ROS pasaron a formar parte de un complejo sistema de señalización redox celular involucrado en procesos fundamentales del organismo (Sen y Parker, 1996).

2.1. Oxígeno, radicales libres y su producción

Prácticamente desde el descubrimiento del oxígeno, en el siglo XVIII, se encuentran referencias a su toxicidad. No obstante, fue en 1954 que dicha toxicidad se postuló como mediada por la formación de radicales libres, generados por la reducción parcial de la propia molécula de oxígeno (O_2) (Gerschman et al., 1954), lo cual sentaría las bases de la teoría de los radicales libres del envejecimiento (Harman, 1956, 1972).

Un radical libre es una especie química orgánica o inorgánica, átomo o molécula, que posee uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Se forman como intermediarios de reacciones químicas por la ruptura homolítica de una molécula y, en general, son extremadamente inestables, con gran poder reactivo y de vida media muy corta (milisegundos). Su extrema reactividad se basa en su electrón (o electrones) desapareado, que les confiere una acusada capacidad electrófila, por lo que reaccionan fácilmente con grupos moleculares de alta densidad electrónica, como los dobles enlaces de los ácidos grasos polinsaturados (PUFA, del inglés *polyunsaturated fatty acids*) o los átomos de nitrógeno de los ácidos nucleicos y las proteínas. Una vez han robado un electrón a otra molécula esta se convertirá a su vez en un radical libre, iniciándose una reacción en cadena.

A los radicales libres del O_2 se les denomina, especies reactivas del oxígeno, ROS (Apel y Hirt, 2004). Incluyen especies como el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\cdot$) o el radical perhidroxilo ($HO_2\cdot$); así como, otras moléculas que no son propiamente radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

El O_2 en estado basal, triplete, presenta dos electrones desapareados con espines paralelos en su orbital más externo. Esta característica limita su capacidad para reaccionar con otro átomo o molécula pues precisa que ésta tenga dos electrones desapareados con espines paralelos entre sí y antiparalelos a los del O_2 , lo cual es poco frecuente. Por ello, el O_2 acepta preferentemente los electrones de uno en uno, en lo que se denomina vía univalente de reducción del oxígeno, de la cual proceden la mayoría de las ROS en los sistemas biológicos (Boveris et al., 1972). El propio O_2 en su forma triplete puede comportarse como radical libre, si se le proporciona suficiente energía, uno de sus electrones puede invertir su espín, generando el oxígeno singlete (1O_2) que posee una reactividad muy alta (figura 5).

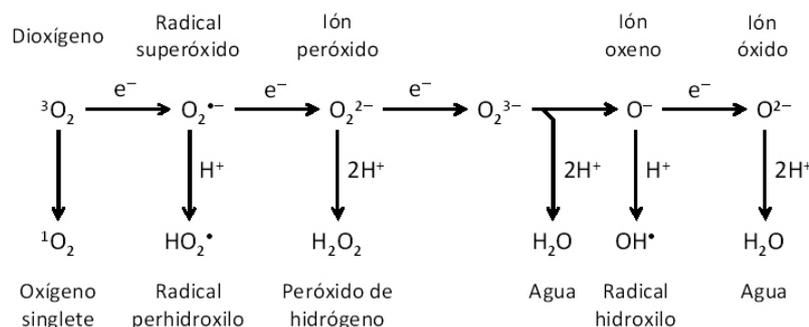


Figura 5. Generación de especies reactivas del oxígeno mediante redistribución electrónica o por reducción secuencial univalente (adaptado de Apel y Hirt, 2004).

Diferentes procesos metabólicos producen pequeñas cantidades de ROS, como los que ocurren en el retículo endoplasmático, los microsomas y los peroxisomas. Sin embargo, la fuente endógena más importante de especies reactivas es la CTE en la mitocondria, donde las ROS se generan como producto secundario del proceso de fosforilación oxidativa durante la respiración aerobia, que consume cerca del 90 % del O_2 celular (Balaban et al., 2005). En la CTE, los electrones se transfieren al NADH y el FADH_2 , a través de cuatro complejos (CI, CII, CII y CIV) unidos a la membrana interna mitocondrial y finalmente al O_2 generando agua; se produce, también, la reducción tetravalente del O_2 a agua catalizada por la enzima citocromo c oxidasa (CIV). Ocasionalmente, algunos electrones escapan al control enzimático, se fugan de la membrana interna y reaccionan con el O_2 formando $\text{O}_2^{\bullet-}$. Esta pérdida de electrones se da en los complejos I, II y III por la autooxidación de sus componentes, destacando el CI y el CIII. Se estima que el 1-2 % del O_2 consumido por las células se transforma en radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Boveris y Chance, 1973).

Otros enzimas capaces de producir $\text{O}_2^{\bullet-}$ son la xantina oxidasa en el citosol, la NADPH oxidasa y la citocromo P450 (CYP450) del retículo endoplasmático (Ray et al., 2012). El H_2O_2 es producido por una amplia variedad de enzimas incluidas las monoxigenasas y las oxidasas.

Algunas de las especies menos reactivas del oxígeno ($\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2) pueden ser convertidas por una reacción redox con metales de transición u otros compuestos de ciclo redox en especies radicales más agresivas (Mayes et al., 2014). Metales como el hierro, cobre, cromo, vanadio y cobalto son capaces de realizar ciclos redox en los que un electrón puede ser aceptado o donado por el metal. Esta acción cataliza reacciones que producen radicales y puede producir ROS, las más importantes son la reacción de Fenton y la reacción de Haber-Weiss, en el que se producen radicales OH^{\bullet} de la reducción del hierro y el H_2O_2 (figura 6). La mayoría de las enzimas que producen ROS contienen uno de estos metales.

Adicionalmente, se generan especies reactivas del nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*) cuando el $\text{O}_2^{\bullet-}$ reacciona con el óxido nítrico (NO) (Circu y Aw, 2010), para formar peroxinitrito (ONOO^{\bullet}). Estas pueden dar lugar a reacciones consecutivas y formar otros tipos de RNS, como el dióxido de nitrógeno y el peroxicarbonato nitroso.

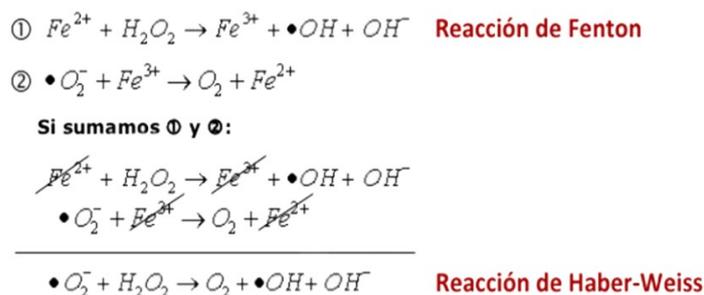


Figura 6. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss, en las que se produce el radical hidroxilo.

También, las reacciones de las ROS con otras moléculas llevan a la formación de ROS secundarios, no tan reactivos como los radicales libres, pero potencialmente nocivos. Estos ROS secundarios son resultado de la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, y participan en reacciones en cadena que conducen a la cooxidación y peroxidación de biomoléculas (Ray et al., 2012). Un resumen con la descripción de varias de estas especies químicas se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno y su descripción.

Radicales	Descripción
$^1\text{O}_2$, oxígeno singlete	Electrón externo con spin antiparalelo. Muy inestable y de vida media muy corta en medios hidrofílicos; su vida media se incrementa en medios hidrofóbicos, lo que le permite participar en procesos de peroxidación de lípidos.
O_2^- , radical anión superóxido	Estado de reducción del O_2 de un electrón, formado en reacciones de autooxidación y por la cadena de transporte de electrones. Poco reactivo, oxida compuestos ricos en Fe-S con liberación de Fe. Forma H_2O_2 por dismutación espontánea o por catálisis enzimática, y es un precursor de la formación de $\text{OH}\bullet$ catalizada por metales. Considerado la principal fuente de ROS.
$\text{HO}\bullet$, radical perhidroxilo	Carece de carga neta por lo que es capaz de aproximarse a biomoléculas. Su reactividad es suficiente para iniciar la peroxidación de lípidos (proceso poco estudiado).
H_2O_2 , peróxido de hidrógeno	Estado de reducción del O_2 de dos electrones, formado por la dismutación de O_2^- o por reducción directa del O_2 . Estable, con reactividad selectiva, soluble en lípidos y por ende capaz de difundir por membranas. Su toxicidad está dada por su transformación en $\text{OH}\bullet$, reacciona con la cisteína en dependencia del microambiente proteico.
$\text{OH}\bullet$, radical hidroxilo	Estado de reducción del O_2 de tres electrones, formado por la reacción de Fenton y la descomposición de peroxinitrito. Es el más reactivo de estos radicales, ataca a la mayoría de los componentes celulares.
ROOH, hidroperóxido orgánico	Radical orgánico formado por reacciones de radicales con componentes celulares como lípidos y nucleobases.
RO, alcoxi- y ROO, peroxi-	Radicales orgánicos centrados en oxígeno. Las formas lipídicas participan en reacciones de peroxidación de lípidos. Producidos por adición de radicales a dobles enlaces o eliminación de hidrógeno.
ONOO $^-$, peroxinitrito	Formado en una rápida reacción entre O_2^- y NO. Liposoluble y altamente reactivo. Por protonación forma ácido peroxinitroso, que puede formar radicales $\text{OH}\bullet$ y de dióxido de nitrógeno.

2.2. Defensas antioxidantes

La mayoría de las ROS se producen a un bajo nivel en condiciones fisiológicas normales; no obstante, su producción por el metabolismo aerobio celular es continua. De esta manera, han evolucionado mecanismos antioxidantes endógenos (*scavengers*) que protegen a las células del daño oxidativo y preservan la homeostasis celular.

Un antioxidante es cualquier sustancia que presente en bajas concentraciones, retrasa o inhibe la oxidación (Moreira et al., 2010). Pueden actuar de diferentes formas, bien (1) disminuyendo la concentración de oxidantes, (2) evitando la iniciación de la reacción en cadena al retener o detener la reactividad de los primeros radicales libres que se forman, (3) uniéndose a iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas, (4) transformando los peróxidos en productos menos reactivos y (5) deteniendo la propagación y el aumento de radicales libres.

En la célula existen antioxidantes no enzimáticos; los más abundantes son el glutatión, el ascorbato, el α -tocoferol y los carotenoides. El glutatión es un compuesto hidrosoluble particularmente abundante en numerosos tejidos; juega un papel central en el mantenimiento del balance redox celular al constituir una fuente principal de poder reductor (Sies, 1999). El ascorbato es una molécula hidrosoluble sintetizada por la mayoría de los vertebrados, sin embargo, no es el caso del ser humano que debe ingerirla; puede neutralizar radicales libres, oxidándose en el proceso, puede recuperarse al reducirse por las dehidroascorbato reductasas (Navas et al., 1994). El tocoferol es el antioxidante lipofílico más abundante en células animales; el grupo hidroxilo del anillo de cromanol posee capacidad reductora, al ser liposoluble puede acceder a los grupos alcoxilos reduciéndolos a alcoholes lipídicos, y a los grupos peroxilos de los lípidos reduciéndolos a hidroperoxilos e inhibiendo de este modo la propagación de la peroxidación de lípidos en cadena (Karademir y Ozer, 2014). Los carotenoides son antioxidantes lipofílicos con cientos de variedades, sin embargo, sólo unos pocos están en concentraciones relevantes en tejidos y plasma; tienen actividad antiinflamatoria, antimutagénica y anticarcinogénica, propiedades que pueden estar relacionadas con su capacidad antioxidante (Krinsky, 1993).

De los tres tipos principales de ROS (O_2^- , H_2O_2 e OH^\bullet), existen enzimas detoxificadoras (antioxidantes enzimáticos) solo para neutralizar los dos primeros; sin embargo, eliminando estos dos radicales se limita la formación del radical OH^\bullet .

El único enzima conocido para la eliminación de radicales O_2^- es la superóxido dismutasa (SOD). Existen tres isoenzimas diferentes dependiendo del metal presente en su centro activo: la SOD1 citoplasmática contiene Cu,Zn-SOD, la SOD2 mitocondrial contiene Mn-SOD y, por último, la SOD3 extracelular contiene Cu,Zn-SOD. Este grupo de metaloenzimas cataliza la dismutación del O_2^- a H_2O_2 (Fukai y Ushio-Fukai, 2011).

El H₂O₂ es eliminado por la acción de diversas enzimas: directamente por la catalasa, muy efectiva a altas concentraciones de H₂O₂ pero poco a bajas, o bien por la ascorbato peroxidasa (APX), por peroxidasa como las peroxiredoxinas (PRX) que contienen una cisteína sensible al H₂O₂, o por la glutatión peroxidasa (GPX), que elimina H₂O₂ e hidroperóxidos lipídicos empleando glutatión reducido (GSH) como poder reductor (Apel y Hirt, 2004; Rhee et al., 2012).

Esta batería de enzimas es apoyada por otras enzimas que actúan regenerando moléculas antioxidantes que son empleadas por las enzimas eliminadoras de H₂O₂ (Apel y Hirt, 2004). En este grupo, destacan la dehidroascorbato reductasa y la monodehidroascorbato reductasa que se encargan de regenerar el ascorbato; por otro lado, la glutatión reductasa (GR) que regenera el GSH que es empleado por muchas enzimas dependientes de GSH. Además, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa produce NADPH, que es empleado por la GR en el reciclaje del GSH a partir de glutatión oxidado (GSSG). Este NADPH también es empleado por enzimas como las tioredoxinas (TRX) y las glutaredoxinas (GRX), capaces de reparar proteínas oxidadas de forma reversible.

Adicionalmente, las células cuentan con mecanismos para restablecer el estado redox tras una exposición temporal a concentraciones elevadas de radicales libres. El aumento de los niveles de ROS, induce la expresión de genes que codifican para elementos con actividad antioxidante como las enzimas antioxidantes o moléculas que aumentan los niveles intracelulares de glutatión (Porcellotti et al., 2015). En este sentido, un mecanismo esencial en la defensa antioxidante celular es la activación de la vía de señalización mediada por Nrf2.

El factor de transcripción Nrf2 es codificado por el gen *NFE2L2*, y regula la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (del inglés *antioxidant response element*); puede ser activado por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa (Niture et al., 2014). Entre sus blancos se encuentran enzimas detoxificadoras de fase II (ej. CYP450), mediadores de la síntesis del glutatión, chaperonas, enzimas del metabolismo energético, TRX y subunidades del proteasoma (Valcarcel-Ares et al., 2012).

Está bien establecido que la actividad de Nrf2 está controlada, en parte, por la proteína citosólica Keap1. La actividad del factor Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión con Keap1 y al citoesqueleto; dicha unión fomenta la degradación permanente de Nrf2 por el proteosoma, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis *de novo*. Cuando un estado redox alterado es detectado, Keap1 libera de su inhibición a Nrf2 que puede entonces unirse a proteínas sMaf formando dímeros críticos para la transcripción de sus genes blanco (Niture et al., 2014). Los mecanismos reguladores implicados en la activación de la vía Nrf2 y por los que Keap1 actúa para reprimir la actividad de Nrf2 aún no se comprenden completamente.

2.3. Señalización y regulación redox

Las especies reactivas pasaron a formar parte, con la evolución, de un complejo sistema de señalización celular, denominado señalización redox, involucrado en la detección, la síntesis y la regulación de biomoléculas, así como, en procesos fundamentales del organismo (Sen y Packer, 1996). Esta función ha sido controversial debido a la paradoja entre la especificidad requerida para la señalización y la naturaleza altamente reactiva de los compuestos ROS (D'Autréaux y Toledano, 2007).

El reconocimiento en la señalización intracelular redox ocurre a nivel atómico a diferencia del nivel macromolecular al que ocurre el reconocimiento de receptores proteicos en la señalización clásica, por lo que en la primera se incrementa el número potencial de receptores diana. Sin embargo, se logra una alta especificidad mediante sensores de compuestos ROS que miden su concentración intracelular por reacción redox (D'Autréaux y Toledano, 2007). Por ejemplo, en procariontes como *E. coli* los factores de transcripción SoxR y OxyR son sensores de ROS regulados por la reacción del O_2^- con clusters de Fe-S y del H_2O_2 con la cisteína, respectivamente; la oxidación del cluster Fe-S de SoxR provoca un cambio conformacional en el operador induciendo la expresión de genes diana (D'Autréaux y Toledano, 2007).

En mamíferos los receptores de ROS son menos conocidos y las vías de señalización difieren de procariontes, ya que forman parte de extensos programas metabólicos y responden a múltiples señales fisiológicas, generando protección frente al estrés oxidativo o disparando la apoptosis en células dañadas por oxidación. La especificidad se logra mediante la producción intracelular compartimentalizada de las especies reactivas, particularmente el H_2O_2 , y por la modulación local de su flujo por el sistema antioxidante, especialmente el GSH (D'Autréaux y Toledano, 2007).

A nivel postraduccional, la modificación oxidativa es un mecanismo importante en la regulación redox de las funciones proteicas (England y Cotter, 2005). Diferentes aminoácidos se modifican directamente por oxidación, siendo la metionina y la cisteína, que contienen azufre, blancos preferenciales. Estas modificaciones oxidativas producen cambios estructurales/conformacionales y funcionales, pudiendo conducir a la activación o la inhibición de la proteína (Trachootham et al., 2008). Las modificaciones oxidativas de cisteínas tienen funciones reguladoras en proteínas tales como las PRX, TRX, GPX, p53, I κ B, RAS, Akt, tirosina quinasas y fosfatasas; e influyen en procesos como la degradación proteosomal y el estado de fosforilación celular (D'Autréaux y Toledano, 2007; Trachootham et al., 2008). La modificación de tirosinas por RNS implica que la proteína pierda su capacidad como sustrato para la fosforilación, inhibiendo la activación de quinasas como JNK, p38MAPK y PKC (Tonks, 2005). Por el contrario, la oxidación reversible de un residuo de metionina en la CaM es esencial en su función como proteína reguladora de calcio (Bigelow y Squier, 2005).

A nivel transcripcional, la regulación se ejerce a través de cisteínas redox sensibles, presentes en varios factores de transcripción en sus sitios de unión al ADN (Haddad, 2002). Se regulan así factores de gran importancia en la supervivencia celular (ej. NF- κ B, AP-1, HIF-1 α , p53); en la mayoría de los casos, la oxidación del grupo tiol inhibe su unión al ADN (Turpaev, 2002). También, las concentraciones de H₂O₂ regulan las funciones de factores como PGC1 α , c-Myc y FOXO, activando los dos primeros respuestas antioxidantes, y muerte celular o estado de quiescencia el último (Benassi et al., 2006; Burgering y Kops, 2002; St-Pierre et al., 2006). Adicionalmente, se describe que la enzima histona deacetilasa es redox sensible (Rahman et al., 2004); por lo que, los niveles de ROS/RNS pueden también regular la expresión génica mediante la modulación de la remodelación de la cromatina.

Es de destacar el papel del factor de transcripción redox sensible NF- κ B, que coordina la transcripción de múltiples genes reguladores de la inmunidad, la inflamación, el desarrollo, la proliferación y la supervivencia celular (Trachootham et al., 2008). En mamíferos, la familia NF- κ B está constituida por NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB y c-Rel. Sus miembros se caracterizan por la presencia de regiones homologas a Rel (RHM, del inglés *Rel homology domain*) (Kopitar-Jerala, 2015). Las RHN se unen a secuencias de ADN tipo κ B presentes los promotores de los genes que regulan activando su expresión (ej. *IL-1 β* , *IL6* y *TNF α*), median la dimerización entre los miembros de la familia (el heterodímero p65/p50 es la forma más común), y la asociación de los dímeros de NF- κ B con sus inhibidores de la familia I κ B. La forma inactiva de NF- κ B se localiza en el citoplasma en complejo con proteínas I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , p100, p105, Bcl3, I κ Bns), las cuales enmascaran la señal de localización de nuclear de NF- κ B evitando su translocación al núcleo (Kopitar-Jerala, 2015). Debido a múltiples estímulos (ej. estrés oxidativo y citoquinas) las proteínas I κ B son fosforiladas por el complejo multiproteico IKK y sometidas a degradación proteasomal, liberando al dímero NF- κ B (Sen y Smale, 2010).

Las ROS parecen tener efectos paradójicos en la regulación de NF- κ B, pudiendo activarlo o inhibirlo en dependencia del nivel de ROS, tipo de estímulo y tipo celular. El aumento moderado de ROS suele conducir a la activación de NF- κ B; por el contrario, un aumento severo de ROS puede inactivarlo conduciendo a la muerte celular (Trachootham et al., 2008). Ante estrés oxidativo, la activación de NF- κ B conduce a la expresión elevada, entre otros, de miembros de la familia Bcl-2 antiapoptóticos, inhibidores de caspasas (ej. IAPs) y antioxidantes (ej. Mn-SOD), promoviendo la supervivencia celular (Karin y Lin, 2002). Se ha observado que en el cerebro la señalización por NF- κ B se activa en procesos fisiológicos y patológicos como neurogénesis del hipocampo, crecimiento neuronal, aprendizaje y memoria (Crampton y O'Keeffe, 2013), y la polarización funcional de la microglia (Brifault et al., 2015) y astrocitos (Jha et al., 2016) hacia un fenotipo proinflamatorio en enfermedades neurodegenerativas (Frakes et al., 2014; Ghosh et al., 2007).

3. Estrés y daño oxidativo

El delicado balance entre la generación de ROS y su eliminación, o equilibrio redox, se mantiene por complejos mecanismos, cualquier disfunción de los mismos puede conllevar a alteraciones en el estado redox celular. Un aumento en la producción de ROS o una disminución en la capacidad de su eliminación debido a estímulos exógenos o alteraciones metabólicas endógenas pueden destruir la homeostasis redox, produciendo un aumento generalizado de los niveles de ROS intracelulares, o estrés oxidativo (Circu y Aw, 2010; Trachootham et al., 2008). Bajo condiciones de estrés oxidativo, el exceso de ROS/RNS ataca de manera constante a las biomoléculas. Todos los tipos de macromoléculas biológicas (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos) son sensibles al ataque oxidativo, el cual ocasiona daño oxidativo, que en condiciones de estrés puede ser severo e irreversible. La magnitud final del daño dependerá de la intensidad de producción de radicales libres, la resistencia de las moléculas a ser oxidadas y la eficiencia en la reparación o reemplazo de las mismas. El estrés oxidativo juega un papel crucial en el envejecimiento y en una variedad de patologías asociadas a la edad (Harman, 2001; Martínez et al., 2010; Perluigi et al., 2014).

3.1. Daño oxidativo al ADN

En condiciones fisiológicas, el ADN celular es constantemente atacado por ROS; se ha estimado que en mamíferos existen aproximadamente 15 000 aductos oxidativos de ADN por célula (Beckman y Ames, 1997). El ADN no es atacado directamente por el radical O_2^- o el H_2O_2 , sin embargo, en presencia de metales de transición estas especies generan el radical OH^\bullet , que es capaz de atacar al ADN. El H_2O_2 juega un papel fundamental pues es capaz de atravesar las membranas lipídicas y, al ser relativamente estable, difundir hasta zonas alejadas de su lugar de formación, donde puede reaccionar con metales de transición como los que forman parte de la cromatina y generar el radical OH^\bullet (Halliwell, 1998).

Tanto las bases púricas como pirimidínicas son susceptibles al ataque oxidativo. La alteración oxidativa de bases en el ADN es mutagénica al poder inducir transversiones G-T o C-A (Loft y Poulsen, 1996). Existen numerosas modificaciones de bases nitrogenadas (figura 7), entre ellas la 8-oxoadenina, la 2-hidroxiadenina, el 5-hidroximetiluracilo, la 5-hidroxicitosina, la citosina glicol y la timidina glicol (Loft y Poulsen, 1996). No obstante, la base más empleada como marcador de ataque oxidativo al ADN es la guanina; la oxidación de su carbono 8 da lugar a la formación de la base modificada 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), es el marcador más utilizado para cuantificar el daño oxidativo al ADN.

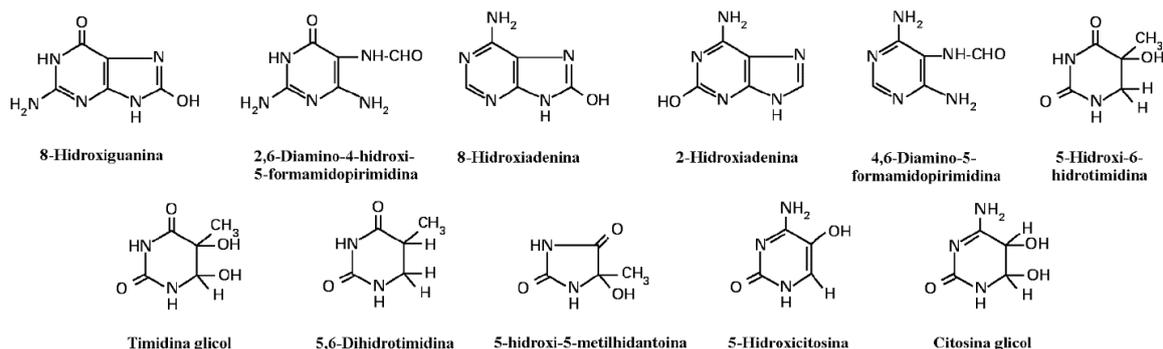


Figura 7. Modificaciones oxidativas de bases nitrogenadas del ADN.

Existen sistemas de reparación del daño oxidativo al ADN, sin embargo, su eficacia no es del 100 %, lo que, unido a posibles errores en la reparación, puede provocar la aparición de alteraciones genéticas y mutaciones. El número de copias de ADN es limitado y cuando todas las copias de un gen resultan dañadas, la información codificada en el mismo se pierde de manera definitiva para la célula. Como ejemplo, la 8-oxodG es una base nitrogenada alterada y mutágena que es reparada tanto en el núcleo como en la mitocondria, aunque de una forma más intensa en el primero (Bohr, 2002).

Tanto el ADNmt como el nuclear son sensibles al ataque oxidativo, sin embargo, el ADNmt presenta unos niveles de daño oxidativo unas 10 veces superiores a los del ADN nuclear (Barja y Herrero, 2000). Este hecho se justifica porque el ADNmt está mucho más expuesto que el nuclear, está más próximo a la fuente de producción de radicales, y menos protegido, al carecer de histonas y mecanismos de reparación de mutaciones (Richter et al., 1995). Además, al carecer de intrones, posee una mayor densidad de información en su cadena, por lo que es más probable que cualquier mutación afecte la funcionalidad de los genes codificados en el mismo.

3.2. Daño oxidativo a lípidos

Los ácidos grasos insaturados presentes en las membranas son muy susceptibles a la oxidación y se convierten en lípidos peroxidados cuando son atacados por las ROS (Pizzimenti et al., 2013), mediante el proceso de peroxidación lipídica (PL). En este proceso se distinguen tres etapas: iniciación, propagación y terminación (figura 8). La descripción de las etapas del proceso de PL, si no se indica algo diferente, ha sido adaptada de un trabajo de revisión de Ayala y colaboradores (Ayala et al., 2014).

Durante la iniciación un radical libre, usualmente el $\text{OH}\cdot$, extrae un electrón de un átomo de carbono adyacente a un doble enlace, transformando el ácido graso en un radical alquilo ($\text{L}\cdot$). El radical O_2^- y el H_2O_2 por si solos no inician la PL, pero en presencia de metales de transición pueden generar $\text{OH}\cdot$; especies como el $^1\text{O}_2$ y los radicales halogenados también pueden participar en la iniciación.

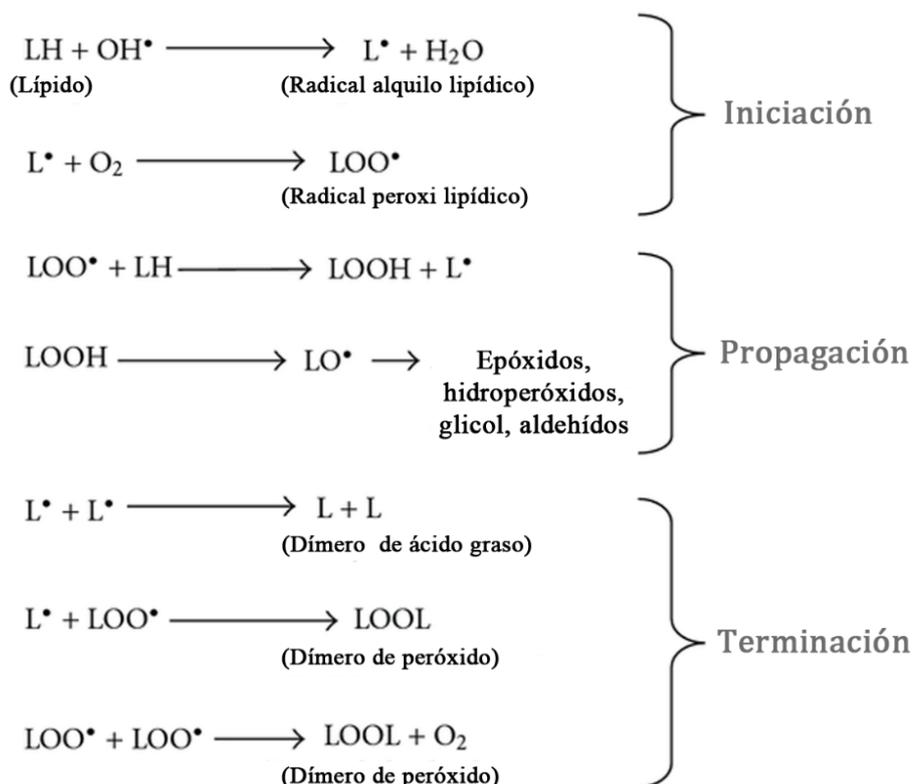


Figura 8. Etapas del proceso de peroxidación lipídica (adaptado de Ayala et al., 2014).

Los radicales L^\bullet pueden formar enlaces cruzados intra o intermoleculares, pero lo habitual es que reaccionen con el O_2 generando un radical peroxilo de origen lipídico (LOO^\bullet). Estos radicales (L^\bullet y LOO^\bullet) tienden a estabilizarse mediante un reordenamiento electrónico que origina un dieno conjugado.

En la etapa de propagación, el radical LOO^\bullet se transforma en un hidroperóxido lipídico (LOOH) al reaccionar, usualmente, con el doble enlace de un ácido graso adyacente, que a su vez se transforma en un radical L^\bullet . Así, se genera una reacción en cadena que puede producir daño oxidativo a una gran cantidad de moléculas.

Los hidroperóxidos lipídicos son relativamente estables y pueden ser eliminados mediante la acción de las GPX o por su reacción con la vitamina E. Sin embargo, en presencia de metales de transición pueden sufrir una reacción análoga a la de Fenton que permite la formación de compuestos cíclicos denominados endoperóxidos, los cuales al descomponerse forman diferentes aldehídos reactivos. Ejemplos de estos aldehídos son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonanal (HNE), que son capaces de unirse a macromoléculas (ADN, lípidos y proteínas) causando daño oxidativo y alterando su estructura y función (Vistoli et al., 2013).

En la etapa terminación la especie reactiva de ácido graso puede reaccionar con radicales contiguos dando lugar a enlaces cruzados L-L, reaccionar con metales de transición generando nuevos radicales libres o fragmentarse originando aldehídos que a su vez reaccionan con otras moléculas generando productos secundarios.

El proceso de PL puede alterar las membranas biológicas, iniciando un deterioro acumulativo de sus funciones, al provocar la disminución de la fluidez por un incremento del orden y la viscosidad de las mismas, la reducción en el potencial electroquímico y el aumento de la permeabilidad (Persson et al., 2014). También, disminuye la actividad de la ATPasa de $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$ (Anzai et al., 1999), afecta receptores de membrana (Yehuda et al., 2002) y facilita el intercambio de fosfolípidos entre las dos monocapas y aumenta los entrecruzamientos con proteínas (Farooqui y Horrocks, 1998), lo que disminuye la movilidad de estas últimas (Richter, 1987). Si se propagan en exceso, las reacciones de PL pueden llegar a destruir las membranas biológicas.

Debido a la gran cantidad de dobles enlaces que presentan los PUFA, son muy sensibles al ataque de los radicales libres. PUFA como el ácido araquidónico (AA), el docosahexaenoico (DHA, del inglés *docosahexaenoic acid*), el linoleico y el eicosapentanoico, contienen múltiples dobles enlaces metileno ($-\text{CH}_2-$), con hidrógenos reactivos susceptibles de peroxidarse. El índice de dobles enlaces (DBI, del inglés *double bond index*) hace referencia al grado de instauración de los lípidos y el índice de peroxidabilidad (PI, del inglés *peroxidizability index*) es una medida de la susceptibilidad relativa de una membrana a la PL, estimada a partir de su perfil de ácidos grasos (Naudí et al., 2015). Así, las membranas que contienen gran cantidad de PUFA y elevados DBI y PI son frágiles frente a la acción de los radicales libres, al presentar una sensibilidad aumentada al proceso de PL (Pamplona et al., 2002).

3.3. Daño oxidativo a proteínas

Las proteínas son las dianas más relevantes de los radicales libres ya que son las macromoléculas biológicas más abundantes y funcionalmente diversas en los organismos vivos (Trnková et al., 2015). Se ha estimado que un 50-75 % de las ROS/RNS reaccionan con proteínas y que las modificaciones subsecuentes tienen una vida media larga, por lo que los residuos proteicos modificados pueden ser considerados marcadores sensibles de lesión oxidativa (Dean et al., 1997).

Las reacciones químicas resultantes del ataque de ROS/RNS a proteínas son complejas, debido a la complejidad estructural de estas moléculas, y dan lugar a múltiples productos de oxidación, dependiendo, en parte, de la zona atacada en la estructura proteica (Dean et al., 1997; Trnková et al., 2015). La susceptibilidad a la oxidación varía entre proteínas, debido a factores como su composición aminoacídica, conformación espacial, velocidad de degradación y presencia de centros Fe-S (Agarwal y Sohal, 1995; Dean et al., 1997; Requena et al., 2003).

Las ROS pueden atacar directamente el esqueleto carbonado de la proteína, involucrando diferentes reacciones y originando productos diversos que se representan esquemáticamente en la figura 9.

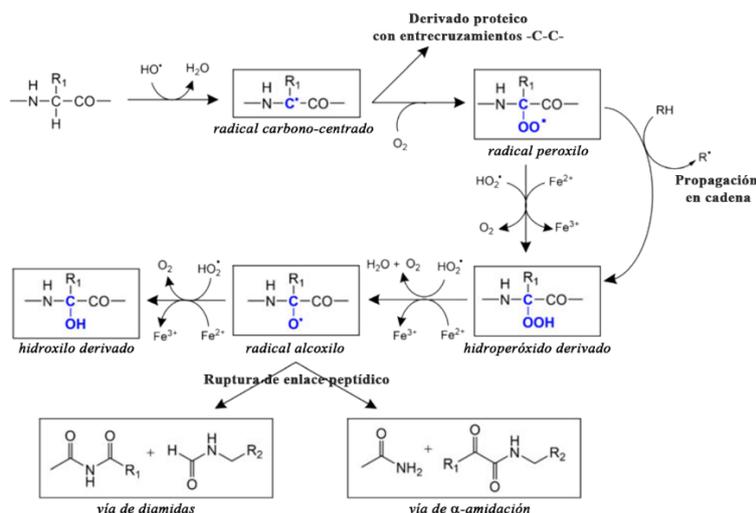


Figura 9. Oxidación del esqueleto proteico (adaptado de Trnková et al., 2015).

Las cadenas laterales de los residuos aminoácidos son también susceptibles a la oxidación por radicales libres produciendo diversos productos (tabla 2), y generando, a menudo, proteínas irreversiblemente modificadas que deben ser eliminadas del organismo por degradación proteolítica (Trnková et al., 2015).

Tabla 2. Modificaciones oxidativas de las cadenas laterales de los residuos aminoácidos.

Aminoácido	Producto
Arg	Semialdehído α -glutámico (carbonilos), AGEs.
Cys	Ácidos sulfénico, sulfínico y sulfónico, disulfuros, nitroso-Cys.
Glu	Ácido oxálico, aductos de piruvato, hidropéroxidos.
His	2-oxohistina, 4-hidroxi-Glu, hidropéroxidos.
Ile	Hidropéroxidos.
Leu	3-hidroxi-Leu, 4-hidroxi-Leu, 5-hidroxi-Leu, hidropéroxidos.
Lys	Semialdehído α -aminoadipídico (carbonilos), AGEs, hidropéroxidos.
Met	Met-sulfóxido, Met-sulfona.
Phe	2-, 3- y 4-hidroxi-Phe, DOPA.
Pro	Semialdehído α -glutámico (carbonilos), 2-pirrolidona (carbonilos), ácido 4- y 5-hidroxi-Pro, ácido piroglutámico, hidropéroxidos.
Thr	Ácido 2-amino-3-cetobutírico (carbonilos).
Trp	2-, 4-, 5-, 6- y 7-hidroxi-Trp, <i>N</i> -formilquinurenina, quinurenina, 3-hidroxiquinurenina, 6-nitro-Trp, bi-Trp, hidropéroxidos.
Tyr	DOPA, bi-Tyr, 3-cloro-Tyr, 3,5-dicloro-Tyr, 3-nitro-Tyr, hidropéroxidos.
Val	Hidropéroxidos.

AGEs: Productos finales de glicación avanzada; DOPA: 2,3-dihidroxifenilalanina.

En este sentido, la sensibilidad a la oxidación varía entre aminoácidos, los residuos con más tendencia a ser modificados son la cisteína y la metionina, con cadenas laterales que contienen azufre (Dean et al., 1997). Sin embargo, la mayoría de estas oxidaciones, aunque no todas (ej. S-carboximetilcisteína y S-2-succinilcisteína), son reversibles por reductasas disulfuro, el sistema del glutatión y TRX (Trnková et al., 2015). También, las cadenas laterales de determinados aminoácidos (ej. Lys, Arg, Pro, Thr e His) sufren, fácilmente, oxidación catalizada por iones metálicos con un mecanismo sitio-específico (Davies, 2012).

Las cadenas laterales de determinados residuos (ej. His, Ileu, y Val) en las proteínas sufren oxidación en presencia de ROS/RNS (ej. OH•, O₂⁻, ¹O₂) para formar el hidroperóxido correspondiente como principal producto (Davies, 2012). Los hidroperóxidos de aminoácidos se descomponen rápidamente en presencia de agentes catalizadores (ej. iones de metales de transición, calor, luz) para dar una variedad de radicales que incluyen el alcoxilo, el peroxilo y especies carbono-centradas (Rahmanto et al., 2010). Por ello, los hidroperóxidos proteicos son capaces de propagar el daño oxidativo a otras biomoléculas incluyendo lípidos, proteínas y el ADN (Luxford et al., 2002; Rahmanto et al., 2010).

Los carbonilos derivados de la oxidación de proteínas (aldehídos y cetonas) son compuestos altamente reactivos producidos por diferentes mecanismos (ej. oxidación directa catalizada por metal de residuos como la lisina o escisión oxidativa del esqueleto peptídico vía α -amidación). Estos carbonilos pueden formarse, también, de la interacción de las cadenas laterales de los aminoácidos con productos de PL (ej. HNE y MDA) o con derivados carbonilos reactivos (RCS, del inglés *reactive carbonyl species*), cetoaminas, cetoaldehídos y deoxiosonoas, generados como consecuencia de la reacción de azúcares reductores y sus productos de oxidación con los residuos de lisina de las proteínas (reacciones de glicación y glicoxidación) (Trnková et al., 2015). La carbonilación da como resultado la introducción de grupos carbonilo en los residuos de aminoácidos nucleofílicos, fácilmente cuantificables, por lo que se le considera un marcador fiable de estrés oxidativo, y es en la práctica el método más frecuentemente empleado para la detección de la modificación oxidativa de proteínas (Dalle-Donne et al., 2003; Madian y Regnier, 2010).

El daño oxidativo a proteínas produce resultados diversos, como la fragmentación, despliegue o mal plegamiento, entrecruzamiento, así como la oxidación de cadenas laterales conllevando a la pérdida de actividad (Avery, 2011; Miller y Shaklai, 1994). Las proteínas modificadas oxidativamente deben, en su mayoría, ser eliminadas del organismo por degradación proteolítica; una disminución en la eficiencia de la proteólisis provoca su acumulación celular, lo que puede conducir a la interrupción de las funciones celulares, ya sea por pérdida de la integridad catalítica y estructural o por interrupción de vías reguladoras (Avery, 2011; Davies, 2012; Shacter, 2000). El contenido de proteínas oxidativamente modificadas en las células refleja el equilibrio entre las actividades oxidantes y antioxidantes del organismo y es dispuesto por los factores ambientales, genéticos y dietéticos prevalecientes.

3.3.1. Lipoxidación y daño oxidativo a proteínas

Los productos finales de lipoxidación avanzada (ALE, del inglés *advanced lipoxidation end-products*) incluyen a una variedad de aductos que se generan por la reacción no enzimática de RCS con los sitios nucleofílicos de macromoléculas tales como el ADN, aminofosfolípidos y las proteínas, llevando a su modificación irreversible (Pamplona et al., 2005). Por ello, la PL de macromoléculas es considerada una carbonilación secundaria, ya que sus productos inician una reacción de carbonilación. Las ALE más estudiadas son las que surgen de la reacción de productos de ruptura (RCS) de la cascada de PL con los restos nucleófilos de las proteínas, principalmente los residuos de cisteína, lisina, histidina y arginina (Vistoli et al., 2013). Las RCS son producidas por PL no enzimática (previamente descrita) y el metabolismo lipídico (figura 10).

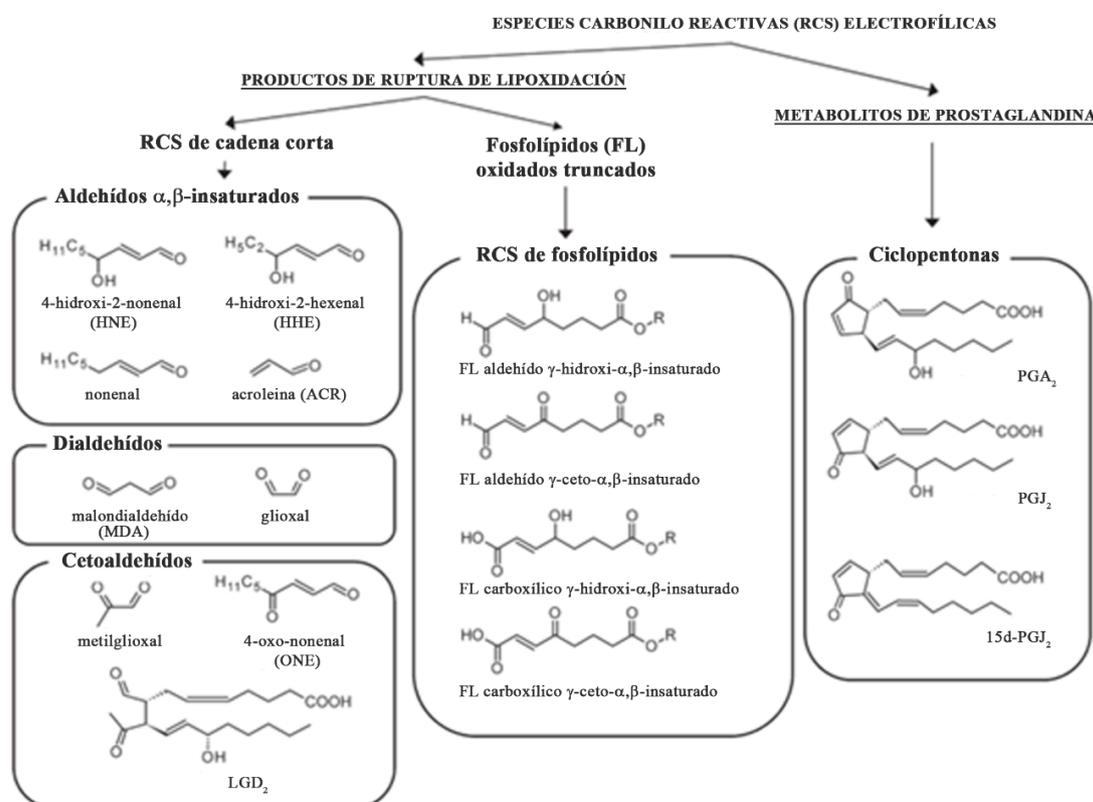


Figura 10. Especies carbonilo reactivas originadas por lipoxidación y el metabolismo de prostaglandinas (adaptado de Vistoli et al., 2013).

Como parte del metabolismo de lípidos los PUFA sufren oxigenación por los sistemas enzimáticos de la cicloxigenasa (COX), lipoxigenasa (LOX) y de citocromos P450, generando una serie de compuestos que pueden dar lugar a RCS (Massey y Nicolaou, 2013). Las RCS que surgen de la PL son heterogéneas (Vistoli et al., 2013). Incluyen RCS de cadena corta que pueden dividirse en tres clases principales: (1) aldehídos α,β -insaturados hidroxilados (ej. HNE) y no hidroxilados (ej. acroleína), (2) dialdehídos (ej. MDA y glioxal), y (3) cetoaldehídos (ej. metilglioxal) e isoketals, también llamados levuglandinas, que son

γ -cetoaldehídos formados a través de la vía de los isoprostanos como los neuroketals (NKT). Además, se generan RCS también producto de la PL que son fosfolípidos truncados oxidados, en los que el resto electrófilo permanece unido covalentemente al fosfolípido. Una clase adicional de RCS capaz de formar aductos de proteína está representada por los metabolitos electrofílicos de prostaglandina (PG) (Vistoli et al., 2013), que se caracterizan por tener un resto carbonilo α,β -insaturado (ciclopentenona). Entre estas RCS, son de mencionar la PGA_2 generada a partir de la deshidratación de PGE_2 y la $15d-PGJ_2$ que se genera como consecuencia de la deshidratación de PGD_2 , un producto principal de la COX-2 formado en varias células y tejidos durante los procesos inflamatorios (Rink y Khanna, 2011).

El HNE es el subproducto tóxico peroxidado mejor estudiado. Se forma a partir de la PL no enzimática de PUFA, mayormente de la serie ω -6 como el linoleico o el araquidónico; además, es producido enzimáticamente por la acción de LOX-15 sobre los PUFA ω -6 (Pratt et al., 2011). Se une covalentemente a aminoácidos como cisteína, histidina y lisina (Perluigi et al., 2012), dependiendo su grado de reactividad de la accesibilidad a los aminoácidos en la estructura proteica (Sultana et al., 2013). Su unión a proteínas puede alterar su estructura y función; por ejemplo, la unión del HNE a las ATPasas de Ca^{2+} y Na^+/K^+ , contribuye al incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} y Na^+ , disfunción mitocondrial y producción adicional de ROS (Sultana et al., 2013).

El HNE es un agente oxidante altamente reactivo y, a su vez, una molécula señalizadora de estrés (Esterbauer et al., 1991), ilustrando la dualidad de funciones que pueden presentar los productos de PL. Dependiendo del tipo celular y el estado metabólico, las consecuencias de la acción del HNE pueden ser diferentes (Eckl, 2003). Niveles bajos de HNE pueden activar la expresión de Nrf2, AP-1, NF- κ B, MAPK y PPAR para inducir una respuesta antioxidante, niveles medios inducen daño a proteínas y orgánulos que conllevan a autofagia, senescencia o arresto del ciclo celular, mientras que niveles altos inducen apoptosis o necrosis (Ayala et al., 2014). Es de señalar que los niveles celulares de HNE se regulan, ya que puede ser eliminado mediante el glutatión, aldehído deshidrogenasas, aldo-ceto reductasas y alcohol deshidrogenasas; las glutatión S-transferasas, MRP1 y la carnosina contribuyen también a la regulación de sus niveles (Guiotto et al., 2005; Mitchell y Petersen, 1987; Sultana y Butterfield, 2004).

El MDA es frecuentemente el aldehído más abundante que resulta de la PL y se presenta en materiales biológicos en varias formas de unión covalente (Vistoli et al., 2013). Se produce por PL no enzimática de PUFA de las series ω -3 y ω -6, así como subproducto enzimático durante la biosíntesis del tromboxano A2 por el catabolismo del AA mediado por la COX-2 (Dei et al., 2002). En comparación con otras RCS, el MDA es relativamente menos reactivo a pH neutro; sin embargo, su reactividad se incrementa a un pH bajo, reaccionando preferentemente con los aminoácidos lisina, histidina y arginina. Se han descrito numerosas proteínas como modificadas por MDA, incluyendo enzimas, proteínas transportadoras, del citoesqueleto,

mitocondriales y antioxidantes (Zarkovic et al., 2013). Adicionalmente, el MDA puede actuar como molécula de señalización, regula la expresión génica de la secreción de insulina a través de la vía Wnt (Wang et al., 2014) y en el hígado induce la expresión de colágeno (García-Ruiz et al., 2002). El MDA es metabolizado por la aldehído deshidrogenasa mitocondrial a acetaldehído (Marnett et al., 1985) y por la fosfoglucoasa isomerasa a metilglioxal (Agadjanyan et al., 2005). El MDA y el acetaldehído pueden formar por entrecruzamiento aductos estables (MAA), que reaccionan covalente y sinérgicamente con proteínas, formando aductos MAA-proteína. Estos últimos pueden ser proinflamatorios y profibrogénicos, y son capaces de inducir respuestas inmunológicas fuertes (Veneskoski et al., 2011).

Otro grupo de compuestos altamente reactivo, pero poco estudiado, son los γ -cetoaldehídos NKT, que se generan durante la PL no enzimática de PUFA como el DHA (ω -3), preferentemente, y el AA (ω -6), mediante la vía de los neuroprostanos (Bernoud-Hubac et al., 2001). Esta serie de compuestos se unen con notable rapidez a los residuos de lisina causando lipoxidación proteica e induciendo a la reticulación y la agregación (Miller et al., 2014). Debido a la formación preferente de NKT a partir de DHA, se propone que proporcionan una ventana única para la cuantificación del daño oxidativo de las membranas neuronales; debido a que a diferencia del AA que se distribuye uniformemente entre tipos celulares, el DHA se encuentra muy concentrado en las membranas neuronales (Bernoud-Hubac et al., 2001).

De manera general, el daño por lipoxidación a las proteínas que da lugar a los ALE se caracteriza por la unión covalente de un motivo lipídico oxidado (ej. HNE, MDA y NKT) a estas moléculas alterando su estructura y función (Perluigi et al., 2014). Este daño proteico se puede traducir en la alteración de múltiples procesos de vital importancia para la supervivencia celular como la integridad de las membranas (Farooqui y Horrocks, 1998), la señalización (Springer et al., 1997) o excitotoxicidad (Monyer et al., 1990).

3.3.2. Glicación/glicoxidación y daño oxidativo a proteínas

La glicación no enzimática consiste en la interacción de grupos carbonilo de azúcares reductores (ej. glucosa), sus metabolitos reactivos (ej. α -oxoaldehídos) u otros parientes carbohidratos (ej. ácido ascórbico), con las proteínas; un proceso que depende de la concentración del monosacárido y del tiempo de contacto, determinado por la vida media de la proteína en particular. Inicialmente se produce la unión no enzimática y reversible del grupo aldehído (ej. de la glucosa) con grupos amino libres de las proteínas (ej. amino terminal o ϵ -amino de la Lys) dando lugar a la formación de aldíminas o bases de Schiff como productos de glicación temprana. Posteriormente, por reordenamientos moleculares se generan compuestos de Amadori o Heyns (fructosaminas), que son productos intermedios. A continuación, los compuestos de Amadori participan en una serie de reacciones irreversibles, colectivamente llamadas reacciones de Maillard, para dar lugar a productos finales de glicación avanzada (AGE, del inglés *advanced glycation end-products*) (Simm et al., 2015).

Se producen reacciones similares con compuestos que contienen un grupo aldehído producidos a través de vías enzimáticas y no enzimáticas (Vistoli et al., 2013). La glucólisis produce dicarbonilos altamente reactivos como el metilglioxal y el glioxal que pueden interactuar con las proteínas para formar rápidamente AGE. Los dicarbonilos reactivos también pueden generarse a partir de cetonas, lípidos y otras vías metabólicas (figura 11). Cabe destacar que RCS como el glioxal y el metilglioxal son generados por oxidación tanto de lípidos como de azúcares, por lo que los productos de reacción correspondientes con las proteínas pueden denominarse tanto ALE como AGE. La principal fuerza motriz tras la formación y acumulación de AGE es un estado de estrés carbonílico, que puede ser causado por el aumento de la producción de dicarbonilos reactivos o una detoxificación reducida por el sistema de la glioxalasa o *scavengers* endógenos (Simm et al., 2015).

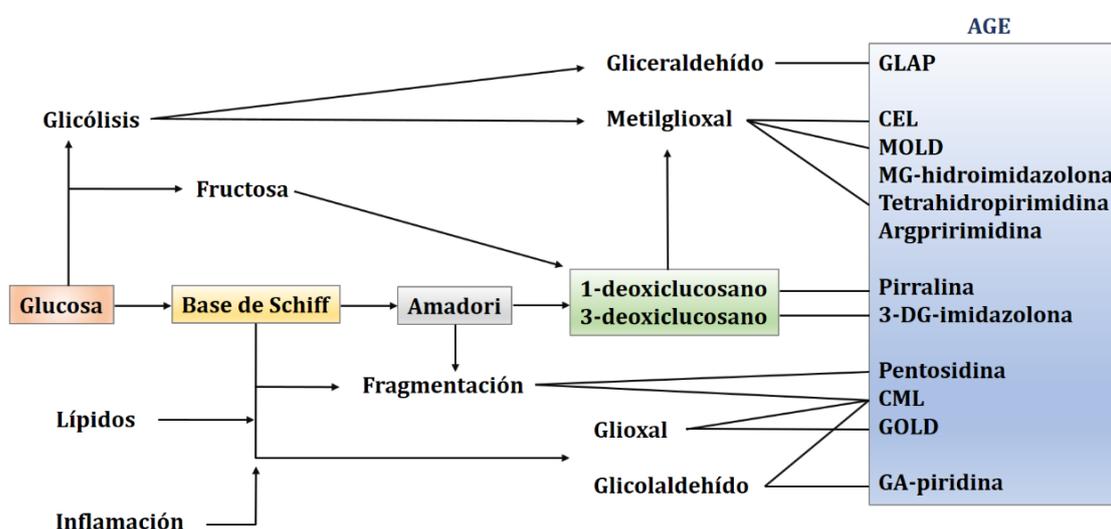


Figura 11. Vías de formación de productos finales de glicación avanzada.

La formación de AGE comprende reacciones de deshidratación, condensación cíclica, entrecruzamientos intermoleculares y oxidación por ROS; por ello, la combinación de las reacciones de glicación y oxidación es llamada en conjunto glicoxidación (West, 2000). Los AGE son un grupo de compuestos químicamente complejos y heterogéneos (figura 12), de los cuales solo unos pocos se han caracterizado completamente (Trnková et al., 2015). Entre ellos, la *N*- ϵ -carboximetil-lisina (CML) y la *N*- ϵ -carboxietil-lisina (CEL), se encuentran bien caracterizados y existen anticuerpos comerciales disponibles para su detección y cuantificación (Ahmed et al., 1997; Fu et al., 1996).

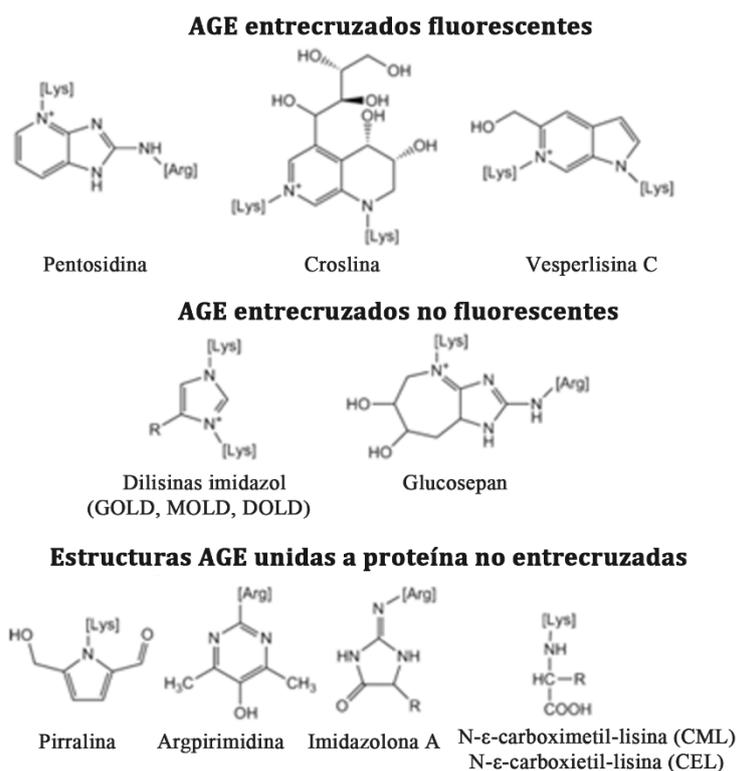


Figura 12. Algunos productos finales de glicación avanzada (AGE, del inglés *advanced glycation end-products*) (adaptado de Trnková et al., 2015).

Los AGE causan cambios importantes en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas: aumento en su peso molecular, capacidad de agregación y formación de enlaces cruzados, una pigmentación amarillo-marrón, o una generación de fluorescencia (Trnková et al., 2015; Vistoli et al., 2013). De esta manera, los AGE pueden afectar significativamente la función de las proteínas y, en general, el funcionamiento celular. Los AGE pueden modificar la matriz extracelular, modificar la acción de las hormonas, citoquinas y radicales libres a través de la participación de receptores de la superficie celular (ej. RAGE), y afectar a la función de las proteínas intracelulares (Wei et al., 2013).

3.3.3. Proteómica redox

Existen diversas técnicas inmunoquímicas disponibles para identificar los niveles generales de modificación oxidativa proteica; sin embargo, no proporcionan información específica sobre las proteínas individuales que han sido modificadas. En este sentido, se ha desarrollado la proteómica redox, que abarca el conjunto de técnicas que permiten la identificación de proteínas específicas modificadas oxidativamente (ej. por HNE o MDA) y la comparación de sus niveles (Castegna et al., 2002). Existen dos métodos o estrategias principales, los basados en geles y los no basados en geles (Perluigi et al., 2014).

La proteómica redox basada en geles es la estrategia más ampliamente utilizada para la identificación de proteínas oxidadas a partir de muestras complejas (Butterfield et al., 2012). Emplea la electroforesis bidimensional en geles de

poliacrilamida, mediante la cual las proteínas son separadas inicialmente por su punto isoeléctrico y a continuación por su peso molecular, dando como resultado un mapa de puntos proteicos específico con localización en el eje XY. Posteriormente, la detección de la modificación oxidativa de interés se puede realizar mediante *Western-blot* con anticuerpos específicos. Dos geles idénticos se corren en paralelo para una misma muestra: el primer gel (gel redox) se emplea en el análisis de *Western-blot* por lo que se pierde a fines de identificación, para lo que se emplea el segundo gel (gel de expresión) que es teñido para la visualización de los puntos proteicos (ej. tinción con plata, Sypro Ruby, Coomassie Brilliant blue, etc.), de donde se localizan, normalizan y extraen los puntos de interés, respecto al gel redox. Los puntos de interés localizados en el gel son cortados, digeridos con tripsina, y los péptidos generados se identifican mediante espectrometría de masas (MS, del inglés *mass spectrometry*). Se pueden emplear diversas variantes de MS como la *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight* (MALDI-TOF) o la *electrospray ionization* (ESI)-*tandem* MS (MS/MS) (Perluigi et al., 2014). Seguidamente la secuencia aminoacídica de los péptidos y la identidad de las proteínas es identificada mediante programas bioinformáticos (Mascot) y comparación contra bases de datos. Es posible la cuantificación, normalización y comparación de las proteínas oxidadas u otras de interés empleando análisis densitométrico mediante programas específicos (ej. PDQuest).

La principal limitación de este análisis proteómico es que está sesgado a favor de las proteínas más abundantes. Por otra parte, es susceptible de detectar diferencias entre dos condiciones que dependan de las variaciones en los niveles de expresión más que de la modificación oxidativa en si misma. Por ello, la determinación del nivel de oxidación relativo a la cantidad de una determinada proteína es más informativo que el contenido total de proteína modificada (Butterfield et al., 2012).

La aproximación basada en geles presenta limitaciones para el caso del análisis a gran escala, así como para la identificación de proteínas de membrana o proteínas poco abundantes; en un intento por sortear estas dificultades se han desarrollado métodos libres de gel (Butterfield et al., 2012). Los mismos se basan en el enriquecimiento mediante cromatografía líquida o cromatografía de afinidad de proteínas que presentan una modificación oxidativa de interés y su posterior detección mediante MS. La identificación de proteínas carboniladas ha sido la práctica más común con esta aproximación, empleando el enriquecimiento de proteínas carboniladas mediante cromatografía de afinidad de avidina, para carbonilos previamente derivatizados con biotina-hidrazida. La principal desventaja de estas aproximaciones es que no permiten un análisis cuantitativo del grado de modificación oxidativa de las distintas proteínas identificadas en diferentes muestras, lo que limita su utilidad como herramienta para el estudio de cambios en el patrón de oxidación de proteínas en distintas condiciones biológicas. Una representación esquemática de la detección de proteínas carboniladas mediante las dos estrategias generales de la proteómica redox se presenta en la figura 13.

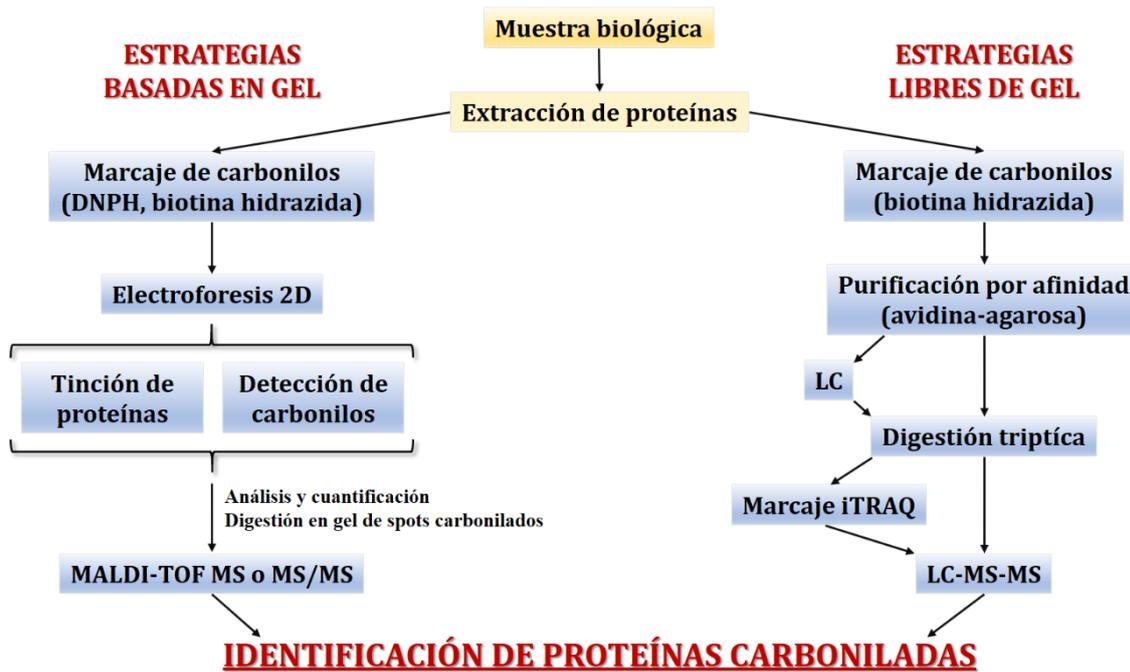


Figura 13. Representación esquemática de las estrategias analíticas utilizadas para la identificación y cuantificación de proteínas carboniladas en la proteómica redox.

3.4. Estrés y daño oxidativo en el envejecimiento

Numerosos trabajos han explorado el papel del estrés oxidativo en el envejecimiento, basados en la teoría de los radicales libres mitocondriales del envejecimiento (Harman, 1972). Esta situación de estrés oxidativo se observa si se produce un desequilibrio entre la producción ROS y la capacidad de respuesta de los sistemas antioxidantes, conllevando a daño oxidativo.

La protección celular contra el daño oxidativo incluye tanto la eliminación de ROS como la reparación del daño, siendo los antioxidantes la línea fundamental de esta defensa. Aunque los antioxidantes pueden proteger contra diversas enfermedades relacionadas con la edad, no parecen controlar la tasa de envejecimiento ya que: (1) las especies de larga vida, incluyendo invertebrados y vertebrados, tienen constitutivamente menos niveles de enzimas antioxidantes en sus tejidos y de antioxidantes endógenos de bajo peso molecular que los de corta duración (López-Torres et al., 1993a), (2) el aumento experimental de antioxidantes tisulares a través de la suplementación dietética (Harman, 1968; Harris et al., 1990), la inducción farmacológica (López-Torres et al., 1993b) o técnicas transgénicas (Jaarsma et al., 2000; Mockett et al., 1999; Orr et al., 2003) puede incrementar ligeramente la longevidad media evitando la muerte prematura, pero no cambia la longevidad máxima, y (3) *knockouts* para genes que codifican enzimas antioxidantes muestran diferentes patologías pero su longevidad máxima no parece estar afectada (Muller et al., 2003; Schriener et al., 2005). Así pues, se propone que la reducción de la producción de ROS resulta más eficiente para reducir el daño oxidativo que el incremento en los niveles de antioxidantes (Pamplona y Barja, 2007). La correlación

negativa entre especies de larga vida y bajos niveles de antioxidante se ha interpretado como una evidencia indirecta de que la producción de ROS *in vivo* en condiciones basales debe de ser menor en especies animales longevas que en las de vida corta (Naudí et al., 2007; Pamplona y Barja, 2007; Pérez-Campo et al., 1998).

Durante la respiración aerobia, la fuga de electrones de la CTE produce ROS. Se sabe que la tasa de producción de ROS es propia de cada especie e independiente de la de consumo de O₂ mitocondrial (Barja et al., 1994). Además, la tasa de producción de ROS correlaciona de forma inversa con la longevidad máxima de las especies, de forma que esta tasa es mayor en especies de vida corta que en especies longevas (Barja et al., 1994; Pérez-Campo et al., 1998), explicando que los niveles de antioxidantes endógenos correlacionen negativamente con la longevidad máxima entre especies. Esto es posible debido a que el porcentaje del flujo total de electrones dirigido a la producción de ROS es menor en animales de vida larga, es decir, la eficiencia de la CTE es mayor (Naudí et al., 2007).

Diversos estudios apoyan la noción de otra línea de defensa, además de los sistemas antioxidantes y de reparación, basada en la susceptibilidad inherente de las macromoléculas al daño oxidativo. Esta susceptibilidad (facilidad con la que sufre lesión oxidativa) está intrínsecamente relacionada con la composición química específica de las macromoléculas (Naudí et al., 2007). En este sentido, existen evidencias de una disminución en la susceptibilidad de las macromoléculas al daño oxidativo en especies longevas.

Se ha observado que el contenido en metionina (aminoácido más susceptible a la oxidación por ROS) de las proteínas de diversas especies de mamíferos correlaciona con la longevidad máxima; y que las proteínas de especies longevas son menos susceptibles a la modificación oxidativa que las de especies de vida corta (Naudí et al., 2007; Pamplona y Barja, 2007).

También, la composición del ADNmt expresa una adaptación de longevidad altamente resistente. La guanina es el nucleótido más fácilmente oxidable y menos abundante en el ADNmt (Samuels, 2005). De acuerdo con esto, los mamíferos de larga vida y las aves tienen niveles más bajos de 8-oxodG en su ADNmt (Barja, 2004; Sanz et al., 2006). Además, cuanto más larga es la longevidad máxima de una especie menor es la energía libre (medida de la susceptibilidad del ADN a la mutación) del ADNmt (Samuels, 2005).

Además, los ácidos grasos altamente insaturados (más de dos enlaces dobles) son en promedio los ácidos grasos menos abundantes en las membranas celulares (Hulbert, 2005; Hulbert et al., 2007). Un bajo grado de insaturación (bajos DBI y PI) de las membranas celulares es una característica general de las especies de larga vida (Pamplona et al., 1996, 1998). En las especies con una alta longevidad máxima, incluyendo a los humanos, este bajo grado de insaturación se logra con la redistribución de los tipos de PUFA en las membranas, sin alteración del porcentaje total del contenido de PUFA y la longitud media de la cadena. Esto representa una estrategia óptima ya que puede reducir la sensibilidad de las membranas a la PL

alterando poco las propiedades de fluidez y microviscosidad que afectan de forma crítica a la función de las proteínas de membrana (Pamplona y Barja, 2007).

Finalmente, la glucosa ha emergido como el portador más importante de energía en las células de los animales, siendo el carbohidrato menos reactivo (Bunn y Higgins, 1981), y disminuyendo la probabilidad de formación de RCS y AGE.

Por otra parte, la restricción calórica es la intervención experimental descrita en mayor detalle que ralentiza el envejecimiento y aumenta la longevidad máxima (Masoro, 2005). El efecto de la RC en la producción de ROS ha sido estudiado intensivamente en roedores. Estos estudios demuestran consistentemente que la RC a largo plazo (entre 1 año y toda la vida) disminuye significativamente la tasa de generación de ROS (Barja, 2004; Pamplona y Barja, 2007; Sanz et al., 2006). Esta disminución en la generación de ROS no se acompaña de cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial, sino que corresponde a una disminución de la fuga de electrones. La falta de cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial coincide también con la falta de variaciones en las tasas metabólicas basales en RC (Lynn y Wallwork, 1992). Además, la disminución en la generación de ROS se acompaña por disminuciones significativas en los niveles de 8-oxodG en el ADN, en la insaturación de las membranas, y el daño a las proteínas tisulares y mitocondriales resultantes de la oxidación, glicoxidación, y la lipoxidación (Hulbert et al., 2007; Pamplona y Barja, 2003; Sanz et al., 2006).

De manera general, estos hallazgos soportan el papel del estrés oxidativo en el envejecimiento basado en dos características principales relacionadas con el aumento de la longevidad máxima mediante el control de la producción de daño oxidativo: (1) la disminución/control de la producción de ROS, y (2) una composición macromolecular que es altamente resistente a modificaciones oxidativas. No obstante, más allá de esta relación y las diferencias entre especies, numerosos estudios soportan la acumulación de daño oxidativo en las macromoléculas durante el envejecimiento. Por otra parte, aunque no se ha encontrado una relación clara entre los niveles de antioxidantes y el envejecimiento, si se ha descrito que en organismos viejos se pierde la capacidad de regular la actividad de Nrf2 en respuesta al estrés oxidativo. Así, con el envejecimiento disminuye la actividad de Nrf2 y de su gen blanco *GSH* (Suh et al., 2004; Suzuki et al., 2008; Valcarcel-Ares et al., 2012), lo cual se ha correlacionado con la concentración de glutatión oxidado y la presencia de productos oxidados (Suh et al., 2004; Zaman et al., 2007). También, es posible aumentar la longevidad media mediante la modulación de la vía IIS, cambio que se acompaña de un incremento en la resistencia al estrés oxidativo (Holzenberger et al., 2003; Quarrie y Riabowol, 2004).

Diferentes grupos de investigación han descrito un aumento relacionado con la edad en los niveles de 8-oxodG tanto en el ADN nuclear como el ADNmt, en una amplia variedad de tejidos en roedores (Bokov et al., 2004; Hudson et al., 1998). También, existe un incremento progresivo relacionado con la edad en el número de enlaces iónicos entre proteínas no histonas y grupos fosfatos del ADN (Ames, 1989),

aumentando la condensación de la cromatina, y un aumento en la concentración de aductos desoxiguanosina-MDA (Hoeijmakers, 2009; Sohal y Allen, 1990).

Diferentes estudios han demostrado que existe un aumento con la edad en los niveles de PL y en sus productos (ej. F₂-isoprostanos, HNE y MDA) (Bokov et al., 2004; Roberts y Reckelhoff, 2001). Un hallazgo reiterado es el aumento con la edad de las concentraciones celulares de lipofuscina, la cual es una mezcla compleja de productos de PL, proteínas oxidadas, y en menor medida carbohidratos y metales (Gray, 2005).

La acumulación de daño oxidativo en las proteínas es también un evento recurrente en el envejecimiento. Los niveles de carbonilación proteica aumentan con la edad en diferentes tejidos y especies, incluyendo humanos (Bokov et al., 2004; Butterfield y Stadtman, 1998; Requena et al., 2003; Sohal y Allen, 1990). También, existe un aumento del entrecruzamiento de proteínas y de procesos de agregación; así como, de la producción de AGE/ALE (Monnier et al., 2005; Simm et al., 2015; Sohal y Allen, 1990; Vistoli et al., 2013). Más allá, estudios de proteómica redox han detectado que las proteínas modificadas oxidativamente en el envejecimiento participan en procesos claves para la supervivencia celular como el metabolismo energético, la transducción de señales y la respuesta al estrés (Perluigi et al., 2010).

4. Envejecimiento en el cerebro

En el sistema nervioso central (SNC), el envejecimiento afecta diferentes áreas cerebrales y sus funciones subyacentes, como lo indica la disminución de las habilidades sensoriales, motoras y cognitivas con el tiempo. Sin embargo, este proceso se presenta con una considerable variabilidad entre individuos, en los componentes del SNC más afectados, en cómo se compensan los déficits y, en los procesos neurodegenerativos relacionados con la edad.

4.1. Características morfo-fisiológicas

Durante mucho tiempo se pensó que durante el proceso de envejecimiento cerebral normal había una importante pérdida de neuronas en diferentes áreas de corteza (Brody, 1955); sin embargo, estudios con nuevas técnicas histológicas y estimación más real han concluido que la pérdida neuronal es mínima en el hipocampo y en áreas de corteza (ej. prefrontal, temporal o entorrinal) con la edad (Morrison y Hof, 1997; Wickelgren, 1996). No obstante, si existen una serie de cambios estructurales y funcionales en los tipos celulares que componen el SNC.

Ocurre con la edad la disminución del tamaño del soma neuronal, la pérdida o regresión de dendritas y espinas dendríticas, así como de su densidad, de la complejidad de la arborización dendrítica y de los sitios postsinápticos (Dickstein et al., 2007; Morrison y Hof, 1997). También, alteraciones en la neurotransmisión y en la distribución de receptores (ej. glutamato y NMDA), cambios en las propiedades electrofisiológicas que conllevan a defectos en vías de señalización cortico-corticales, y la pérdida de circuitos neurales y de plasticidad

sináptica (Dickstein et al., 2007), así como de la neurogénesis hipocampal (Cameron y McKay, 1999; Gould et al., 1999). Además, se describe con el envejecimiento una degeneración de las vainas de mielina neuronales, alteración de los oligodendrocitos, y cambios en la composición normal de la mielina (Malone y Szoke, 1982; Peters, 1996). Las células microgliales, también, están sujetas a cambios con la edad; aunque estos sólo comienzan a documentarse, se ha descrito distrofia microglial, caracterizada por procesos celulares desprovistos de ramificaciones finas, excesivo reborde y formación de protuberancias esféricas, así como fragmentación o tortuosidad (Conde y Streit, 2006). Las alteraciones celulares y la disfunción del flujo vascular determinan, en conjunto, la disminución del peso cerebral con el envejecimiento (DeCarli, 2013).

Las técnicas de imagen por resonancia magnética han mostrado que existen cambios anatómicos asociados al envejecimiento cerebral. Existe un aumento del tamaño ventricular y una disminución del volumen cerebral global con la edad, que se acentúa a partir de los 50 años, con diferencias regionales sustanciales, siendo el lóbulo frontal y el temporal los que presentan una mayor disminución (DeCarli et al., 2005a; Lockhart y DeCarli, 2014; Sullivan y Pfefferbaum, 2007). Este aumento de la atrofia cerebral con la edad se ha relacionado con factores de riesgo vasculares en los individuos cognitivamente normales (DeBette et al., 2011; Nettiksimmons et al., 2013). También, se ha descrito una disminución de las sustancias gris y blanca con la edad, con patrones particulares y variaciones entre regiones cerebrales, siendo la frontal la más afectada (Fotenos et al., 2005; Ge et al., 2002). Además, el aumento de hiperintensidades en la sustancia blanca y la degeneración de determinados tractos (ej. genu y esplenio del cuerpo calloso) se asocian con la edad (DeCarli et al., 2005b; Lockhart y DeCarli, 2014). Estas lesiones de la sustancia blanca se asocian con disminuciones en la velocidad y el rendimiento cognitivo, y en algunos casos se ha demostrado que median los cambios conductuales con la edad (Andrews-Hanna et al., 2007; Ziegler et al., 2010).

Las consecuencias funcionales/conductuales resultantes de los cambios con el envejecimiento en el SNC son diversas; entre las más evidentes se encuentran: la disminución de la memoria a corto y largo plazo, así como de la memoria espacial (Leal y Yassa, 2015; Nyberg et al., 2012); la disminución en la velocidad de procesamiento global y en las funciones ejecutivas (Nyberg et al., 2012; Yankner et al., 2008); problemas atencionales y de lenguaje (Coubard et al., 2011); y pérdida de destrezas visuoespaciales complejas y de respuestas psicomotoras rápidas (Yankner et al., 2008). También, existen cambios en el patrón de sueño con la edad, que incluyen menos tiempo de sueño total y en los ciclos de sueño de estadio III y IV, y más tiempo en sueño de movimiento ocular no rápido de las etapas I y II (Cefalu, 2011). Diferentes estudios sugieren que el envejecimiento morfo-funcional del cerebro comienza en edades relativamente tempranas (cuarta década) del ciclo vital en los humanos (Yankner et al., 2008).

4.2. Características moleculares

En el cerebro, se presentan las marcas moleculares que acompañan al envejecimiento, con procesos particulares que reflejan las características únicas de este órgano y de las neuronas postmitóticas diferenciadas que lo componen. Acompañan al envejecimiento cerebral factores como alteraciones epigenéticas (Lardenoije et al., 2015), disfunción mitocondrial con alteraciones en la morfología y el ADNmt, perturbación de la homeostasis energética (Swerdlow, 2011) y la acumulación de proteínas dañadas y de gránulos de lipofuscina en el citoplasma de neuronas y células gliales (Keller et al., 2004). También, el aumento del daño oxidativo a ácidos nucleicos, lípidos y proteínas ha sido reiteradamente asociado al envejecimiento cerebral y la neuropatología (acápite independiente).

Es de destacar que, durante el envejecimiento, las neuronas enfrentan el gran problema de la acumulación de proteínas dañadas que pueden formar agregados insolubles intra o extracelulares, proceso fuertemente ligado a los trastornos neurodegenerativos (Mattson y Magnus, 2006). Las proteínas dañadas pueden eliminarse por degradación enzimática por proteasas citosólicas, lisosomas y el sistema ubiquitina-proteasoma, existe evidencia de que el funcionamiento de estos mecanismos se deteriora en las neuronas con la edad (Bi et al., 2000; Keller et al., 2002; Nixon, 2003). Adicionalmente, la alteración de la autofagia es relevante en la disfunción y la muerte neuronal en el envejecimiento y las patologías relacionadas (Bergamini et al., 2003; Nixon et al., 2005).

En particular, con el envejecimiento, es posible detectar en sujetos clínicamente normales, aunque en menor medida, los agregados proteicos típicos de la enfermedad de Alzheimer: ovillos neurofibrilares (NFT, del inglés *neurofibrillary tangles*) intracelulares y placas seniles (PS) de péptido β -amiloide (β A) extracelulares (Ferrer, 2012). En individuos viejos sin discapacidad cognitiva mayor, el patrón de PS es heterogéneo, ausente o de baja densidad en neocorteza; sin embargo, se detectan de forma consistente NFT en la corteza entorrinal, la región CA1 del hipocampo y, menos frecuentemente, en las cortezas temporal y frontal (Braak y Braak, 1991; Gold et al., 2001). Estos cambios se han interpretado como relacionados con el envejecimiento normal (Hof et al., 1999); no obstante, sus implicaciones y los límites que definen el envejecimiento normal del patológico son tema de intenso debate (Ferrer, 2012).

Una característica que acompaña al envejecimiento, y que se agudiza en los trastornos neurodegenerativos, es la presencia de inflamación crónica de bajo grado, origen del término *neuroinflammaging* (Franceschi et al., 2006; Ward et al., 2015). La inmunidad innata en el SNC es proporcionada principalmente por la microglia residente. Se plantea que existe una sensibilización (reactividad) de la microglia producto de la edad, que puede llevar a una respuesta neuroinflamatoria exagerada ante diferentes estímulos (ej. daño sináptico y ROS), que varía entre regiones cerebrales (Norden y Godbout, 2013). Este fenotipo proinflamatorio de la microglia promueve la producción de citoquinas proinflamatorias (ej. IL-1 β , IL-6, IL-12 y

TNF α) y la expresión aumentada de receptores inflamatorios (ej. MHCII y CD86), receptores *scavenger* (ej. CD68), receptores de reconocimiento asociado a patrones (ej. TLR), integrinas (CD11b y CD11c) y óxido nítrico (Bodles y Barger, 2004; Norden y Godbout, 2013). Además, ocurre una disminución en la producción de citoquinas antiinflamatorias (ej. IL-4 y IL-10) en el cerebro envejecido (Norden y Godbout, 2013; Ward et al., 2015). La activación microglial amplificada y prolongada en el cerebro envejecido puede estar relacionada con alteraciones en sistemas reguladores, lo que hace difícil la resolución de esta activación; y se ha visto que tiene efectos negativos sobre las funciones cognitivas (Norden y Godbout, 2013). También, en el SNC la presencia de citoquinas proinflamatorias (ej. IL-1 y TNF α) es capaz de activar la vía NF- κ B (Donato et al., 2009); en el envejecimiento se ha descrito su activación en astrocitos, asociada a un cambio de su función neurotrófica a neuroinflamatoria (Volterra y Meldolesi, 2005).

Entre las varias moléculas de señalización y vías enzimáticas implicadas en la neuroinflamación, las COX (existen dos isoformas, COX-1 y COX-2) son unas de las más frecuentes (Minghetti, 2004). En particular, la expresión de COX-2 puede ser rápidamente inducida por diferentes estímulos tales como citoquinas y moléculas proinflamatorias (Minghetti, 2004). En poblaciones neuronales específicas, principalmente neuronas glutamatérgicas excitatorias, la expresión de la COX-2 es “constitutiva”, o más exactamente, “dinámicamente” regulada, ya que depende de factores como la actividad sináptica (Minghetti, 2004; Teather, 2002). La expresión de COX-2 también se induce en astrocitos y microglia por diferentes estímulos. La inducción y/o sobreexpresión de COX-2 en tipos celulares específicos parece depender de señales químicas particulares como el glutamato en neuronas, citoquinas en astrocitos y neuronas apoptóticas en microglia (Minghetti, 2004). Varias líneas de evidencia sugieren que la COX-2 tiene un papel en la neurotoxicidad, y que la sobreexpresión de COX-2 se relaciona con numerosos trastornos neurodegenerativos asociados a la edad (Minghetti, 2004; Weiner y Frenkel, 2006).

Otra característica del envejecimiento cerebral son las alteraciones en la homeostasis del calcio (Toescu et al., 2004). Se ha observado un aumento de la post-despolarización dependiente de Ca²⁺, con repercusiones en el funcionamiento neuronal; también, mayor aumento en las concentraciones de Ca²⁺ ante un estímulo, lo que se ha relacionado con defectos del retículo endoplasmático para secuestrarlo y de la mitocondria para regularlo (Gleichmann y Mattson, 2011; Toescu et al., 2004). Como resultado de estas alteraciones se pueden activar de manera excesiva y deletérea una variedad de repuestas tales como excitabilidad de membrana, plasticidad sináptica, adhesión celular, inflamación, crecimiento y muerte celular (Toescu et al., 2004; Ward et al., 2015).

También, se produce con el envejecimiento una acumulación selectiva de hierro en varias regiones cerebrales y en diferentes tipos de células, en forma de hierro unido a ferritina (Ft) y neuromelanina (NM), al parecer sin consecuencias patológicas (Ward et al., 2014). En humanos existe un aumento lineal del contenido

de Fe-Ft en la sustancia nigra con la edad, mientras que en locus cerúleo la concentración es menor y permanece estable. La concentración del complejo Fe-NM, la forma dominante de hierro en las neuronas catecolaminérgicas, aumenta tanto en la sustancia nigra como en el locus cerúleo, así como en la corteza premotora, el putamen y el cerebelo con la edad. Más allá de los 70 años, tanto el putamen como el globo pálido muestran un aumento del contenido de hierro con grandes depósitos en fibras, células gliales y neuronas libres de NM. La microglia y los astrocitos de la corteza, el cerebelo, el hipocampo, los ganglios basales y la amígdala, presentan un mayor contenido de Fe-Ft con la edad (Ward et al., 2014). Los oligodendrocitos contienen la mayor cantidad de hierro, almacenados principalmente como Fe-Ft y permanece constante durante el envejecimiento (Connor y Menzies, 1996).

Por otra parte, estudios de expresión génica en ratón (Jiang et al., 2001), rata (Blalock et al., 2003), chimpancé (Fraser et al., 2005) y humanos (Erraji-Benchekroun et al., 2005) han mostrado que durante el envejecimiento cerebral unas pocas vías de señalización son afectadas en contraposición a un cambio genómico global. Son de destacar la inducción de genes de respuesta al estrés y la reducción de la expresión de genes mitocondriales (Yankner et al., 2008). En humanos solo el 4 % del genoma cerebral es regulado por la edad, apareciendo los cambios regulatorios sobre los 40 años y siendo más pronunciados a partir de los 70 años (Lu et al., 2004).

En la corteza prefrontal, se encuentran subexpresados genes reguladores de la función sináptica incluyendo a receptores de glutamato, proteínas de vesículas sinápticas y de sistemas de transducción de señales LTP; el sistema de transducción de Ca^{2+} sináptico aparece particularmente afectado con la subexpresión de la calmodulina 1 y 3, la calcineurina Ba e isoformas de PKC; y la respuesta al estrés es la categoría más extensamente representada incluyendo la sobreexpresión de genes del sistema antioxidante, la reparación del ADN y la función inmune (Erraji-Benchekroun et al., 2005; Lu et al., 2004). Las regiones extra-corticales muestran un patrón algo diferente, por ejemplo, en el cerebelo los cambios relacionados con la edad en los genes subexpresados son menores (Fraser et al., 2005).

4.3. Envejecimiento y neuropatología

Existe una relación entre el envejecimiento y los trastornos neurodegenerativos, pues la probabilidad de desarrollar un desorden neurodegenerativo de tipo esporádico aumenta dramáticamente durante las sexta, séptima y octava décadas de vida. Por ejemplo, existe una alta probabilidad de que una persona que vive a la edad de 85 años sufra de enfermedad de Alzheimer (EA), y la enfermedad de Parkinson (EP) es más común en los mayores de 70 años (Mattson y Magnus, 2006).

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una disfunción progresiva y la pérdida (muerte) selectiva de poblaciones neuronales en áreas concretas del SNC, determinando de esta manera su clínica (alteraciones cognitivas, desórdenes motores o ambas características) (Jellinger, 2009). El individuo adulto

presenta una capacidad limitada de neurogénesis, por lo que la muerte neuronal marca una fase irreversible del proceso neurodegenerativo (Gould et al., 1999).

La neurodegeneración se considera multifactorial, implicando diferentes elementos: causas genéticas, ambientales, factores endógenos relacionados con el envejecimiento, defectos en la degradación de proteínas por el sistema ubiquitina-proteosoma/autofagia, formación de radicales libres y estrés oxidativo, alteración bioenergética por disfunción mitocondrial, trastornos del aparato de Golgi, mutaciones de chaperonas moleculares y procesos neuroinflamatorios (Butterfield y Kanski, 2001; Frank-Cannon et al., 2009; Frost y Diamond, 2009; Mattson, 2000). Estos mecanismos se relacionan entre sí originando un círculo vicioso que conlleva a la disfunción y muerte celular, aunque no se entiende completamente las vías moleculares exactas y su papel en la patogenia (Jellinger, 2009).

Las diversas clases de enfermedades neurodegenerativas comparten la característica de presentar agregados y depósitos (intra o extracelulares) de proteínas anormales y/o mal plegadas, que representan los marcadores de las diferentes patologías, denominadas en conjunto proteinopatías (Jellinger, 2009) (tabla 3).

Tabla 3. Características generales de las enfermedades neurodegenerativas más comunes.

Enfermedad	Depósito proteico	Proteína tóxica	Células afectadas	Regiones afectadas
Alzheimer	Placas extracelulares	β -amiloide		Corteza entorrinal, hipocampo, amígdala y progresión a neocorteza
	Ovillos intracelulares	Tau	Neuronas	
Parálisis supranuclear progresiva	Ovillos intracelulares	Tau	Neuronas, astrocitos, oligodendrocitos	Núcleos subtalámicos, corteza frontal
Pick	Cuerpos de Pick	Tau	Neuronas	Hipocampo, corteza frontal
Degeneración cortico basal	Ovillos intracelulares	Tau	Neuronas, glia	Corteza cerebral, tronco cerebral
Granos argirófilos	Granos argirófilos	Tau	Neuronas, glia	Corteza entorrinal, hipocampo, amígdala, corteza temporal
Demencia frontotemporal asociada al cromosoma 17 debido a mutaciones en Tau	Ovillos intracelulares	Tau	Neuronas, glia	Corteza frontal y temporal
Demencia frontotemporal Tau-, UB+	Intracelulares de ubiquitina	Ubiquitina	Neuronas	Corteza frontal y temporal
Esclerosis lateral amiotrófica	Cuerpos de Bunina	Ubiquitina Cistatina C	Neuronas	Médula espinal y corteza motora
Parkinson	Cuerpos de Lewy	α -sinucleína	Neuronas	Sustancia nigra, locus cerúleo, núcleo del Rafe, corteza frontal
Demencia con cuerpos de Lewy	Cuerpos de Lewy	α -sinucleína	Neuronas	Tronco y corteza cerebral
Atrofia multisistémica	Cuerpos de Lewy	α -sinucleína	Neuronas, oligodendrocitos	Cerebelo y estriado
Huntington	Inclusiones nucleares y citoplasmáticas	Hungtintina	Neuronas	Corteza frontal, estriado y locus cerúleo

Estas enfermedades pueden clasificarse en función de su clínica o de su neuropatología molecular. La clasificación basada en las características clínico-patológicas ha presentado dificultades para el diagnóstico, ya que en estas enfermedades se presentan con elevada heterogeneidad y se solapan, permitiendo la coexistencia de características clínicas patológicas de más de un desorden en un mismo individuo. En consecuencia, la clasificación basada en la neuropatología molecular ha permitido los mayores avances en el campo de la neuropatología. La misma se basa en la clasificación en función de la proteína anormal que se acumula (ej. taupatía), siendo este un claro marcador bioquímico e histomorfológico, unificador de estas enfermedades (Woulfe, 2008).

Las células neuronales son particularmente susceptibles a los efectos tóxicos de proteínas mutadas o mal plegadas (Taylor et al., 2002). Condiciones metabólicas extremas, como un elevado uso del oxígeno o un incremento en la producción de neurotransmisores, las hace especialmente vulnerables a las alteraciones relacionadas con la agregación (Dohm et al., 2008).

En general, la agregación se considera un proceso de múltiples etapas que comienza cuando una proteína con conformación anormal se asocia con otra o más proteínas anormales, o parte de ellas, formando dímeros e intermediarios oligoméricos (Dohm et al., 2008; Ross y Poirier, 2004). Estos pueden crecer a estructuras metaestables en lámina- β con morfología fibrilar denominada protofibrillas, que a su vez pueden madurar a protofilamentos y fibras dando como resultado agregados y cuerpos de inclusión, con tendencia a ser altamente resistentes a la proteólisis (Dohm et al., 2008; Ross y Poirier, 2004).

Existe un gran debate sobre el papel de la agregación, por un lado, se ha relacionado con la toxicidad y por otro se ha sugerido que tiene un papel neuroprotector (Ross y Poirier, 2005; Taylor et al., 2002). Actualmente se propone que las especies iniciales en el proceso de agregación pueden ser más tóxicas que los cuerpos de inclusión y agregados (Ross y Poirier, 2005). En esta línea, la neurodegeneración es causada principalmente por la presencia de intermediarios tóxicos oligoméricos, mientras que los agregados insolubles parecen ser el resultado de procesos de detoxificación celular en los que tras el fallo del sistema proteosomal, las proteínas anormales son secuestradas en inclusiones inertes tipo agregosoma (Dohm et al., 2008).

Las características descritas para el envejecimiento cerebral se encuentran presentes en las enfermedades neurodegenerativas de manera extremadamente acusada. De la interacción entre estos procesos y las características que definen a las neuronas con vulnerabilidad selectiva, presentes en las regiones afectadas, surgen los procesos neurodegenerativos particulares (Yankner et al., 2008) (figura 14).

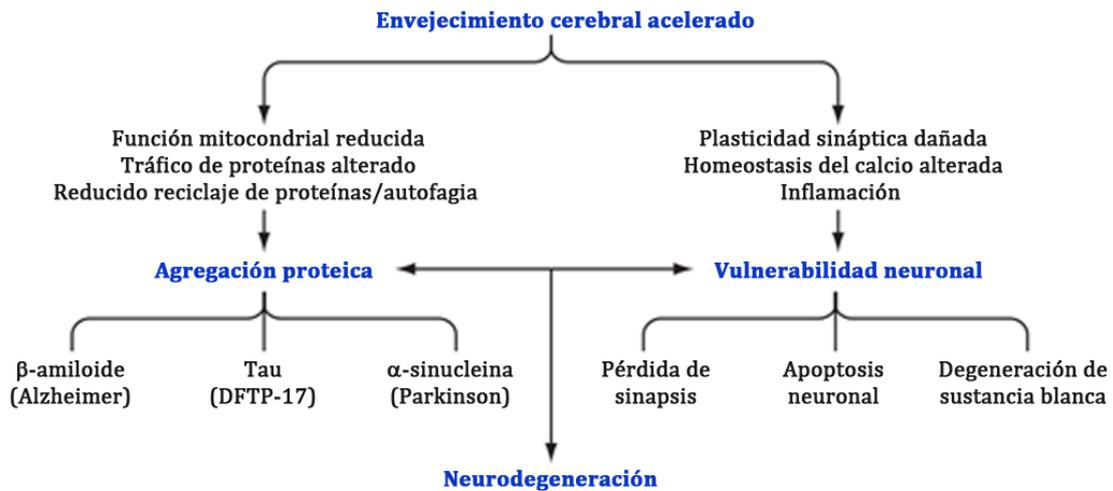


Figura 14. Neurodegeneración y envejecimiento cerebral acelerado (adaptado de Yankner et al., 2008). Los factores genéticos y/o ambientales que aceleren los mecanismos subyacentes al envejecimiento cerebral pueden afectar a los sistemas biológicos que regulan la agregación de proteínas y la supervivencia neuronal. La agregación proteica patológica y la vulnerabilidad neuronal dependiente de la edad pueden actuar conjuntamente para inducir la neurodegeneración.

La EA esporádica representa el trastorno neurodegenerativo asociado a la edad por antonomasia. Su incidencia anual es de 4.6 millones de casos, afectando a cerca de 35.6 millones de personas en el mundo y siendo la patología neurodegenerativa asociada a la edad más común (Ferrer, 2012; Prince et al., 2013). Se caracteriza por la pérdida de células, neuritas y sinapsis, con un aislamiento gradual de las células restantes y problemas en la neurotransmisión (Aso y Ferrer, 2013; Huang y Mucke, 2012); y se manifiesta clínicamente como una pérdida progresiva de las funciones mentales superiores, destacando la memoria, que conlleva a demencia (Kumar y Singh, 2015).

Neuropatológicamente se define por la presencia de PS extracelulares de péptido β A resultante de la escisión de la proteína precursora β -amiloide, y de NFT intracelulares de proteína tau hiperfosforilada y truncada (Ferrer, 2012; Kumar y Singh, 2015). Una parte sustancial de β A no es fibrilar, sino soluble, y forma oligómeros con diferentes complejidades estructurales que resultan tóxicos a las células del SNC (Ciechanover y Kwon, 2015; Droste et al., 2015). La acumulación anormal de agregados proteicos conduce a la neurodegeneración (Aso y Ferrer, 2013). Procesos asociados con el envejecimiento, principalmente metabólicos, aunque no únicamente, tienen una gran influencia (Ferrer, 2012). Los mismos incluyen defectos mitocondriales y producción deficiente de energía, producción de ROS/RNS y el consecuente daño oxidativo, daño por estrés de retículo y alteración en la composición de las membranas, la respuesta inflamatoria y de las vías de degradación como la autofagia y el sistema ubiquitina-proteasoma (Fernández-Moriano et al., 2015; Simoncini et al., 2015).

La clasificación basada en la neuropatología molecular de esta enfermedad incluye el sistema de Braak y Braak (Braak y Braak, 1991). El mismo se basa en la progresión de la degeneración relacionada con los NFT, con estadios progresivos del I al VI (figura 15). La presencia de NFT comienza en la mediana edad en núcleos concretos del tronco encefálico y la corteza entorrinal y progresa a otras partes del cerebro, relacionándose con la pérdida neuronal y los síntomas clínicos (Braak y Braak, 1991). La progresión de los estadios del I al IV puede durar décadas y normalmente es silente, es decir, sin síntomas clínicos, que aparecen en los estadios V y VI, de progresión mucho más rápida, cuando el proceso neurodegenerativo está ya muy avanzado. La deposición β A progresa de forma diferente temporal y espacialmente; su aparición en forma de placas es más tardía y ocurre primero y más severamente en regiones tales como los lóbulos frontales y el precuneus, progresando gradualmente hacia áreas de la base del cerebro.

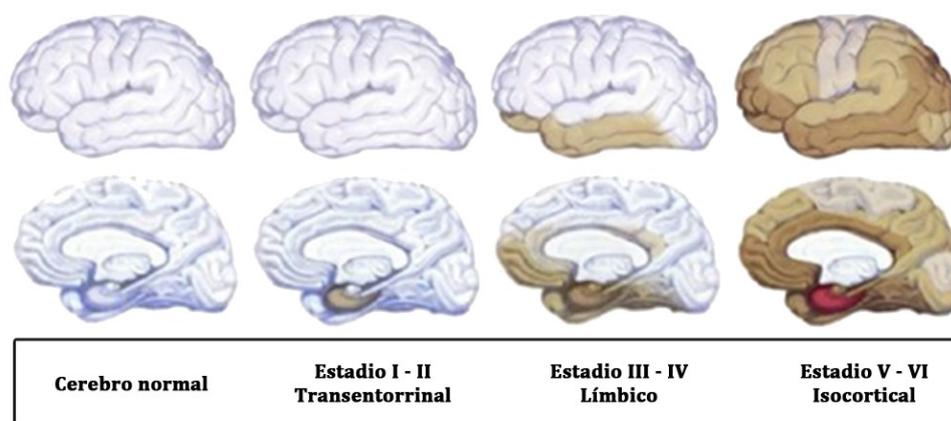


Figura 15. Estadios de Braak y Braak según la progresión de los ovillos neurofibrilares en las áreas cerebrales afectadas por la enfermedad de Alzheimer.

A destacar, alrededor del 80 % de las personas mayores de 65 años tiene lesiones de, al menos, entre los estadios I y III de Braak y Braak, pero, únicamente el 5 % sufre deterioro cognitivo leve y demencia. En el caso de la población mayor de 85 años, un 25 % padece de deterioro cognitivo y demencia tipo Alzheimer (Aso y Ferrer, 2013).

4.4 Vulnerabilidad al estrés y daño oxidativo en el cerebro

El cerebro tiene una serie de características que lo diferencian del resto de órganos y que contribuyen a que los daños por estrés oxidativo puedan ser de mayor significación en el mismo.

La gran complejidad estructural y funcional del cerebro humano se sustenta en la gran especialización de los grupos neuronales que lo componen y su elevada demanda energética. La mayoría de las neuronas son células postmitóticas que no se dividen por lo que la acumulación de daños oxidativos irreversibles puede ser un proceso particularmente agudo (Perluigi et al., 2014). El cerebro representa solo el 2 % del peso corporal, no obstante, es uno de los órganos con mayor tasa metabólica

del organismo, consumiendo el 20 % del oxígeno total corporal en reposo (Magistretti, 2000; Rink et al., 2011). Por otra parte, presenta características como una concentración relativamente baja, respecto a otros órganos, de defensas antioxidantes, elevados niveles de metales de transición que participan en procesos redox y una alta concentración de PUFA en las membranas celulares (Perluigi et al., 2014; Turrens, 2003).

En particular el proceso de PL puede encontrarse especialmente acentuado en el cerebro humano. Después del tejido adiposo, el cerebro es el segundo órgano que contiene más ácidos grasos (Bourre, 2006). Los lípidos constituyen el 10-12 % del peso húmedo y aproximadamente el 50 % del peso seco del cerebro adulto, con alrededor de un 35 % de PUFA de cadena larga (Bourre, 2006; Naudí et al., 2015). Los PUFA son componentes sustanciales de las membranas celulares en el cerebro y extremadamente susceptibles a la PL debido a sus elevados DBI, resultando en membranas con elevado PI (O'Brien y Sampson, 1965; Pamplona y Barja, 2006). En este sentido, se han descrito diferencias entre regiones cerebrales basadas en sus diferentes PI, que establecen una vulnerabilidad neuronal selectiva interregional (Naudí et al., 2015).

En el cerebro, el DHA (C22:6, ω -3) y el AA (C20:4, ω -6) son PUFA altamente representados con distribuciones celulares y regionales particulares (Naudí et al., 2015). El DHA se encuentra muy concentrado en las membranas neuronales, representando alrededor de un tercio de los aminofosfolípidos de la materia gris; por su parte el AA presenta una distribución más homogénea entre tipos celulares (O'Brien y Sampson, 1965). La PL no enzimática de estos PUFA produce subproductos tóxicos tales como NKT en el caso del DHA (Bernoud-Hubac et al., 2001) o MDA y HNE en el caso del AA (Romero et al., 1998). Más allá, la oxigenación enzimática de PUFA a través de ciclooxigenasas, lipoxigenasas y monoxigenasas del CYP450 da lugar una serie de metabolitos (pueden generar colateralmente ALE) que incluyen eicosanoides, docosanoides y octadecanoides, implicados en diferentes vías bioquímicas y de señalización, siendo la inflamación de particular importancia, ligando el metabolismo lipídico y la inflamación.

4.5. Estrés y daño oxidativo en el envejecimiento y la patología en el cerebro

El daño por estrés oxidativo contribuye deletéreamente al proceso de envejecimiento cerebral, y ha sido reiteradamente ligado a las enfermedades neurodegenerativas. Factores que incrementan el riesgo de estrés y daño oxidativo se agudizan en el cerebro con la edad, como por ejemplo la concentración de metales de transición y la producción de NO durante procesos inflamatorios.

Se han descrito incrementos progresivos con la edad en el daño oxidativo de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas en el cerebro (Perluigi et al., 2014). Alteraciones moleculares cualitativamente similares a las que ocurren en el SNC durante el envejecimiento normal, se amplifican en las poblaciones neuronales vulnerables a

procesos relacionados con la enfermedad (ej. EA y EP), resultando en disfunción y muerte neuronal (Mattson y Magnus, 2006). En este sentido, muchos de los estudios relacionados con el estrés y daño oxidativo en el cerebro se han realizado enfocados a algún trastorno neurodegenerativo, especialmente EA, y en regiones seleccionadas en base a ello como la corteza frontal y la entorrinal.

El envejecimiento se ha asociado con un aumento del daño oxidativo al ADN en las neuronas, el cual puede resultar de mecanismos disfuncionales de reparación. Se ha observado un aumento progresivo de los niveles de 8-oxodG tanto en el ADN nuclear como el mitocondrial, sin embargo, el aumento se estimó como diez veces mayor en el ADNmt (Mecocci et al., 1997). Los niveles de este marcador también se encuentran elevados en cerebros de pacientes con EA (Chang et al., 2014a; Zhao y Zhao, 2013). Más allá, se ha descrito que el daño oxidativo al ADN se acumula en los promotores de un subconjunto de genes regulados por la edad, lo que sugiere un papel dinámico del daño al ADN en la regulación transcripcional en el cerebro envejecido (Lu et al., 2004). Además, existe un aumento con la edad en el daño oxidativo al ARN en neuronas, más prominente en neuronas vulnerables a trastornos neurodegenerativos asociados a la edad (Nunomura et al., 2012).

El papel de la PL en el envejecimiento cerebral está firmemente establecido (ej. acumulación de lipofuscina); así como, en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas (ej. EA), donde se observan altos niveles de productos peroxidados en regiones susceptibles a la enfermedad (Butterfield et al., 2010; Ferrante et al., 1997; Moreira et al., 2008). A modo de ejemplo, los niveles de MDA aumentan con la edad (Head et al., 2002); se ha descrito como incrementado en la corteza temporal durante el envejecimiento normal humano (Dei et al., 2002) y en la EA con respecto a sujetos sanos (Palmer y Burns, 1994), no obstante, otros estudios no han encontrado diferencias (Hayn et al., 1996). Se ha observado que el MDA se deposita de manera similar en el citoplasma de astrocitos y neuronas del hipocampo (región CA4); sin embargo, en la región CA1 no se observaron depósitos del mismo, sugiriendo que existen regiones cerebrales con diferente susceptibilidad al mismo y que ambos tipos celulares regulan su expresión de manera similar (Dei et al., 2002). Por otra parte, los productos peroxidados afectan la homeostasis celular mediante diferentes mecanismos (Esterbauer et al., 1991); por ejemplo, el HNE puede unirse al péptido β A, incrementando su agregación y toxicidad (Siegel et al., 2007).

En el cerebro, diferentes modificaciones oxidativas de proteínas se han relacionado con la edad, incluyendo la carbonilación, la nitración y la lipoxidación (Floyd y Hensley, 2002). Tales modificaciones aumentan dramáticamente en las neuronas vulnerables a enfermedades neurodegenerativas, en parte a consecuencia de problemas en la eliminación de proteínas dañadas (Martínez et al., 2010; Mattson y Magnus, 2006).

Estudios de proteómica redox en modelos de envejecimiento murino como el SAMP8 (SAM del inglés *senescence accelerated mice*) han detectado un incremento significativo de la carbonilación de proteínas en el cerebro con la edad, mayormente

implicadas en el metabolismo energético (ej. LDH2, ENO1 y CKB) (Poon et al., 2004). A destacar, el SAMP8 manifiesta envejecimiento prematuro, con pérdida de memoria a edades avanzadas, elevado estrés oxidativo y deposición de péptido β A (Flood y Morley, 1993; Takeda et al., 1981); tratamientos con anticuerpos contra el péptido β A y antioxidantes mejoran su capacidad de aprendizaje y memoria (Farr et al., 2003). Estudios similares en cerebro de roedores envejecidos han observado una elevada oxidación de proteínas con funciones en la defensa antioxidante, el citoesqueleto y el metabolismo energético (Perluigi et al., 2010; Poon et al., 2006). También, la comparación de ratas sometidas a RC con controles ha encontrado menores niveles de modificación proteica por HNE y carbonilación en las primeras (Poon et al., 2006).

Estudios proteómicos realizados en cerebro *post mortem* de sujetos con EA han descrito una disfunción oxidativa, que se relaciona con los diferentes estadios de la enfermedad, para proteínas del metabolismo energético, respuesta antioxidante, degradación proteica, excitotoxicidad y estructura neuronal; por lo que la pérdida de funcionalidad de las mismas por daño oxidativo es relevante en la progresión de la enfermedad (Perluigi et al., 2014). También, se ha observado un incremento de proteínas modificadas por HNE y MDA en sujetos con deterioro cognitivo leve y EA respecto a sanos; por lo que la PL y la producción de AGE/ALE es un evento temprano en la patofisiología de la EA (Butterfield et al., 2006; Keller et al., 2005; Tramutola et al., 2016).

Además, se han encontrado defectos en los sistemas de defensa antioxidantes. El sistema antioxidante más abundante en el cerebro es el del glutatión; una elevada razón GSH:GSSG es indicativa de que este sistema funciona adecuadamente (Giordano et al., 2011). Se ha observado una pequeña razón GSH:GSSG en el cerebro de ratones envejecidos (Perluigi et al., 2010). De interés, experimentos *in vitro* e *in vivo* sugieren que el incremento de la producción de GSH o de la actividad de la GR son terapias potenciales contra las enfermedades neurodegenerativas (Joshi et al., 2007). En la EA, también se ha descrito la disminución de la razón GSH:GSSG (Romero et al., 1998), así como de los niveles de TRX1 (Akterin et al., 2006); y se han observado alteraciones en la actividad o expresión de enzimas antioxidantes como la SOD y la catalasa, tanto en el SNC como en los tejidos periféricos (Chang et al., 2014a).

II. OBJETIVOS

En sentido general el presente trabajo se plantea obtener una comprensión más completa del proceso de envejecimiento cerebral considerando los perfiles regionales específicos en eventos de daño oxidativo a proteínas por lipoxidación y glicoxidación, respuesta antioxidante, metabolismo energético y vías de respuesta celular con señalización redox. Para ello se exploraron las variaciones con la edad de diferentes moléculas involucradas en estos procesos en 12 regiones cerebrales de interés: corteza frontal, corteza parietal, giro cingulado, corteza temporal, corteza entorrinal, hipocampo, tálamo, caudado, putamen, corteza visual, sustancia nigra y vermis.

Objetivos específicos:

1. Identificar y caracterizar proteínas particulares diferencialmente modificadas por NKT respecto a la edad considerando los perfiles regionales específicos.
2. Explorar las variaciones en los niveles globales de lipoxidación proteica mediada por NKT y MDA respecto a la edad considerando los perfiles regionales específicos.
3. Explorar las variaciones en los niveles proteicos de enzimas involucradas en el metabolismo lipídico y la respuesta inflamatoria (COX-2 y CYP2J2) respecto a la edad considerando los perfiles regionales específicos, y su posible relación con productos de peroxidación lipídica (NKT y MDA).
4. Explorar las variaciones en los niveles globales de glicoxidación proteica por CEL y CML respecto a la edad considerando los perfiles regionales específicos.
5. Explorar las variaciones en los niveles proteicos de mediadores de la respuesta antioxidante (SOD1, SOD2, CAT, GPX4, TRX1 y Nrf2) con la edad considerando los perfiles regionales específicos.
6. Explorar las variaciones en los niveles de componentes de la CTE mitocondrial (CI-NDUFS3, CII-SDHA, CIII-UQCRC2, CIV-COX4 y CV-ATP5A1) y de mitocondrias (VDAC) con la edad considerando los perfiles regionales específicos.
7. Explorar las variaciones en los niveles proteicos de componentes de la vía de respuesta celular NF- κ B (p65, p50 y I κ B α) con la edad considerando los perfiles regionales específicos.
8. Explorar la información global aportada por el conjunto de datos obtenido considerando las variaciones regionales en procesos moleculares y funcionales con el envejecimiento en el cerebro.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras

Se empleó, para su estudio, tejido cerebral humano obtenido del Banco de Cerebros del Instituto de Neuropatología (HUB-ICO-IDIBELL Biobanco). La obtención de muestras se desarrolló en acuerdo con las normas establecidas por la legislación española y con la aprobación del comité de ética local.

En cada caso, durante la autopsia, el cerebro fue extraído rápidamente del cráneo y dividido en sus dos hemisferios. El hemisferio izquierdo se fijó por inmersión en formalina tamponada al 4 % durante tres semanas para posteriores estudios neuropatológicos. Se cortó inmediatamente el derecho en secciones coronales de 0.5 cm de espesor y se diseccionaron áreas seleccionadas del encéfalo que se congelaron en placas metálicas sobre hielo seco, se colocaron en bolsas de plástico individuales herméticas, se numeraron y se almacenaron a - 80 °C hasta su uso. Se siguieron los procedimientos para preservar el material *post mortem* en condiciones óptimas para estudios morfológicos y bioquímicos (Ferrer et al., 2008).

Para la caracterización de estas muestras se realizó un examen neuropatológico en secciones de parafina de 4 μ m de espesor, procedentes de regiones seleccionadas que se tiñeron con hematoxilina y eosina, Klüver-Barrera y se procesaron para inmunohistoquímica de proteína TAU fosforilada, β -amiloide, α -sinucleína, TDP-43, ubiquitina, GFAP, IBA-1 y CD68. El estudio neuropatológico demostró la existencia de enfermedad isquémica de pequeños vasos, *status cribosus*, y formas neurofibrilares correspondientes al estadio I de la clasificación de Braak y Braak (Braak y Braak, 1991) en los sujetos de mayor edad. En ningún caso existió deposición de placas β -amiloides. Tras el examen neuropatológico, se incluyeron en el estudio solo casos sin enfermedades neurodegenerativas y vasculares, excepto aquellos con estadios I-II de Braak y Braak de patología neurofibrilar. Se excluyeron casos con procesos neurodegenerativos asociados (α -sinucleinopatía, patología de grano argirófila, proteinopatía TDP-43). Sólo casos con cambios menores consistentes con la enfermedad de los vasos sanguíneos pequeños fueron aceptables en el presente estudio.

Además, las muestras provinieron de individuos sin síntomas neurológicos y sin enfermedades focales y sistémicas infecciosas, inflamatorias o autoinmunes. No se incluyeron casos con síndrome metabólico, enfermedades malignas diseminadas y abuso de drogas, especialmente el consumo excesivo de etanol. También se tuvo especial cuidado en no incluir casos con estado agonal prolongado (pacientes sometidos a cuidados intensivos o con hipoxia).

De esta manera se incluyeron en el estudio 18 sujetos sanos. La edad de los mismos osciló en el rango de 40 a 79 años (media 58.9 ± 13.5 años) y 5 de ellos fueron mujeres (27.8 %). El tiempo medio *post mortem* fue de $6:15 \pm 2:48$ h (mínimo 2 h, máximo 14:40 h), dentro del cual los marcadores de daño oxidativo y nitrosativo se mantienen estables (Ferrer et al., 2007). A fin de realizar comparaciones estadísticas la muestra se dividió en dos grupos: mediana edad (ME) y avanzada edad

(AE). La edad media en el grupo de sujetos de ME (n = 9, 6 hombres y 3 mujeres) fue de 47.1 ± 5.7 años y no presentaron lesiones clínicas o neuropatológicas, incluidas las primeras etapas de patología neurofibrilar. El grupo de individuos de AE (n = 9, 7 hombres y 2 mujeres) presentó una edad media de 70.6 ± 6.3 años, con ausencia de síntomas clínicos y presencia de estadios I-II de patología neurofibrilar. Un resumen de las características de la muestra empleada se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Características de los casos en estudio.

Caso	Edad	Género	Grupo	Intervalo <i>post mortem</i>	Neuropatología	Causa de la muerte
1	40	Femenino	ME	8:45 h	---	CA
2	40	Masculino	ME	5:10 h	---	NEU
3	44	Masculino	ME	6:40 h	---	TP-EMB
4	45	Masculino	ME	4:05 h	CRIB	IC
5	46	Femenino	ME	7:15 h	CRIB	MIOC
6	48	Femenino	ME	4:05 h	---	CA
7	52	Masculino	ME	9:30 h	---	NEU
8	52	Masculino	ME	4:40 h	---	IC
9	57	Masculino	ME	5:20 h	---	NEU
10	61	Masculino	AE	4:30 h	I-II	CA
11	65	Masculino	AE	3:15 h	I-II	CA
12	66	Masculino	AE	6:25 h	I-II	TP-EMB
13	67	Masculino	AE	14:40 h	I-II	CA
14	70	Masculino	AE	2 h	I-II	CA
15	75	Femenino	AE	6:10 h	I-II, CRIB	IC
16	76	Masculino	AE	6:30 h	I-II	NEU
17	77	Masculino	AE	7 h	I-II, CRIB	IC
18	79	Femenino	AE	6:25 h	I-II + CRIB	IIN

ME: mediana edad; AE: avanzada edad; CRIB: *status cribosus*; I-II: estadios I-II de patología neurofibrilar de Braak y Braak; CA: carcinoma; NEU: neumonía; TP-EMB: trombosis pulmonar-embolismo; IC: infarto cardíaco; MIOC: miocardiopatía; IIN: infarto intestinal.

Se exploraron doce regiones cerebrales mediante estudios bioquímicos en estos sujetos: corteza frontal (área 8 de Brodmann), corteza parietal (área 7 de Brodmann), corteza temporal inferior (área 20 de Brodmann), corteza occipital (áreas 17/18 de Brodmann), giro cingulado (áreas 23/24 de Brodmann), corteza entorrinal, hipocampo, cabeza del núcleo caudado, putamen anterior, tálamo, sustancia nigra y vermis superior. No fue posible disponer del tejido cerebral de casos puntuales en tres de las regiones en estudio: corteza temporal (caso 11 ausente, n = 17), corteza entorrinal (casos 6, 8 y 13 ausentes, n = 15) y sustancia nigra (casos 3, 10, 13 y 14 ausentes, n = 14).

2. Extracción de proteínas

A partir de cada muestra congelada se cortó 0.1 g de tejido que se homogenizó mecánicamente en 1 ml de tampón de lisis (urea 7 M, tiourea 2 M, Tris-HCl pH 7.5, 40 mM y CHAPS 4 %) que contenía un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche Molecular Systems), empleando un Polytron® PT 1600E (Kinematica). El homogenado se centrifugó a 16 000 g durante 5 min a 4 °C y se descartó el pellet. Se separaron 200 µl de sobrenadante y el resto se almacenó a - 80 °C para posteriores estudios. Estos 200 µl se sometieron a un proceso de precipitación proteica a temperatura ambiente empleando el método del metanol/cloroformo (Wessel y Flügge, 1984) a fin de eliminar restos celulares y de ácidos nucleicos. Brevemente, se mezcló la muestra (1 volumen) con 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua, y se centrifugó a 14 000 g durante 1 min a temperatura ambiente descartando la fase acuosa superior. A continuación, se mezcló con el mismo volumen de metanol y se centrifugó a 14 000 g durante 3 min descartando, nuevamente, la fase acuosa. El pellet resultante se dejó secar y se resuspendió en 300 µl de tampón de lisis suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche Molecular Systems), y se dejó disolver a 4 °C en rotación.

La concentración de proteínas en cada extracto se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (Merck Millipore) utilizando una curva de concentraciones seriadas de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich) como estándar. Las muestras se almacenaron a - 20 °C para su posterior uso.

3. Detección de proteínas específicas modificadas por NKT mediante proteómica redox basada en geles

3.1. Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional involucra dos etapas experimentales (dimensiones): el isoelectroenfoque (IEF) a fin de separar las proteínas de acuerdo a su punto isoelectrónico y, la separación de la muestra resultante del IEF en función de la movilidad relativa dependiente del peso molecular en geles con SDS (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Este proceso se realiza por duplicado y en paralelo para cada muestra a fin de obtener un gel que será empleado en análisis por *Western-blot*, y un gel que será teñido con nitrato de plata del que puedan escindirse puntos proteicos de interés susceptibles de ser identificados mediante espectrometría de masas.

Para la primera dimensión, se preparó de cada muestra 200 µg de proteína total en tampón de lisis a los que se añadió tributilfosfina 5 mM (Sigma-Aldrich) y, pasados 30 min, anfolitos ByoLite 3/10 (Bio-Rad) al 0.8 % y azul de bromofenol al 0.0004 %, en un volumen final de 130 µl. Se aplicaron las muestras en los carriles de la cámara de IEF y sobre ellas se colocaron las tiras de IEF que se cubrieron con 1 ml

de aceite mineral (Bio-Rad). Se emplearon tiras de 7 cm con un gradiente de pH 3-10 no linear (ReadyStrip™ IPG 3/10 NL, Bio-Rad) y una cámara de IEF Protean® IEF Cell System (Bio-Rad). Las tiras se sometieron a un proceso de rehidratación activa a 50 V durante 12 h y posteriormente se realizó el IEF. Se emplearon pasos secuenciales de 200 V durante 1 h, 500 V linealmente durante 1 h, del mismo modo a 1000 V durante 1 h, 8000 V durante 1 h y, seguidamente, a 8000 V no linealmente durante 10 h. El proceso de IEF se llevó a cabo a 20 °C, con una corriente límite de 50 µA/tira y hasta alcanzar los 28 kV/h. Una vez terminado el proceso de IEF las tiras se guardaron en cámaras de rehidratación/equilibrio para tiras de 7 cm (Bio-Rad) a -20 °C hasta ser usadas en la segunda dimensión.

Para la segunda dimensión, las tiras se descongelaron y se rehidrataron/equilibraron durante 15 min en un tampón que contenía urea 6 M, SDS 2 %, Tris-HCl pH 8.8 20 mM, glicerol 20 % y tributilfosfina 5 mM. Seguidamente, las tiras se alquilaron durante otros 15 min empleando un tampón con la composición previamente descrita, a excepción de la tributilfosfina que se reemplazó por yodoacetamida (Bio-Rad) al 2.5 %.

Paralelamente a este procedimiento, se prepararon geles separadores de poli(acrilamida) de 1.5 mm de grosor en las placas de vidrio para minigel correspondientes al sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Se empleó una mezcla de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad) al 10 %, Tris-HCl pH 8.8 0.38 M, SDS 0.1 %, con persulfato de amonio al 0.1 % y TEMED 0.01 %. Tras verterla en el molde correspondiente, se eliminó el gas añadiendo 1 ml de isopropanol en la superficie, se dejó polimerizar a temperatura ambiente, se eliminó el isopropanol lavando con agua destilada y, posteriormente, se retiraron los restos de agua.

A continuación, las tiras se colocaron en la parte superior de los geles de poli(acrilamida) junto a un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™, Bio-Rad) y se cubrieron con una mezcla *stacking* (agarosa 0.5 % y azul de bromofenol 0.0002 % en tampón de electrodos tris-glicina (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1 %, pH 8.3). Se procedió a la separación electroforética a 110 V a 4 °C en tampón de electrodos tris-glicina empleando la cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Se corrieron paralelamente dos geles por cada muestra. Uno de ellos se tiñó con nitrato de plata (PlusOne™ Silver Staining Kit, GE Healthcare) compatible con espectrometría de masas siguiendo las instrucciones del fabricante, mientras que el otro se empleó en análisis de *Western-blot*.

3.2. Western-blot anti-NKT

Los geles bidimensionales obtenidos se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 µm (Bio-Rad). Se empleó el sistema de transferencia semi-seca Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) y un tampón que contenía Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.038 % y metanol al 20 %. La calidad de este procedimiento se comprobó mediante tinción reversible con solución Ponceau S

(PanReac AppliChem). Tras desteñir con tampón TBS-T (Tris-HCl 100 mM, NaCl 140 mM y Tween 20 0.1 %, pH 7.4), las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5 % en TBS-T por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Las membranas bloqueadas se incubaron durante toda la noche en agitación a 4 °C con el anticuerpo primario anti-NKT Ab5611 (Chemicon International) diluido 1:2000 en albúmina de suero bovino al 3 % y azida de sodio al 0.02 % en TBS-T. A continuación, se lavó con TBS-T durante 30 min, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario (P0449, Dako) conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1:1000 en leche desnatada al 5 % en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente y, se lavó nuevamente por 30 min con TBS-T. Se identificaron los puntos proteicos aducidos por NKT mediante quimioluminiscencia (Amersham ECL Western blotting detection reagents, GE Healthcare) detectada sobre película radiográfica (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare).

3.3. Identificación de proteínas aducidas por NKT mediante MS

Los puntos proteicos NKT positivos en *Western-blot* de los geles bidimensionales se compararon cualitativamente entre grupos de edad, y seleccionados teniendo en cuenta la presencia o el incremento de intensidad en los sujetos de AE con respecto a los de ME. Estos puntos detectados por *Western-blot* se machearon con sus equivalentes en los geles gemelos teñidos con nitrato de plata. De estos últimos, se escindieron manualmente los puntos de interés NKT positivos.

Los puntos NKT positivos de los geles SDS se limpiaron con bicarbonato de amonio 25 mM y acetonitrilo, e inmediatamente después las muestras fueron reducidas (DTT 10 mM, 30 min a 56 °C) y alquiladas (yodoacetamida 55 mM, 30 min a 21 °C en oscuridad). A continuación, se digirieron enzimáticamente con 80 ng de tripsina con grado de calidad de secuenciación (Promega) durante toda la noche a 37 °C (Investigator™ Progest Kit, GenomicSolutions). La mezcla peptídica resultante fue extraída del gel con ácido fórmico al 10 % y acetonitrilo, y deshidratada.

La mezcla peptídica deshidratada se analizó en un cromatógrafo líquido nanoAcquity (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (ThermoScientific). Los péptidos tripsinizados fueron disueltos en ácido fórmico al 1 % y cada alícuota inyectada en una columna de captura Symmetry C18 nanoAcquity (5 µm 180 µm x 20 mm; Waters) y se separaron empleando una columna capilar de fase inversa C18 nanoAcquity (75 µm Øi, 10 cm, 1.7 µm BEH; Waters). El gradiente usado para la elusión peptídica fue 0 a 40 % B por 20 min, seguido de 40 a 60 % A por 5 min, con un flujo de 250 nL/min. Las fases móviles A y B estaban compuestas de acetonitrilo al 0 y 100 %, respectivamente, y ácido fórmico al 0.1 %.

Los péptidos eluidos se sometieron a ionización por electrospray usando una aguja emisora PicoTip™ (New Objective) a 2000 V. Las masas peptídicas (m/z 350-1700) se analizaron en modo dependiente de datos de un escaneo MS completo en el

Orbitrap con una resolución de 60 000 FWHM a 400 m/z. Hasta un máximo de los 10 péptidos más abundantes (intensidad mínima de 500 conteos) se seleccionaron de cada escaneo MS, y se fragmentaron por disociación en una trampa iónica linear usando He como gas de colisión, con una energía normalizada del 38 %. Los datos crudos generados se colectaron mediante el programa Thermo Xcalibur v.2.2 (ThermoScientific).

Los datos primarios se identificaron mediante la herramienta de búsqueda Mascot, empleando el programa Thermo Proteome Discover v.1.3.0.339 (Thermo Scientific) en la base de datos Swiss-Prot, usando el FDR (del inglés *false discovery rate*) como criterio de significación estadística para estimar el número de emparejamientos incorrectos. Los parámetros de búsqueda fueron: enzima tripsina, dos cortes proteolíticos ausentes, como modificación proteica fija el grupo metil-carbamida en el aminoácido cisteína, como modificación proteica variable la oxidación del aminoácido metionina, tolerancia peptídica de 10 ppm y 0.6 Da para los espectros de MS y MS/MS, respectivamente.

Para incrementar la sensibilidad de la búsqueda en la base de datos, fue usada la máquina de aprendizaje semi-supervisada Percolator, la cual discrimina los espectros de péptidos incorrectos de los correctos. Se empleó un q-valor < 0.01 de FDR. La lista de proteínas resultantes fue filtrada para obtener las correspondientes a *Homo sapiens* y con al menos dos péptidos de confianza.

3.4. Stripping

A fin de poder detectar diferentes proteínas sobre una misma membrana bidimensional (reusar), se empleó el procedimiento de *stripping*. Consistió en dos incubaciones secuenciales de 20 min a 65 °C con un tampón que contenía Tris-HCl pH 6.8 62.5 mM, SDS 2 % y β -mercaptoetanol 100 mM, tres lavados de 10 min con TBS-T y bloqueo con leche desnatada al 5 % en TBS-T por 1 h a temperatura ambiente. Se validaron los resultados de la identificación por MS para proteínas seleccionadas testándolas con anticuerpos específicos mediante *Western-blot*, con el procedimiento previamente descrito, tras el *stripping* de las membranas.

3.5. Caracterización proteica bioinformática

Las proteínas detectadas como modificadas por NKT se identificaron mediante sus números de acceso en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>), de donde se obtuvo la descripción de sus localizaciones y funciones. Se empleó el programa PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) para el análisis de sus rasgos estructurales. También, una red de interacciones proteína-proteína se construyó, empleando el programa STRING (<http://www.string-db.org/>) (Franceschini et al., 2013). Se realizó un análisis de ontología génica y vías funcionales de interés usando el programa Cytoscape con los *plugins* ClueGO y

CluePedia, con la información de las bases de datos KEEG, REACTOME y STRING (Bindea et al., 2009; Bindea et al., 2013).

4. Slot-blot

El nivel de oligómeros solubles fue detectado mediante *slot-blot* con el anticuerpo anti-oligómeros A11 (AHB005, Invitrogen) siguiendo el protocolo de los fabricantes para *dot-blot*. Este anticuerpo detecta la conformación estructural tridimensional de los oligómeros, por lo que requiere condiciones no desnaturizantes. Previamente, el mismo fue evaluado contra el péptido monomérico A β ₄₀₋₄₂ sin observarse señal, indicando su especificidad (datos no mostrados). Para obtener proteínas solubles a concentraciones no desnaturizantes en el tampón de lisis, las muestras fueron diluidas 1:10 (v/v) en tampón fosfato salino (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM pH 7.4) permitiendo que las proteínas renaturalizaran minimizando su agregación (De Bernardez Clark, 1998). Después, las muestras se centrifugaron a 16 000 g durante 5 min a temperatura ambiente, el precipitado fue eliminado y se determinó la concentración proteica del sobrenadante mediante el método de Bradford (Merck Millipore) utilizando una curva de concentraciones seriadas de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich) como estándar.

Cantidades iguales de proteínas totales fueron sometidas a *slot-blot* en membranas de nitrocelulosa de 0.2 μ m de tamaño de poro (Bio-Rad) usando vacío y el equipo de 48 ranuras SHM-48 (Scie-Plas). La tinción con Ponceau-S (AppliChem GmbH) permitió verificar que se cargaron cantidades iguales de proteínas totales. Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada al 10 %, e incubadas toda la noche con el anticuerpo A11, lavadas, incubadas con el anticuerpo secundario anti-HRP y lavadas nuevamente, empleando los tampones y diluciones recomendadas por el fabricante. La detección de la señal fue realizada mediante quimioluminiscencia (Amersham ECL Western blotting detection reagents, GE Healthcare) detectada sobre película radiográfica (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare). Tras la detección de oligómeros las membranas se sometieron a *stripping* y se testaron con el anticuerpo anti-NKT, con el objetivo de evaluar la posible relación cuantitativa entre los niveles totales de NKT y de oligómeros en la misma fracción proteica. Las bandas se cuantificaron mediante densitometría empleando el programa TotalLab (Nonlinear Dynamics) y se refirieron a la cantidad total de proteínas detectada con Ponceau-S como control interno de carga.

5. Análisis de los niveles de proteínas y marcadores de oxidación proteica

5.1. Electroforesis SDS-PAGE monodimensional

Se prepararon geles de poliacrilamida a un porcentaje adecuado según el tamaño de las proteínas a analizar empleando las placas de cristal correspondientes a la cámara electroforética TV200Y (Scie-Plas) con 1.5 mm de separación y su módulo

para la formación de geles. En cada caso, se preparó un gel separador de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad) al porcentaje de conveniencia (10, 11 o 12 %), Tris-HCl 0.38 M pH 8.8 y SDS 0.1 % con persulfato de amonio al 0.1 % y TEMED (Bio-Rad) al 0.01 %. Se añadió 1 ml de isopropanol a la superficie del gel a fin de eliminar la formación de burbujas y se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el isopropanol, se lavó con agua destilada y se retiraron los restos de agua. Sobre el gel separador se cargó un gel concentrador con acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad) al 4 %, Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0.1 %, persulfato de amonio al 0.1 % y TEMED (Bio-Rad) al 0.01 %. Se colocó el peine correspondiente y se dejó polimerizar el gel a temperatura ambiente.

Para su separación electroforética, cada muestra se preparó a concentración 1 µg/µl en tampón de Laemmli (Tris-HCl pH 6.8 63 mM, SDS 2 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0.002 % y β-mercaptoetanol 0.1 %). Previamente a su aplicación en el gel de poliacrilamida las muestras se calentaron durante 5 min a 95 °C. Se cargaron cantidades iguales de proteína de cada muestra (10 µg por carril) junto a un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™, Bio-Rad) en el gel de poliacrilamida. La separación electroforética en función del peso molecular se llevó a cabo a 110 V en tampón de electrodos tris-glicina, empleando la cámara electroforética TV200Y (Scie-Plas).

5.2. Western-blot

Los geles de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm de tamaño de poro (Bio-Rad). Se empleó el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) y el tampón de transferencia semi-seca previamente descrito. Se comprobó la calidad de la transferencia tiñendo reversiblemente las membranas resultantes con solución Ponceau S (PanReac AppliChem), cuando existieron problemas en la transferencia la membrana se desechó. Tras desteñir lavando con tampón TBS-T, las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5 % en TBS-T durante una hora a temperatura ambiente en agitación.

Las membranas bloqueadas se incubaron durante toda la noche en agitación a 4 °C con el anticuerpo primario de interés diluido en albúmina de suero bovino al 3 % y azida de sodio al 0.02 % en TBS-T. A continuación, las membranas se lavaron con TBS-T durante 30 min, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Dako) durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente con TBS-T durante 30 min. Se visualizó la molécula de interés mediante quimioluminiscencia (Amersham ECL Western blotting detection reagents, GE Healthcare) detectada sobre película radiográfica (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare). La tabla 5 presenta una lista de los diferentes anticuerpos empleados en esta tesis y sus respectivas diluciones de trabajo.

Tabla 5. Anticuerpos empleados en Western-blot.

Antígeno	Fuente	Referencia	Casa comercial	Dilución
Lipoxidación				
MDA	Conejo	MD 20a-R1a	Academy Biom.co	1:1 000
NKT	Cabra	ab5611	Merck Millipore	1:1 500
COX-2	Conejo	160126	Cayman	1:1 000
CYP450 2J2 (CYP2J2)	Ratón	ab139160	Abcam	1:1 000
Glicoxidación				
CEL	Ratón	KHO25	Transgenic	1:1 000
CML	Ratón	KHO24	Transgenic	1:1 000
Antioxidantes				
SOD1	Ratón	NCL:SOD1	Novocastra	1:2 000
SOD2	Conejo	SOD-110	Stressgen	1:2 000
Catalasa	Conejo	100-4151	Rockland	1:5 000
GPX4	Conejo	SC-50497	Santa Cruz	1:500
TRX1	Ratón	MSA-150	Stressgen	1:1 000
Nrf2	Conejo	ab3163	Abcam	1:1 000
Metabolismo energético				
NDUFS3 (CI)	Ratón	459130	Invitrogen	1:500
SDHA (CII)	Ratón	459200	Invitrogen	1:1 000
UQCRC2 (CIII)	Ratón	459220	Invitrogen	1:1 000
COX4 (CIV)	Ratón	459600	Invitrogen	1:500
ATP5A1 (CV)	Ratón	ab14748	Abcam	1:1 000
Vía NF-κB				
NF-κB p65	Conejo	NB 100-2176	Novus Biologicals	1:1 000
NF-κB p50	Cabra	SC-1190	Santa Cruz	1:1 000
IκBα	Conejo	ab32518	Abcam	1:1 000
Proteínas detectadas en el estudio de proteómica redox sin mencionar previamente				
CKB	Conejo	HPA001254	Sigma	1:2 000
ENO1	Ratón	H00002023-M01	Abnova	1:2 000
GAPDH	Conejo	21612	Signalway	1:5 000
ATP5A1	Ratón	612516	Biosciences	1:2 000
GFAP	Conejo	Z0334	Dako	1:10 000
NEFL	Ratón	814326	Boehringer	1:5 000
HSPD1	Ratón	H4149	Sigma-Aldrich	1:3 000
CRYAB	Ratón	ab13496	Abcam	1:2 000
YWHAG	Conejo	18649	IBL	1:1 000
PARK7	Ratón	ab11251	Abcam	1:3 000
BASP1	Conejo	ab25732	Abcam	1:1 000
HBA1	Conejo	SC-21005	Santa Cruz	1:1 000
UCHL1	Cabra	ab5937	Merck Millipore	1:1 000
Controles de carga				
Tubulina βIII	Ratón	6712A	Promega	1:10 000
β-actina	Ratón	A5316	Sigma-Aldrich	1:10 000
VDAC	Conejo	ab15895	Abcam	1:5 000
Anticuerpos secundarios				
IG de cabra	Conejo-HRP	P0449	Dako	1:1 000
IG de conejo	Cerdo-HRP	P0217	Dako	1:1 000
IG de conejo	Cabra-HRP	P0448	Dako	1:1 000
IG de ratón	Cabra-HRP	P0447	Dako	1:1 000

HRP: horseradish peroxidase; IG: inmunoglobulinas.

5.3. Inactivación de la actividad peroxidasa

A fin de poder detectar diferentes proteínas sobre una misma membrana (reusar), se incubó la membrana durante 15 min con H₂O₂ al 30 % (Sigma-Aldrich) en agitación y a temperatura ambiente. De esta manera se inactiva la peroxidasa unida al anticuerpo secundario eliminando su señal en posteriores análisis de *Western-blot* (Sennepin et al., 2009). A continuación, se lavó tres veces durante 10 min con TBS-T y se bloqueó con albúmina de suero bovino al 3 % en TBS-T por 30 min a temperatura ambiente en agitación, posteriormente se reusó para *Western-blot*.

5.4. Cuantificación densitométrica

El nivel de las proteínas y marcadores de oxidación de interés detectados a partir de los geles monodimensionales mediante *Western-blot* se cuantificó mediante densitometría empleando el programa TotalLab (Nonlinear Dynamics). Se empleó la proteína β -actina como control interno de carga, excepto para los complejos de la CTE que se normalizaron respecto a la porina mitocondrial (VDAC).

6. Análisis estadísticos

Las variables fueron reportadas usando la media \pm desviación estándar en el caso de las continuas, o como frecuencias y porcentos para el caso de las discretas. Se empleó la prueba de χ^2 para la comparación de las variables discretas. La normalidad de la distribución de las variables continuas fue probada mediante el test de Kruskal-Wallis con la corrección de Lilliefors. Las diferencias entre grupos de las variables continuas se exploraron empleando la prueba paramétrica t de Student en el caso de las normales, y la no paramétrica U de Mann-Whitney en el caso de las no normales. Se emplearon análisis de correlación para detectar relaciones entre variables, correlación de Pearson para las normales y correlación de rangos de Spearman para las no normales. Se utilizó el análisis de regresión múltiple para explorar relaciones que pudieran ser explicadas por el efecto de más de una variable. Se empleó análisis de componentes principales basado en correlaciones para reducir la dimensionalidad de los datos preservando la máxima cantidad de información posible, e inferir asociaciones significativas entre variables. También, para detectar los efectos más significativos y controlar la tasa de falsos positivos se realizó un ajuste de comparaciones múltiples mediante FDR de acuerdo al método de Benjamini y Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995) incluyendo todas las comparaciones de variables cuantitativas realizadas, considerando los valores de FDR 5 y 10 %. Las pruebas estadísticas se realizaron empleando el programa STATISTICA v8.0 (StatSoft) y un p-valor < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

7. Análisis del conjunto de datos mediante IPA

A fin de explorar en mayor profundidad los procesos moleculares modificados con la edad en el cerebro se realizó un análisis del conjunto de datos obtenido

empleando el programa bioinformático Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN), disponible en la plataforma <https://www.qiagenbioinformatics.com>. Este programa calcula dos estadísticos: el z-score y el p-valor. El z-score estima el efecto direccional de una molécula sobre otra molécula o sobre un proceso (activación/inhibición), y la dirección del cambio de las moléculas y procesos en el conjunto de datos (ascendente/descendente). El p-valor es calculado mediante la prueba exacta de Fisher de una cola y refleja la significación de la asociación entre un conjunto de moléculas significativas en el experimento y un proceso, vía o regulador.

En este análisis se empleó el conjunto de datos de diferencias de expresión proteica ME vs. AE de las moléculas exploradas en cada una de las regiones. Se usó para ello el estimador Log2Ratio de la expresión diferencial, calculado como $\text{Log}_2(\text{media en grupo AE}/\text{media en grupo ME})$ para cada marcador/proteína en cada región explorada. Así, se cargaron como datos de entrada el identificador estándar, el valor Log2Ratio y el p-valor de la comparación estadística de grupos ME vs. AE (previamente realizada) de cada una de estas moléculas en cada región. Se excluyeron de los datos incluidos en este análisis los del NKT por carecer este marcador de identificador estándar reconocido por el programa, y se incluyeron solamente los valores de la banda de 100 kDa del Nrf2 al disponerse de un identificador estándar único para el mismo y ser esta banda la reportada como biológicamente relevante (Lau et al., 2012).

A partir de estos valores se realizó un *core analysis* (análisis núcleo) inicial que estimó las vías canónicas de señalización diferencialmente representadas. A continuación, se realizó un *analysis comparison* (análisis de comparación) a fin de detectar variaciones con la edad diferenciales entre regiones cerebrales en vías moleculares y procesos funcionales. Este análisis permite la visualización en conjunto de los resultados del análisis núcleo IPA a través de múltiples condiciones (en este caso regiones). De esta manera, permite identificar similitudes, diferencias y tendencias en los efectos predichos del comportamiento de las moléculas exploradas sobre vías de señalización, enfermedades y funciones, generando *heatmaps* que permiten acceder a la información resultante del análisis fácil y rápidamente.

Al establecer los parámetros de estos análisis, se incluyeron los datos de la Ingenuity® Knowledge Base (genes + químicos endógenos) de elevada confianza, la especie se limitó a humano y el tejido y líneas celulares al SNC, y el resto de los parámetros se establecieron como las opciones por defecto.

IV. RESULTADOS

A fin de cumplimentar los objetivos del presente trabajo de tesis se emplearon muestras procedentes de 18 sujetos con edades comprendidas entre los 40 y 79 años, libres de signos neurológicos o psiquiátricos, y considerados por tanto normales. Las variaciones asociadas a la edad de los diferentes marcadores/moléculas analizados se exploraron en 12 regiones cerebrales de interés: corteza frontal, corteza parietal, giro cingulado, corteza temporal, corteza entorrinal, hipocampo, tálamo, caudado, putamen, corteza visual, sustancia nigra y vermis.

1. Identificación y caracterización de proteínas modificadas por NKT con el envejecimiento en el cerebro

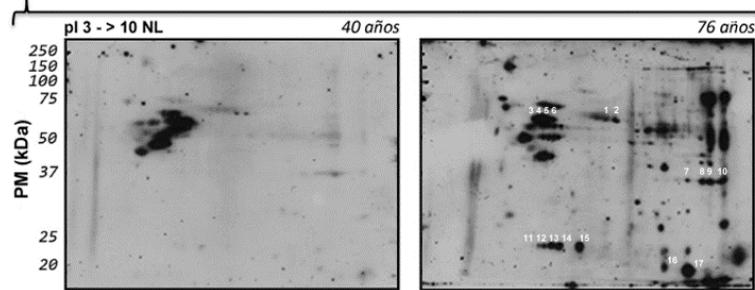
La modificación lipoxidativa por NKT de proteínas específicas asociada a la edad en el cerebro se estudió mediante análisis de proteómica redox basado en geles y caracterización bioinformática de las mismas. Los resultados de esta estrategia en tres de las regiones estudiadas (corteza parietal, corteza frontal y giro cingulado) han sido previamente publicados (anexo 1). Se presentan en este acápite incluidos en el conjunto total de resultados para todas las regiones cerebrales analizadas, lo que ha conllevado a una extensión del grupo de proteínas identificadas como modificadas por NKT en dicho artículo, y al consecuente reanálisis bioinformático.

1.1. Electroforesis bidimensional e identificación de proteínas modificadas por NKT

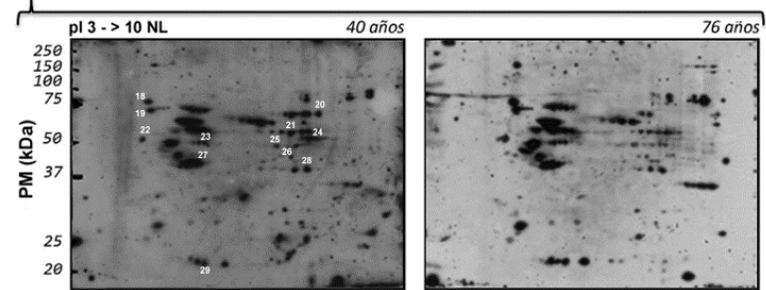
En cada región de interés, se analizaron progresivamente muestras de 10 individuos representativos de dos grupos de edad, 5 casos de ME y 5 casos de AE (casos en los extremos de la distribución de edades en cada región), empleando electroforesis bidimensional y *Western-blot* anti-NKT. Los puntos NKT-positivos se compararon cualitativamente mediante inspección visual entre grupos de edad. Se seleccionaron 54 puntos NKT-positivos de interés sobre la base de una mayor intensidad o presencia en los casos de AE (figura 16). Los puntos equivalentes en los geles teñidos con plata procesados en paralelo se escindieron manualmente y se sometieron a análisis por LC-MS/MS a fin de identificar las proteínas correspondientes a los mismos. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 6, que incluye el nombre y sigla asociado a cada proteína.

Para corroborar la identidad obtenida por MS, un subgrupo de las proteínas identificadas se analizó mediante *Western-blot* con anticuerpos específicos tras *stripping* (ATP5A1, BASP1, CKB, CRYAB, ENO1, GAPDH, GFAP, HBA1, HSPD1, NEFL, PARK7, UCHL1 y YWHAG), en las membranas previamente marcadas con NKT, comparando la coincidencia del marcaje NKT/proteína (figura 17). Estas proteínas coincidieron con sus respectivos puntos NKT-positivos a excepción de la UCHL1, que se emparejó a un grupo de puntos NKT-positivos, pero desplazada a un punto isoeléctrico más básico que su estimado teórico.

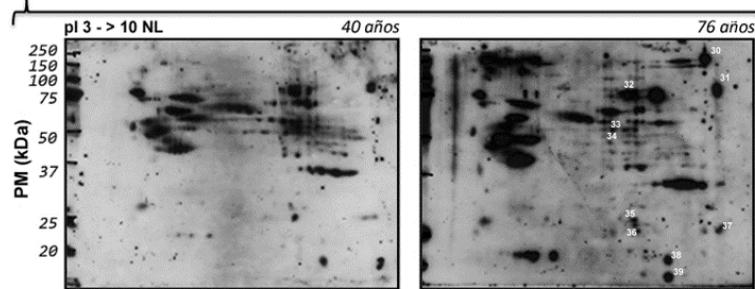
A. CORTEZA PARIETAL



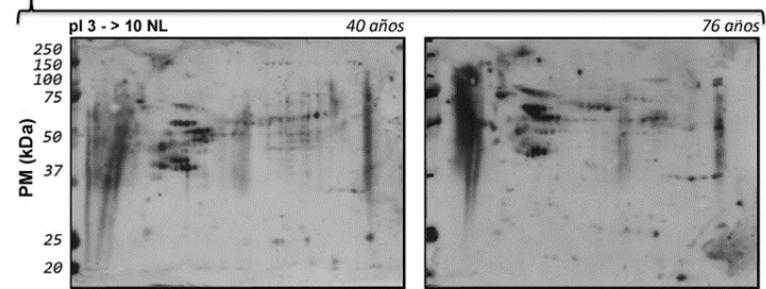
B. CORTEZA FRONTAL



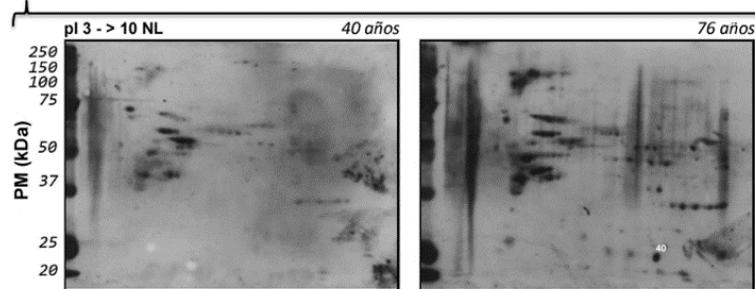
C. GIRO CINGULADO



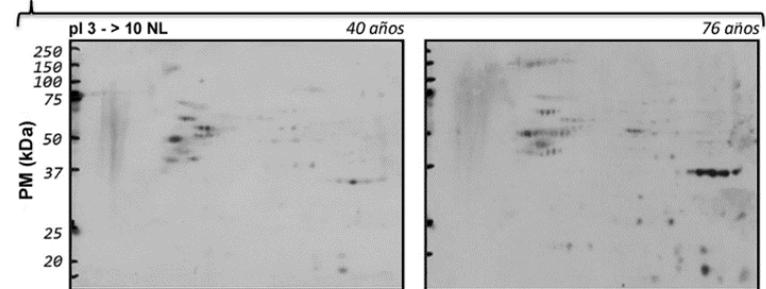
D. CORTEZA TEMPORAL



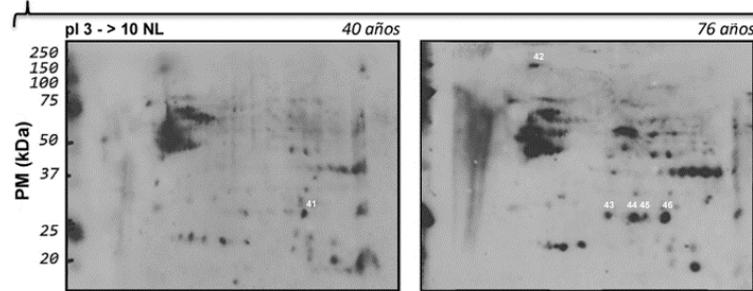
E. CORTEZA ENTORRINAL



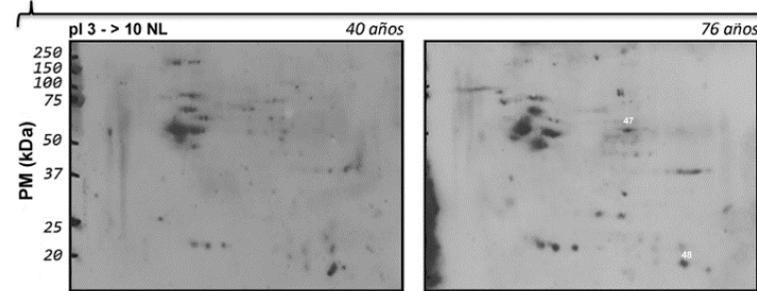
F. HIPOCAMPO



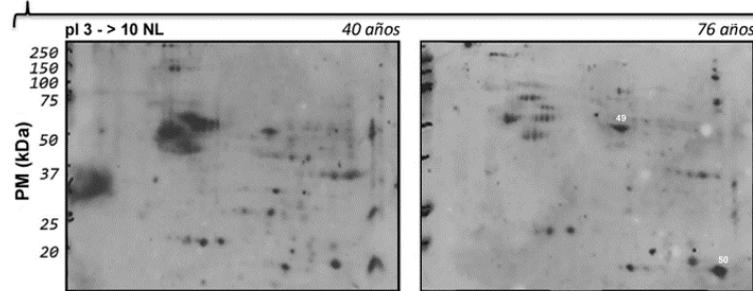
G. TALAMO



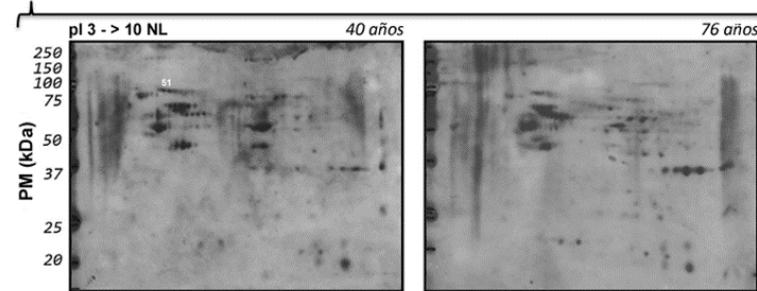
H. CAUDADO



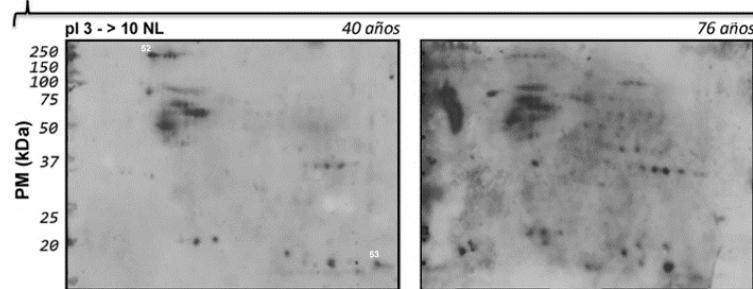
I. PUTAMEN



J. CORTEZA VISUAL



K. SUSTANCIA NIGRA



L. VERMIS

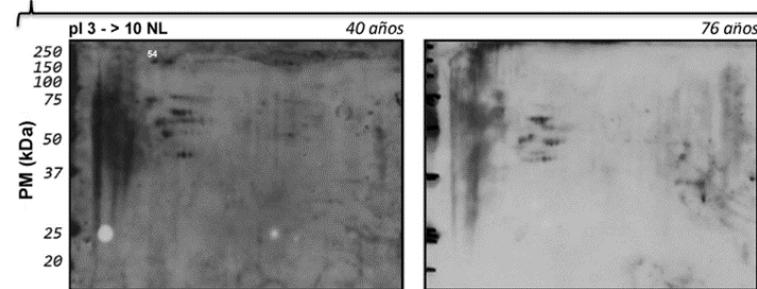


Figura 16. Electroforesis bidimensional y *Western-blot* anti-NKT en cada una de las regiones exploradas (A-L) en dos casos representativos, de mediana (40 años, caso 1) y avanzada edad (76 años, caso 16). Se presentan en números blancos los 54 puntos seleccionados para su identificación por espectrometría de masas.

Tabla 6. Identificación de proteínas modificadas por NKT mediante espectrometría de masas.

Punto	Proteína	No. Swiss-Prot	Puntuación Mascot	Cobertura (%)	PM (kDa)	pI
1	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYSL2)	Q16555	724.28	48.43	62.25	6.38
2	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYSL2)	Q16555	1085.17	62.76	62.25	6.38
3	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	P10809	4087.37	83.60	61.02	5.87
4	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	P10809	2275.19	77.49	61.02	5.87
5	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	P10809	4285.96	89.35	61.02	5.87
6	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	P10809	2412.60	72.25	61.02	5.87
7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406	1937.82	88.06	36.03	8.46
8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406	1711.18	70.45	36.03	8.46
9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406	2334.34	79.10	36.03	8.46
10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406	842.06	43.28	36.03	8.46
11	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1)	P09936	1082.92	78.03	24.81	5.48
12	Protein DJ-1 (PARK7)	Q99497	625.43	89.42	19.88	6.79
13	Protein DJ-1 (PARK7)	Q99497	1262.00	89.42	19.88	6.79
14	Protein DJ-1 (PARK7)	Q99497	1065.72	85.71	19.88	6.79
15	Protein DJ-1 (PARK7)	Q99497	808.75	89.42	19.88	6.79
16	Alpha-crystallin B chain (CRYAB)	P02511	2069.68	97.14	20.15	7.53
17	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1)	P30086	2255.23	81.28	21.04	7.53
18	Neurofilament medium polypeptide (NEFM)	P07197	479.13	12.77	102.41	4.91
19	Neurofilament light polypeptide (NEFL)	P07196	902.93	41.25	61.47	4.65
20	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (PKM2)	P14618	860.77	42.94	57.90	7.84
21	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial (DLD)	P09622	337.68	25.34	54.14	7.85
22	Brain acid soluble protein 1 (BASP1)	P80723	800.65	81.50	22.68	4.63
23	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	P14136	1830.71	64.35	49.85	5.52
24	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP5A1)	P25705	1447.00	46.65	59.71	9.13
25	Alpha-enolase (ENO1)	P06733	709.67	33.87	47.14	7.39
26	Alpha-enolase (ENO1)	P06733	728.28	41.71	47.14	7.39
27	Creatine kinase B-type (CKB)	P12277	724.17	56.96	42.62	5.59
28	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (GOT1)	P17174	1116.53	68.28	46.22	7.01
29	14-3-3 protein gamma (YWHA3)	P61981	1494.57	80.97	28.28	4.89
30	Hemoglobin subunit alpha (HBA1)	P69905	1400.82	85.21	15.25	8.68
31	Synapsin-1 (SYN1)	P17600	315.53	32.06	74.07	9.83
32	Aconitate hydratase, mitochondrial (ACO2)	Q99798	606.55	34.36	85.37	7.61
33	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial (DLD)	P09622	504.52	28.29	54.14	7.85
34	Alpha-enolase (ENO1)	P06733	2341.02	55.53	47.14	7.39
35	Carbonic anhydrase 1 (CA1)	P00915	481.65	52.49	28.85	7.12
36	Phosphoglyceratmutase 1 (PGAM1)	P18669	261.15	65.75	28.79	7.18
37	Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP)	O94811	528.08	36.07	23.68	9.44
38	NADPH-Flavin reductase (BLVRB)	P30043	323.79	42.23	22.11	7.65
39	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1)	P30086	466.32	48.13	21.04	7.53
40	Phosphoglyceratmutase 1 (PGAM1)	P18669	623.22	89.37	28.79	7.18
41	Phosphoglyceratmutase 1 (PGAM1)	P18669	139.61	65.75	28.79	7.18
42	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	P14136	140.60	43.98	49.85	5.52
43	Dihydropteridine reductase (QDPR)	P09417	150.77	51.64	25.77	7.37
44	Triosephosphate isomerase (TPI1)	P60174	92.64	61.19	30.77	5.92
45	Triosephosphate isomerase (TPI1)	P60174	118.77	71.68	30.77	5.92
46	Phosphoglyceratmutase 1 (PGAM1)	P18669	379.09	77.95	28.79	7.18
47	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5B)	P06576	769.60	77.69	56.52	5.40
48	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1)	P30086	573.05	78.07	21.04	7.53
49	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5B)	P06576	506.37	76.18	56.52	5.40
50	Cofilin-1 (CFL1)	P23528	176.74	68.67	18.49	8.09
51	Heat shock cognate 71 kDa (HSPA8)	P11142	443.77	64.86	70.9	5.82
52	Neurofilament medium polypeptide (NEFM)	P07197	180.06	39.30	102.41	4.91
53	Cofilin-1 (CFL1)	P23528	97.69	62.65	18.49	8.09
54	Neurofilament medium polypeptide (NEFM)	P07197	280.35	46.94	102.41	4.91

Se ha optado por mantener los nombres en inglés de estas proteínas y sus acrónimos estándar tal y como se reportan en Swiss-Prot.

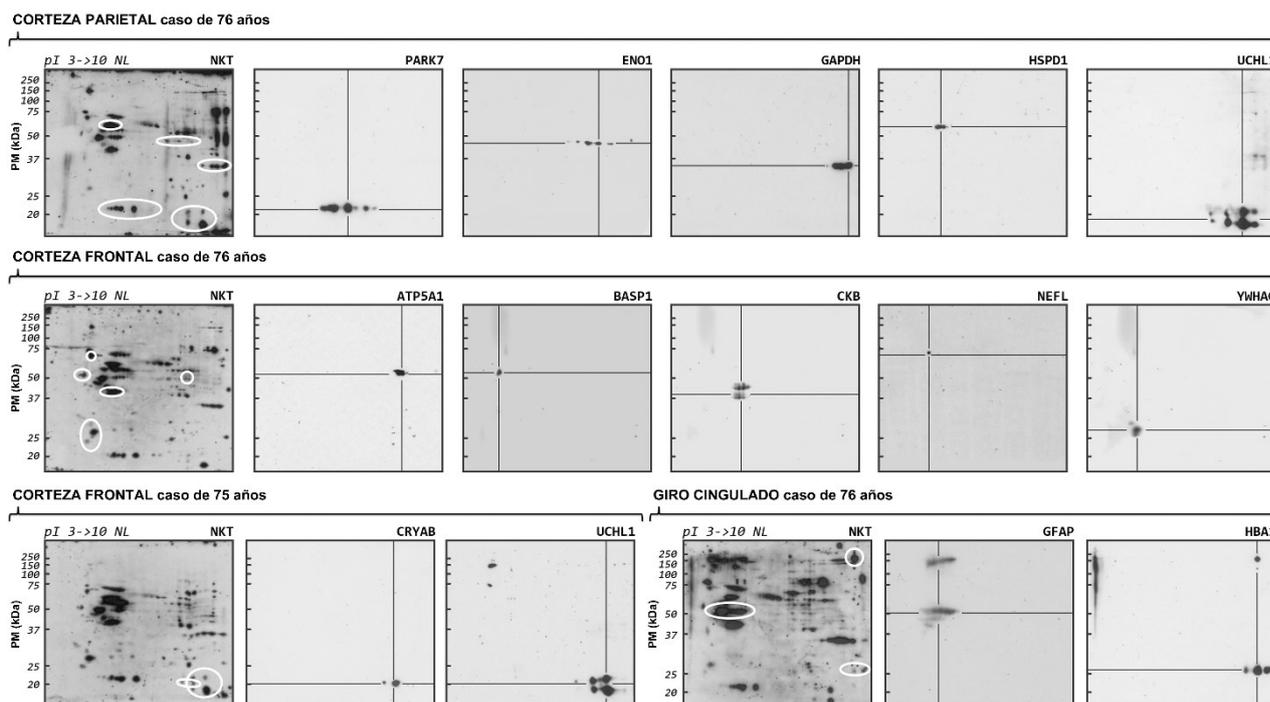


Figura 17. Validación mediante *Western-blot* de las identidades proteicas generadas mediante espectrometría de masas. Las membranas obtenidas por electroforesis bidimensional y marcadas con anti-NKT se sometieron a *stripping* y se probaron empleando anticuerpos específicos para el grupo de proteínas identificadas que se muestran en la figura.

De esta manera se identificaron 30 proteínas susceptibles de ser modificadas por NKT en el cerebro con variaciones respecto a la edad y a sus patrones regionales. La tabla 7 muestra la lista final de las mismas incluyendo su localización y funciones.

1.2. Proteínas modificadas por NKT respecto a la edad y regiones en el cerebro

La figura 18 presenta el número de casos (será referido como nivel de lipoxidación) por grupo de edad en los que se encontró la modificación por NKT, para cada una de las proteínas identificadas y en cada región cerebral explorada. Es posible detectar estas proteínas modificadas por NKT desde la mediana edad. Los patrones de variación de estas proteínas entre grupos de edad en cada región cerebral se resumen en la tabla 8.

Considerando la presencia acumulativa de casos con proteínas lipoxidadas por grupo de edad (total de puntos en grupo ME vs. total de puntos en grupo AE), la aducción por NKT de estas proteínas aumentó en los individuos de AE en todas las regiones a excepción de putamen y vermis. Las diferencias entre grupos de edad de estas frecuencias acumuladas no fueron estadísticamente significativas en hipocampo, caudado, putamen y sustancia nigra.

Tabla 7. Localización y funciones de las proteínas modificadas por NKT.

Proteína	Localización	Funciones
Metabolismo energético		
CKB	Citosol, EVE	Transducción de energía
TPI1	Citosol, núcleo, EVE	Cataliza la isomerización del gliceraldehído 3-fosfato y el dihidroxi-acetona fosfato en la glicólisis y la gluconeogénesis
GAPDH	Citosol, citoesqueleto, núcleo, EVE	Glicólisis (paso 6); funciones nucleares; organización del citoesqueleto
PGAM1	Citosol, EVE	Glicólisis (paso 8); regula la biosíntesis anabólica
ENO1	Citosol, membrana, núcleo, EVE	Glicólisis (paso 9); control del crecimiento; tolerancia a la hipoxia; respuesta inmune
PKM2	Citosol, núcleo, EVE	Glicólisis (paso final); ligada a la muerte celular programada independiente de caspasas
ACO2	Mitocondria, núcleo	Cataliza la isomerización del citrato a isocitrato en el ciclo de Krebs
ATP5A1	Mitocondria, EVE	Componente del complejo ATP-sintasa que produce ATP durante la fosforilación oxidativa
ATP5B	Mitocondria, EVE	Componente del complejo ATP-sintasa que produce ATP durante la fosforilación oxidativa
DLD	Mitocondria	Componente de los complejos piruvato, α -cetoglutarato y aminoácidos de cadena ramificada deshidrogenasa, y del sistema de escisión de glicina
Citoesqueleto		
GFAP	Citoesqueleto glial - filamento intermedio	Componente estructural del citoesqueleto; marcador celular específico de astrocitos
NEFL	Citoesqueleto - neurofilamento	Citoesqueleto neuronal; mantenimiento del calibre neuronal; transporte axon cargo
NEFM	Citoesqueleto - neurofilamento	Citoesqueleto neuronal; mantenimiento del calibre neuronal; transporte axonal
TPPP	Citoesqueleto, núcleo, EVE	Integridad de la red de microtúbulos; ensamblaje del huso mitótico y desglose de la envoltura nuclear
CFL1	Citoesqueleto, matriz nuclear	Regulación de la morfología celular y organización del citoesqueleto
Proteostasis		
HSPD1	Mitocondria, citosol, EVE	Importación mitocondrial de proteínas y ensamblaje macromolecular; plegado de proteínas; proceso apoptótico
HSPA8	Citosol, núcleo, membrana	Chaperona molecular; protección ante el estrés; activación de proteólisis; formación y disociación de complejos
PARK7	Citosol, núcleo, mitocondria, EVE	Protege del estrés oxidativo y la muerte celular; actividad chaperona; actividades reguladoras pleiotrópicas
CRYAB	Citosol, núcleo, EVE	Actividad tipo chaperona; previene la agregación de proteínas en condiciones de estrés
UCHL1	Citosol, membrana, RE, EVE	Procesamiento de precursores de ubiquitina y proteínas ubiquitinadas
Neurotransmisión		
GOT1	Citosol, núcleo, EVE	Biosíntesis de L-glutamato; regulador de los niveles de glutamato; scavenger de glutamato en la neuroprotección
DPYSL2	Citosol, citoesqueleto, membrana, EVE	Desarrollo y polaridad neuronal; colapso del cono de crecimiento y migración celular; tráfico de vesículas sinápticas
PEBP1	Citosol núcleo, EVE	Une ATP, opioides y fosfatidiletanolamina; inhibidor de proteasas serina y de actividad RAF1 quinasa
SYN1	Aparato de Golgi, vesícula sináptica	Recubre las vesículas sinápticas y regula la liberación del neurotransmisor; funciones de óxido nítrico pre-sináptico
BASP1	Citosol, membrana, núcleo, EVE	Unión a ADN y proteínas; regulación de la transcripción; regulación del desarrollo
YWHAG	Citosol, EVE	Regulación de un amplio espectro de vías de señalización generales y especializadas
QDPR	Citosol, mitocondria, EVE	Produce tetrahidrobiopterina, un coenzima esencial para las Phe, Tyr, y Trp hidroxilasas
Metabolismo del O₂/CO₂/hemo		
HBA1	Citosol, EVE	Transporte de oxígeno
CA1	Citosol, EVE	Hidratación reversible del CO ₂ ; hidrata la cianamida a urea
BLVRB	Citosol, membrana, núcleo, EVE	Oxidoreductasa; cataliza la reducción dependiente de NADPH de una variedad de flavinas; catabolismo del grupo hemo

Localización y funciones basadas en lo reportado en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>). RE: retículo endoplasmático; EVE: exosoma vesicular extracelular. Las proteínas se presentan separadas en los grupos metabolismo energético, citoesqueleto, proteostasis, neurotransmisión y metabolismo del O₂/CO₂/hemo.



Figura 18. Número de casos por grupo de edad con presencia de aductos de NKT en el conjunto de proteínas identificadas en cada una de las regiones cerebrales exploradas (A-L). El grupo de casos de mediana edad se presenta en azul claro y el de avanzada edad en rojo oscuro, y el eje de las Y presenta el número de casos en que la proteína se encontró modificada por NKT. Las proteínas se presentan en grupos funcionales que corresponden a metabolismo energético, citoesqueleto, proteostasis, neurotransmisión y el metabolismo del O₂/CO₂/hemo.

La distribución de los valores de presencia acumulativa de casos con proteínas lipoxidadas por grupo de edad en las regiones estudiadas es: corteza parietal 53 vs. 73 ($\chi^2 = 4.94$, $p < 0.03$), corteza frontal 85 vs. 121 ($\chi^2 = 18.98$, $p < 0.000$), giro cingulado 87 vs. 115 ($\chi^2 = 11.05$, $p < 0.001$), corteza temporal 45 vs. 75 ($\chi^2 = 11.68$, $p < 0.001$), corteza entorrinal 34 vs. 54 ($\chi^2 = 5.81$, $p < 0.01$), hipocampo 22 vs. 30 ($\chi^2 = 1.14$, $p = 0.286$), tálamo 50 vs. 72 ($\chi^2 = 6.90$, $p < 0.01$), caudado 44 vs. 53 ($\chi^2 = 0.98$, $p = 0.323$), putamen 52 vs. 36 ($\chi^2 = 3.62$, $p = 0.057$), corteza visual 43 vs. 61 ($\chi^2 = 4.25$, $p < 0.04$), sustancia nigra 27 vs. 42 ($\chi^2 = 3.69$, $p = 0.055$) y vermis 27 vs. 48 ($\chi^2 = 7.11$, $p < 0.008$).

Las regiones en que un mayor número de proteínas (más del 50 %) mostró un aumento del nivel de lipoxidación en el grupo de AE fueron por orden decreciente: corteza frontal (80 %), giro cingulado (63.3 %) y corteza parietal (60.7 %).

Las proteínas que más frecuentemente aumentaron su nivel de lipoxidación con la edad (ME < AE en más del 50 % de las regiones) fueron la ATP5B (75 %), UCHL1 (66.7 %), GOT1 (66.7 %), GAPDH (58.3 %) y ENO1 (58.3 %).

Considerando todos los casos y regiones, sin distinguir por grupos de edad, las proteínas más frecuentemente lipoxidadas (más del 50 % de los casos) en orden decreciente son: GFAP (97.5 %), HSPD1 (95 %), CKB (80 %), GAPDH (72.5 %), NEFM (70.8 %) y PEB1 (70 %). Estas proteínas (excepto NEFM) y la chaperona HSPA8 se encontraron modificadas por NKT en todas las regiones. Además, la GFAP y HSPD1 muestran el mismo nivel de lipoxidación en individuos de ME y AE en más de la mitad de las regiones exploradas.

En las tres regiones con mayor aumento del nivel de lipoxidación con la edad (corteza frontal, giro cingulado y corteza parietal), se exploraron la variación de los niveles de un subgrupo de estas proteínas, a fin de descartar que el aumento de la lipoxidación no fuera más que el resultado del aumento de los niveles de expresión con la edad. La selección del subgrupo a evaluar se realizó en base a la lista de 25 proteínas inicialmente reportadas como lipoxidadas en el anexo 1 (no incluía a TPI1, ATP5B, CFL1, HSPA8 y QDPR). Se excluyeron las proteínas sin diferencias entre grupos de edad en estas tres regiones (GFAP, NEFL, NEFM y HSPD1) y las que no se disponía de anticuerpos comerciales (PKM2, DPYSL2, DLD, PEBP1, SYN1, GOT1, PGAM1, ACO2, TPPP, CA1 y BLVRB). De las restantes, se evaluaron las seis proteínas con mayores niveles acumulativos de lipoxidación en los casos de AE al menos en dos regiones (ATP5A1, CKB, ENO1, GAPDH, YWHAG y UCHL1), mediante SDS-PAGE monodimensional y *Western-blot* con anticuerpos específicos disponibles (figura suplementaria 2 en el anexo 1).

Se cuantificaron sus niveles mediante densitometría empleando β -tubulina como control de carga y se compararon entre grupos de edad en cada región, tras comprobar la normalidad de las variables. Los resultados estadísticos de estas comparaciones se resumen en la tabla complementaria 2 y se representan gráficamente en la figura suplementaria 3, ambas en el anexo 1. No hubo diferencias significativas en los niveles totales de expresión de las proteínas evaluadas en ninguna región cuando se compararon los grupos de ME y AE, con excepción de una disminución significativa de los niveles de YWHAG ($p < 0.02$) en la corteza frontal en el grupo de AE. Estos resultados indican que el aumento en los niveles de lipoxidación de estas proteínas con la edad no es el resultado de una mayor expresión de las mismas, al menos en estas regiones.

Tabla 8. Patrones de variación de las proteínas modificadas por NKT entre grupos de edad en cada región cerebral.

Región	ME < AE	ME = AE	ME > AE	Ausente en todos los casos
Corteza parietal	CKB, GAPDH, PGAM1, ENO1, PKM2, ACO2, ATP5A1*, ATP5B, TPPP, CFL1*, PARK7, CRYAB, UCHL1, GOT1, DPYSL2, PEBP1, YWHAG, HBA1*, CA1*, BLVRB* (n=20; 66.7% de las proteínas)	DLD, GFAP [^] , NEFL, NEFM, HSPD1 [^] , HSPA8, SYN1, BASP1 (n=8; 26.7% de las proteínas)	TPI1* (n=1; 3.3% de las proteínas)	QDPR (n=1; 3.3% de las proteínas)
Corteza frontal	TPI1, GAPDH, PGAM1, ENO1, PKM2, ACO2, ATP5A1, ATP5B, DLD, TPPP, CFL1*, HSPA8, PARK7, CRYAB, UCHL1, GOT1, DPYSL2, PEBP1, SYN1, BASP1, YWHAG, HBA1*, CA1, BLVRB (n=24; 80% de las proteínas)	CKB [^] , GFAP [^] , NEFL [^] , NEFM [^] , HSPD1 [^] (n=5; 16.7% de las proteínas)		QDPR (n=1; 3.3% de las proteínas)
Giro cingulado	CKB, PGAM1, ENO1, ACO2, ATP5B, DLD, NEFM, TPPP, CFL1*, PARK7, CRYAB, UCHL1, GOT1, PEBP1, SYN1, BASP1, HBA1, CA1, BLVRB (n=19; 63.3% de las proteínas)	GAPDH, PKM2 [^] , ATP5A1, GFAP [^] , NEFL [^] , HSPD1 [^] , HSPA8 [^] , DPYSL2 [^] , YWHAG (n=9; 30% de las proteínas)	TPI1*, QDPR* (n=2; 6.7% de las proteínas)	
Corteza temporal	TPI1, GAPDH, PGAM1, ENO1*, ATP5B, DLD, UCHL1*, GOT1, DPYSL2, PEBP1*, SYN1, BASP1*, QDPR* (n=13; 43.3% de las proteínas)	CKB [^] , PKM2, GFAP [^] , NEFL, NEFM [^] , HSPD1 [^] , HSPA8 [^] (n=7; 23.3% de las proteínas)	ATP5A1, TPPP (n=2; 6.7% de las proteínas)	ACO2, CFL1, PARK7, CRYAB, YWHAG, HBA1, CA1, BLVRB (n=8; 26.7% de las proteínas)
Corteza entorrinal	ENO1*, ATP5B, NEFL, TPPP*, CRYAB*, DPYSL2, PEBP1, SYN1*, YWHAG (n=9; 30% de las proteínas)	CKB [^] , TPI1 [^] , GAPDH, GFAP [^] , NEFM, HSPD1 [^] , HSPA8 [^] , GOT1, BASP1 (n=9; 30% de las proteínas)	PKM2* (n=1; 3.3% de las proteínas)	PGAM1, ACO2, ATP5A1, DLD, CFL1, PARK7, UCHL1, QDPR, HBA1, CA1, BLVRB (n=11; 36.7% de las proteínas)
Hipocampo	CKB, TPI1*, GAPDH, HSPD1, UCHL1*, GOT1 (n=6; 20% de las proteínas)	GFAP [^] , PEBP1 [^] (n=2; 6.7% de las proteínas)	ENO1*, PKM2*, DLD*, HSPA8* (n=4; 13.3% de las proteínas)	PGAM1, ACO2, ATP5A1, ATP5B, NEFL, NEFM, TPPP, CFL1, PARK7, CRYAB, DPYSL2, SYN1, BASP1, YWHAG, QDPR, HBA1, CA1, BLVRB (n=18; 60% de las proteínas)
Tálamo	TPI1*, PGAM1, ENO1*, PKM2*, ATP5B, DLD, NEFM, PARK7, UCHL1, QDPR (n=10; 33.3% de las proteínas)	GAPDH, GFAP [^] , TPPP, HSPD1 [^] , HSPA8 [^] , CRYAB, GOT1, PEBP1 [^] (n=8; 26.7% de las proteínas)	CKB, NEFL*, CFL1, HBA1* (n=4; 13.3% de las proteínas)	ACO2, ATP5A1, DPYSL2, SYN1, BASP1, YWHAG, CA1, BLVRB (n=8; 26.7% de las proteínas)
Caudado	TPI1*, GAPDH, ENO1*, ATP5B, CRYAB, UCHL1*, GOT1*, BASP1*, YWHAG*, QDPR* (n=10; 33.3% de las proteínas)	CKB [^] , GFAP [^] , NEFL, CFL1 (n=4; 13.3% de las proteínas)	NEFM, HSPD1, HSPA8, PARK7, PEBP1, SYN1 (n=6; 20% de las proteínas)	PGAM1, PKM2, ACO2, ATP5A1, DLD, TPPP, DPYSL2, HBA1, CA1, BLVRB (n=10; 33.3% de las proteínas)
Putamen	ATP5B, CFL1 (n=2; 6.7% de las proteínas)	GFAP [^] , NEFL, CRYAB, UCHL1, SYN1 (n=5; 16.7% de las proteínas)	CKB, TPI1, GAPDH, NEFM, HSPD1, HSPA8*, PARK7, GOT1*, PEBP1, QDPR*, HBA1* (n=11; 36.7% de las proteínas)	PGAM1, ENO1, PKM2, ACO2, ATP5A1, DLD, TPPP, DPYSL2, BASP1, YWHAG, CA1, BLVRB (n=12; 40% de las proteínas)
Corteza visual	CKB, ATP5A1*, ATP5B, DLD, GFAP, NEFM, HSPD1, CRYAB*, UCHL1*, GOT1, DPYSL2, PEBP1 (n=12; 40% de las proteínas)	GAPDH, ENO1, HSPA8 [^] (n=3; 10% de las proteínas)	TPI1*, NEFL (n=2; 6.7% de las proteínas)	PGAM1, PKM2, ACO2, TPPP, CFL1, PARK7, SYN1, BASP1, YWHAG, QDPR, HBA1, CA1, BLVRB (n=13; 43.3% de las proteínas)
Sustancia nigra	CKB, GAPDH, CFL1, HSPA8*, PARK7, GOT1* (n=6; 20% de las proteínas)	GFAP [^] , NEFM [^] , HSPD1 [^] , PEBP1 [^] (n=4; 13.3% de las proteínas)		TPI1, PGAM1, ENO1, PKM2, ACO2, ATP5A1, ATP5B, DLD, NEFL, TPPP, CRYAB, UCHL1, DPYSL2, SYN1, BASP1, YWHAG, QDPR, HBA1, CA1, BLVRB (n=20; 66.7% de las proteínas)
Vermis	GAPDH, NEFL*, BASP1* (n=3; 10% de las proteínas)	CKB [^] , GFAP, HSPD1 [^] (n=3; 10% de las proteínas)	ATP5B*, DLD*, NEFM, HSPA8*, PEBP1* (n=5; 16.7% de las proteínas)	TPI1, PGAM1, ENO1, PKM2, ACO2, ATP5A1, TPPP, CFL1, PARK7, CRYAB, UCHL1, GOT1, DPYSL2, SYN1, YWHAG, QDPR, HBA1, CA1, BLVRB (n=19; 63.3% de las proteínas)

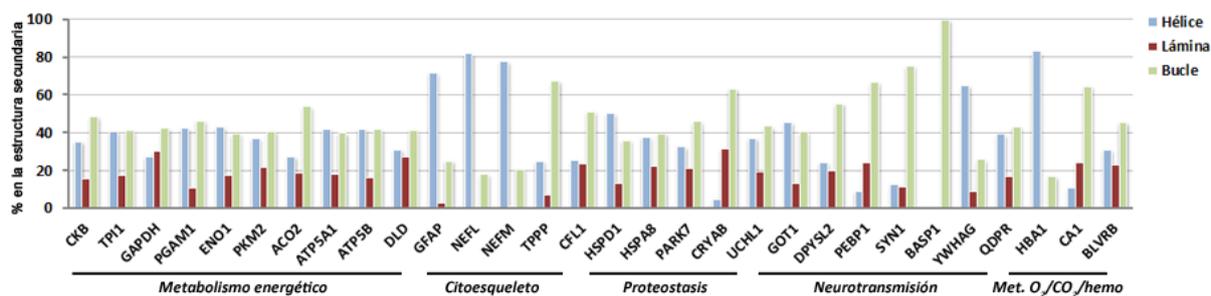
AE: grupo de casos de avanzada edad; ME: grupo de casos de mediana edad; * indica que la modificación solo se encuentra en el grupo casos en que es mayor su presencia; ^ indica que la modificación se encuentra en todos los casos.

1.3. Caracterización de las proteínas modificadas por NKT identificadas

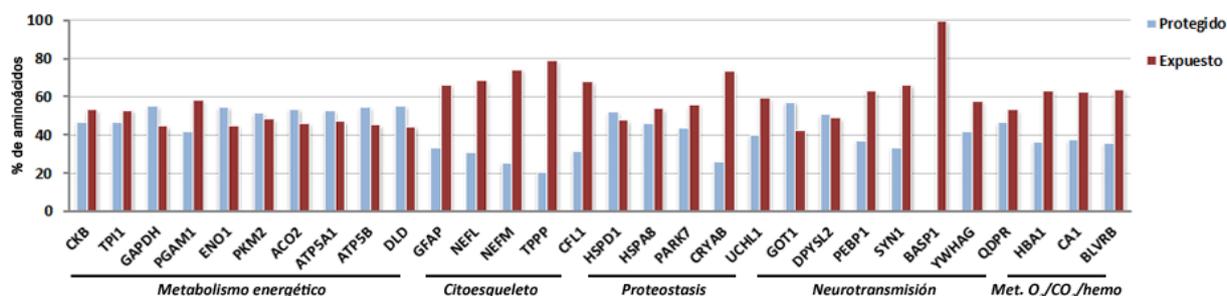
Solo una pequeña fracción de las proteínas totales muestra modificaciones oxidativas discernibles, sugiriendo una vulnerabilidad selectiva. Los factores que pueden afectar esta “especificidad” (más allá de la abundancia) pueden ser diversos, incluyendo características estructurales, funcionales y/o de localización. Se exploraron estas características en el grupo de proteínas identificadas mediante análisis bioinformático.

Las características estructurales del grupo fueron exploradas empleando el programa PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) y se representan en la figura 19.

A. ESTRUCTURA SECUNDARIA



B. EXPOSICIÓN AL MEDIO



C. AMINOÁCIDOS MÁS FRECUENTES EN LA ESTRUCTURA EXPUESTA

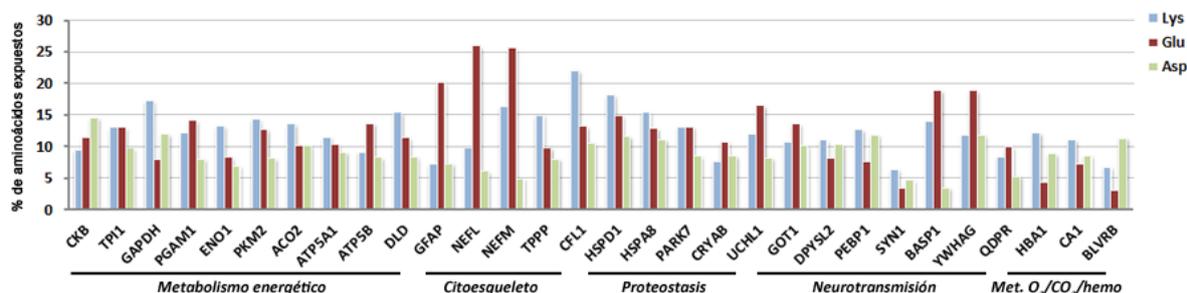


Figura 19. Caracterización estructural del grupo de proteínas identificadas como modificadas por NKT de acuerdo al análisis realizado empleando el programa PredictProtein. Las estructuras secundarias predominantes en las proteínas oxidadas son la hélice α y los bucles (A). La exposición al medio es elevada en estas proteínas (B). Los aminoácidos más frecuentemente expuestos son la lisina, el ácido glutámico y el ácido aspártico (C).

Excluyendo a la BASP1 (100 % bucle o desorganizada), en la estructura secundaria de estas proteínas el motivo hélice α representa del 5.1 % al 83.1 %, la lámina β del 1.2 % al 31.4 % (ausente en NEFL y HBA1) y los bucles del 16.9 % al 75.5 % (figura 19A). La suma de los motivos hélice α y bucle representa entre el 68.5 % y el 98.8 % en la estructura secundaria de estas proteínas. La exposición al medio de las mismas varió entre el 42.6 % y el 100 %, y fue superior al 50 % en 20 de las proteínas (figura 19B).

En cuanto a la composición de aminoácidos, los más comunes en estas estructuras fueron la alanina (frecuencia media en el grupo: 9.8 %), la leucina (frecuencia media en el grupo: 8.6 %) y la glicina (frecuencia media en el grupo: 8.2 %), como lo reportado para el conjunto total de proteínas presentes en la base de datos Swiss-Prot. Sin embargo, los aminoácidos más frecuentes en las regiones expuestas de estas proteínas son la lisina (frecuencia media: 12.43 %), el ácido glutámico (frecuencia media: 12.42 %) y el ácido aspártico (frecuencia media: 8.93 %) (figura 19C).

Con respecto a la localización celular, un análisis de las anotaciones del término GO (*Gene Ontology*) “componente celular” reveló como localizaciones subcelulares más representadas para estas proteínas: citoesqueleto, citoplasma, mitocondria y exosoma. En el caso de las anotaciones para el término GO “función molecular”, se encuentran sobrerrepresentadas: unión, actividad catalítica y molécula estructural.

Teniendo en cuenta estas funciones moleculares, se exploraron las interacciones de estas proteínas usando la herramienta STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*, <http://string-db.org/>). Para obtener la red de interacciones se empleó un nivel de confianza alto de la puntuación combinada que estima el programa y no más de 10 interacciones externas. El resultado de este análisis se muestra en la figura 20. El nodo central de la red resultante está ocupado por la ubiquitina C a través de interacciones tipo unión.

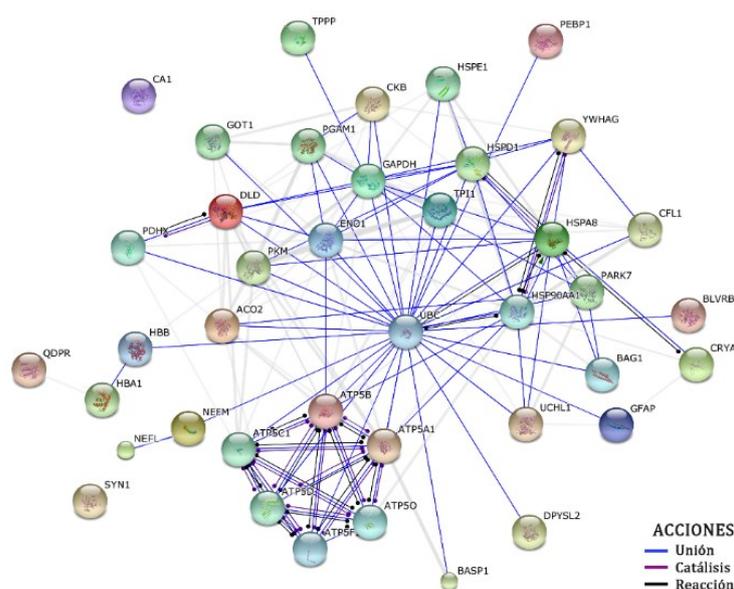


Figura 20. Red de interacciones proteína-proteína derivada del análisis con el programa STRING del grupo de proteínas identificadas como modificadas por NKT.

Las vías funcionales sobrerrepresentadas en las que están implicadas estas proteínas se exploraron y enriquecieron utilizando el software Cytoscape y los *plugins* ClueGO y CluePedia. El resultado de este análisis se presenta en la figura 21; muestra una elevada representación de términos GO para procesos relacionados con el metabolismo energético (incluye glucólisis y gluconeogénesis, respiración mitocondrial y producción rápida de energía), el mantenimiento de la mielina, procesos basados en filamentos intermedios, transporte de carga axonal, transporte intracelular dependiente del citoesqueleto, la estabilización de proteínas, la importación de proteínas mitocondriales y la actividad de carbono-oxígeno liasa. De acuerdo a sus funciones más descritas (tabla 7), aproximadamente el 33.3 % de las proteínas lipoxidadas están implicadas en el metabolismo energético, el 16.7 % en funciones relacionadas con el citoesqueleto, otro 16.7 % en la proteostasis, el 23.3 % en la neurotransmisión directa o indirectamente, y el 10 % restante en el metabolismo de O₂/CO₂/hemo. Es de mencionar, además, que el análisis de enriquecimiento funcional mediante Cytoscape muestra que 16 de estas proteínas (53.3 %) se involucran en el mantenimiento de la mielina.

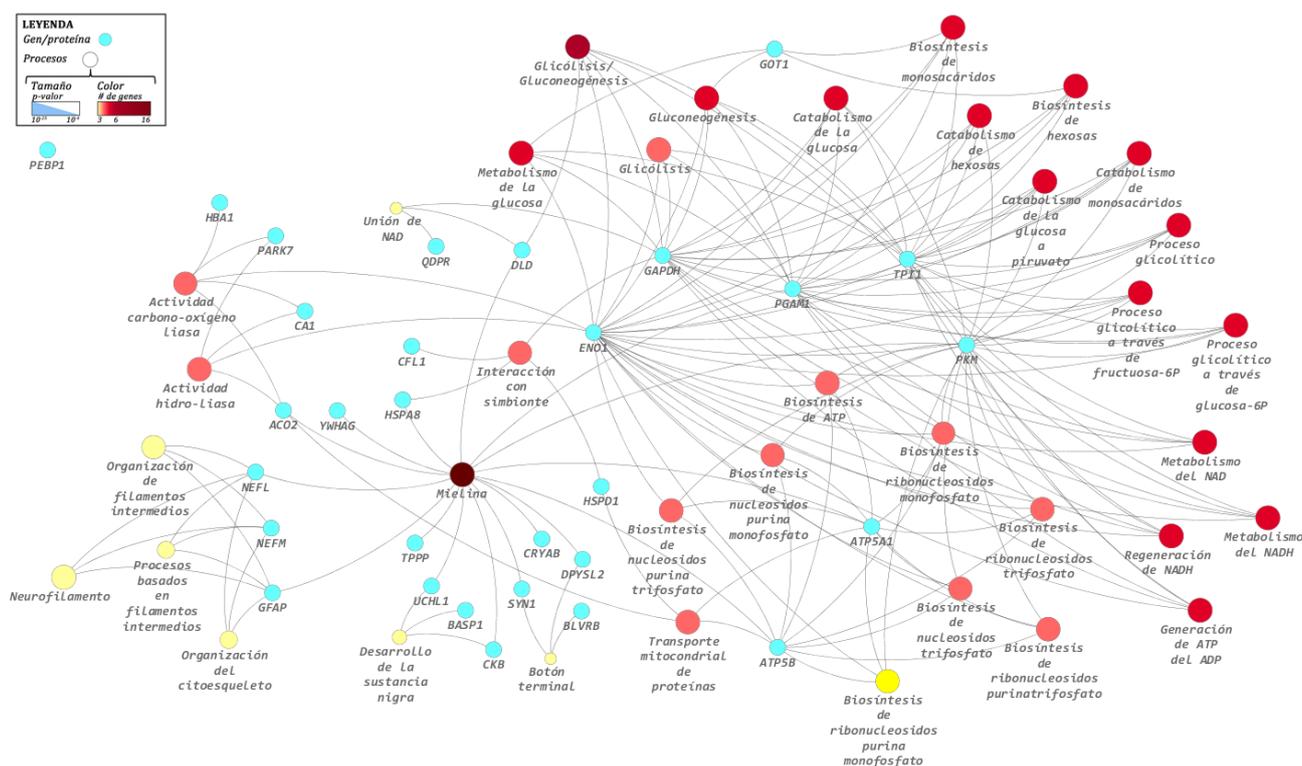


Figura 21. Vías y conexiones sobrerrepresentadas de los genes que codifican las proteínas modificadas por NKT resultantes del análisis de enriquecimiento de términos GO (*Gene Ontology*) utilizando el programa Cytoscape e incluyendo la información de las bases de datos GO vía y funciones, KEEG, REACTOME y STRING.

1.4. Oligómeros solubles y niveles de NKT

La modificación de proteínas por NKT altera su estructura y se ha descrito que favorece los eventos de reticulación y agregación. Es posible la generación de oligómeros, a partir de estructuras moleculares aberrantes, reconocidos por su

potencial citotóxico. Por ello, se exploró la posible relación entre los niveles de NKT total y la formación de oligómeros solubles (anticuerpo A11), respectivamente. Este análisis se llevó a cabo solamente en las regiones de corteza parietal, corteza frontal y giro cingulado, que resultaron ser las que presentaron mayor aumento del número de proteínas modificadas por NKT con la edad.

Los niveles de oligómeros solubles detectados por el anticuerpo A11 (figura 22A) y de NKT (figura 22B) se exploraron mediante *slot-blot* y análisis densitométrico, empleando la proteína total detectada con Ponceau-S como control de carga. Estos niveles se compararon entre los grupos de edad en cada región utilizando la prueba *t* de Student. El nivel de oligómeros solubles fue significativamente mayor en el grupo de AE respecto al de ME en las cortezas parietal ($t = -2.83$, $p < 0.01$) y frontal ($t = -3.98$, $p < 0.001$), mientras que no se encontraron diferencias significativas en el giro cingulado. Con respecto al NKT, solo se encontraron niveles significativamente mayores con la edad en la corteza frontal ($t = -3.32$, $p < 0.005$). El mismo patrón se encontró cuando se analizaron estos datos para relaciones continuas con la edad (correlación de Pearson), es decir, sin dividir arbitrariamente la muestra en grupos de edad. Se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre el nivel de oligómeros y la edad en las cortezas parietal ($r = 0.52$, $p < 0.045$) y frontal ($r = 0.65$, $p < 0.008$); y entre el nivel de NKT total y la edad en la corteza frontal ($r = 0.57$, $p < 0.025$). No se encontró ninguna correlación significativa de estos marcadores con la edad en el giro cingulado.

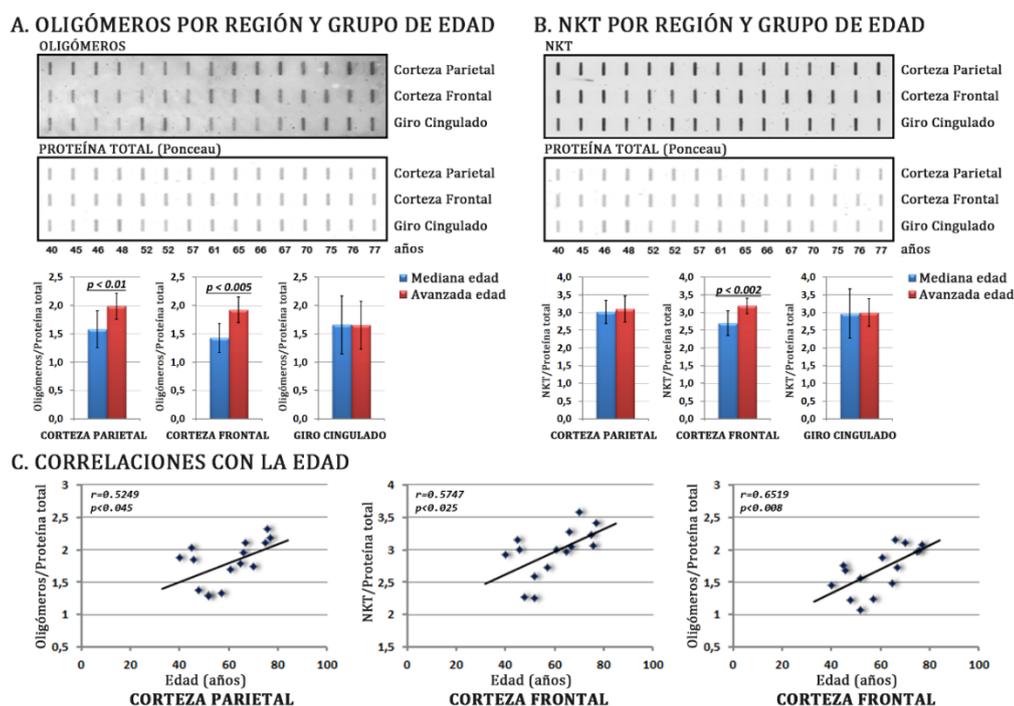
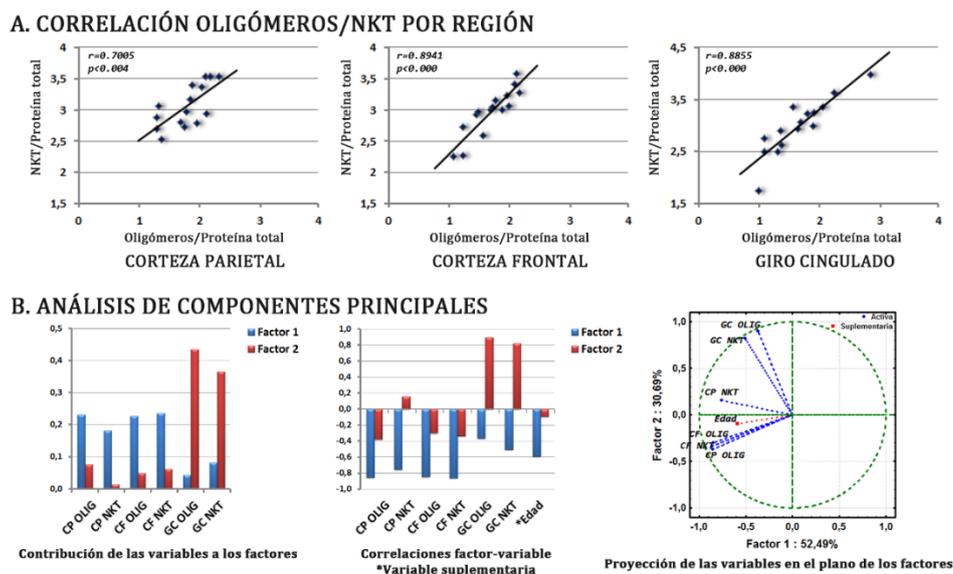


Figura 22. Detección de oligómeros solubles (anticuerpo A11) (A) y de NKT total (B) en la corteza parietal, la corteza frontal y el giro cingulado en individuos de mediana y avanzada edad. Las diferencias en sus niveles entre grupos de edad se analizaron con la prueba *t* de Student. Existe una correlación positiva entre el nivel de oligómeros y la edad en las cortezas parietal y frontal; y entre el de NKT y la edad en la corteza frontal (C).

Existió una correlación positiva y significativa entre los niveles de NKT total y de oligómeros solubles en todas estas regiones (corteza parietal: $r = 0.70$, $p < 0.004$; corteza frontal: $r = 0.89$, $p < 0.000$; giro cingulado: $r = 0.86$, $p < 0.000$) (figura 23A). Esta relación se confirmó, también, mediante un análisis de regresión múltiple a fin de controlar el posible efecto de confusión de la variable edad. Incluyó como variable dependiente el nivel de oligómeros y como variables independientes el nivel de NKT y la edad, en cada una de estas regiones. En todas ellas existió una correlación positiva significativa entre los niveles de oligómeros y de NKT independiente de la edad (corteza parietal: $R^2 = 0.56$, $F_{(2,13)} = 10.02$ $p < 0.003$, $\beta_{\text{NKT}} = 0.61$ $p < 0.006$, $\beta_{\text{edad}} = 0.38$ $p = 0.06$; corteza frontal: $R^2 = 0.80$, $F_{(2,13)} = 28.85$ $p < 0.00003$, $\beta_{\text{NKT}} = 0.78$ $p < 0.0002$, $\beta_{\text{edad}} = 0.21$ $p = 0.18$; giro cingulado: $R^2 = 0.75$, $F_{(2,13)} = 22.49$ $p < 0.00009$, $\beta_{\text{NKT}} = 0.87$ $p < 0.00003$, $\beta_{\text{edad}} = 0.07$ $p = 0.59$).

Para reducir la dimensionalidad y preservar la máxima cantidad de información posible para inferir asociaciones significativas entre variables, se utilizó un análisis de componentes principales, incluyendo niveles de oligómeros y NKT total para cada región como variables activas y la edad como variable suplementaria (figura 23B). Dos componentes principales explicaron el 83.18 % de la varianza en los datos, el primer componente (factor 1: 52.49 % de la varianza) con una alta contribución de información de los niveles de oligómeros y NKT en las cortezas y el segundo componente (factor 2: 30.69 % de la varianza) con información de los niveles de oligómeros y NKT en el giro cingulado. Ambos factores se correlacionaron negativamente con la edad, sin embargo, el factor 1 mostró una relación más estrecha que el factor 2. La proyección de las variables en el plano de los factores resume esta información, mostrando la estrecha relación entre niveles de oligómeros solubles y NKT, con la edad y entre regiones en las cortezas, y el patrón más distante de relación entre oligómeros y NKT en el giro cingulado.



2. Lipoxidación proteica global con el envejecimiento en el cerebro

Los niveles globales de aducción de proteínas por productos de PL (NKT y MDA) se exploraron mediante *Western-blot* y cuantificación densitométrica relativa a los niveles de β -actina empleando todas las muestras disponibles en cada una de las regiones del cerebro en análisis. Las diferencias respecto a la edad, en cada región, se evaluaron comparando estadísticamente los niveles estimados de estos marcadores entre los grupos de edad: ME (media 47.1 ± 5.7 años, $n = 9$) y AE (media 70.7 ± 6.3 años, $n = 9$). Se utilizó la prueba t de Student para los datos normales, y la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para los no normales.

2.1. Cambios en la aducción proteica por NKT con la edad en el cerebro

La aducción de proteínas por NKT y la comparación estadística de sus niveles globales ente grupos de edad en cada región cerebral se presentan en la figura 24 (detalles estadísticos en el anexo 2). En comparación con el grupo de ME, hubo un aumento significativo de los niveles de proteínas aducidas por NKT en el grupo de AE en tres regiones cerebrales: corteza frontal ($p < 0.02$, figura 24A), corteza visual ($p < 0.03$, figura 24J), y sustancia nigra ($p < 0.05$, figura 24K). El patrón inverso se encontró en tálamo, donde existe una disminución significativa de la aducción por NKT en el grupo de AE con respecto al grupo de ME ($p < 0.001$, figura 24G). Aunque no fue estadísticamente significativo, la misma tendencia se encontró en el núcleo caudado, disminución de los niveles totales de NKT en el grupo de AE ($p = 0.069$, figura 24H).

2.2. Cambios en la aducción proteica por MDA con la edad en el cerebro

El análisis de los niveles totales de aducción de proteínas por MDA en las regiones cerebrales exploradas y sus comparaciones estadísticas entre grupos de edad se muestran en la figura 25 (detalles estadísticos en el anexo 3). Varias regiones mostraron niveles aumentados de aducción de proteínas por MDA en los sujetos de AE respecto a los sujetos de ME: corteza frontal ($p < 0.000$, figura 25A), corteza parietal ($p < 0.000$, figura 25B), hipocampo $p < 0.03$, figura 25F), tálamo ($p < 0.001$, figura 25G) y putamen ($p < 0.001$, figura 25I). Esta misma tendencia se encontró en el núcleo caudado pero los valores no alcanzaron significación estadística ($p = 0.064$, figura 25H). Por el contrario, se encontró una disminución significativa en los niveles de MDA en los individuos de AE con respecto a los casos de ME en las cortezas temporal ($p < 0.04$, figura 25D) y entorrinal ($p < 0.001$, figura 25E).

De manera general, la variación con la edad en los niveles de proteínas modificadas por MDA muestra una amplia representación regional en el cerebro. En contraste, las diferencias en los niveles de aducción por NKT en función de la edad presentan un patrón regional discreto. A destacar, la corteza frontal muestra un aumento con la edad en la aducción de proteínas por NKT y MDA congruente.

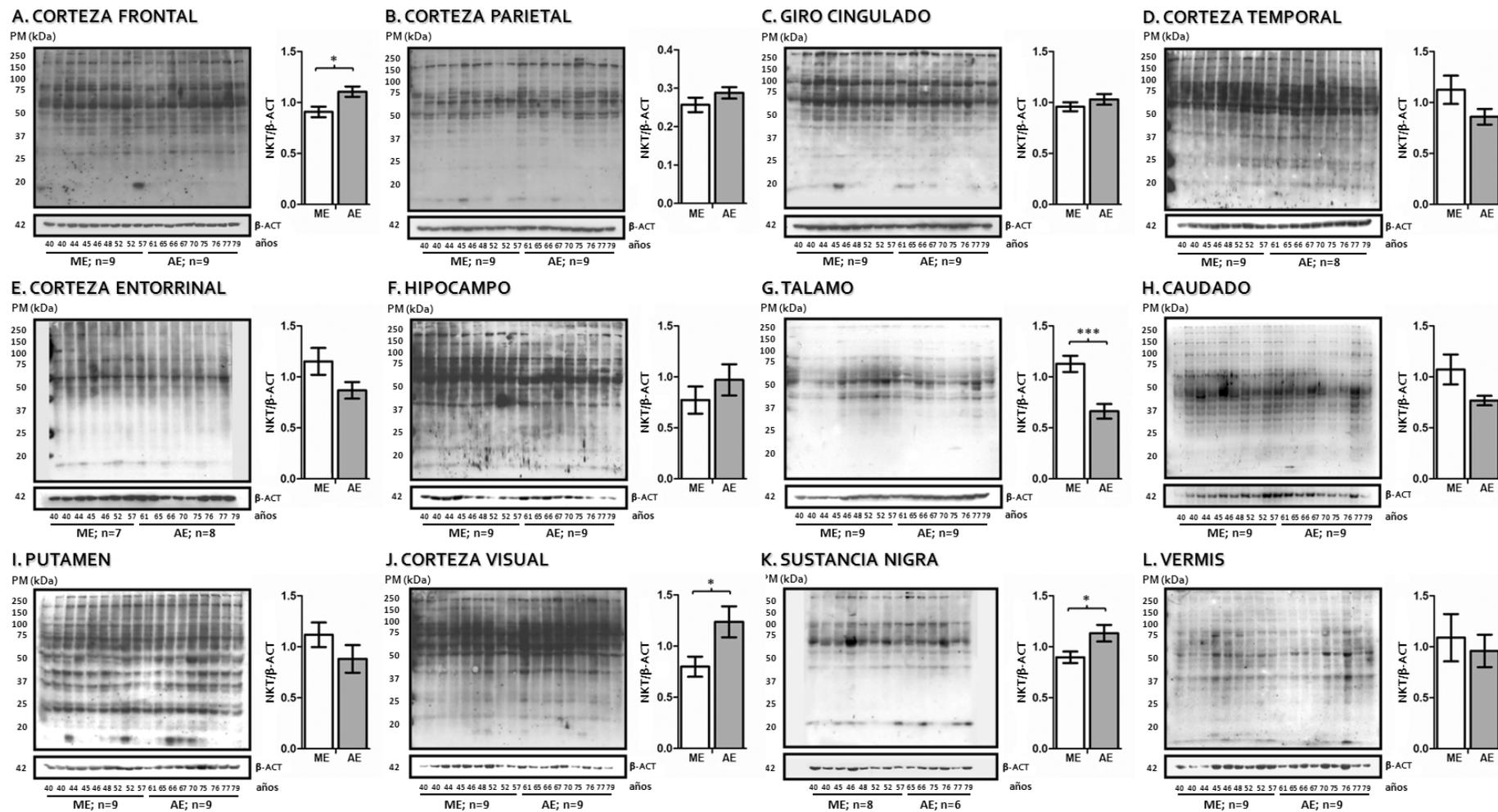


Figura 24. Niveles globales de proteínas modificadas por NKT en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de la carga. Se utilizó la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, a conveniencia, para evaluar las diferencias entre los grupos de edad. Los valores medios \pm error estándar por grupo de edad se muestran gráficamente. Los asteriscos indican diferencias significativas con * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$.

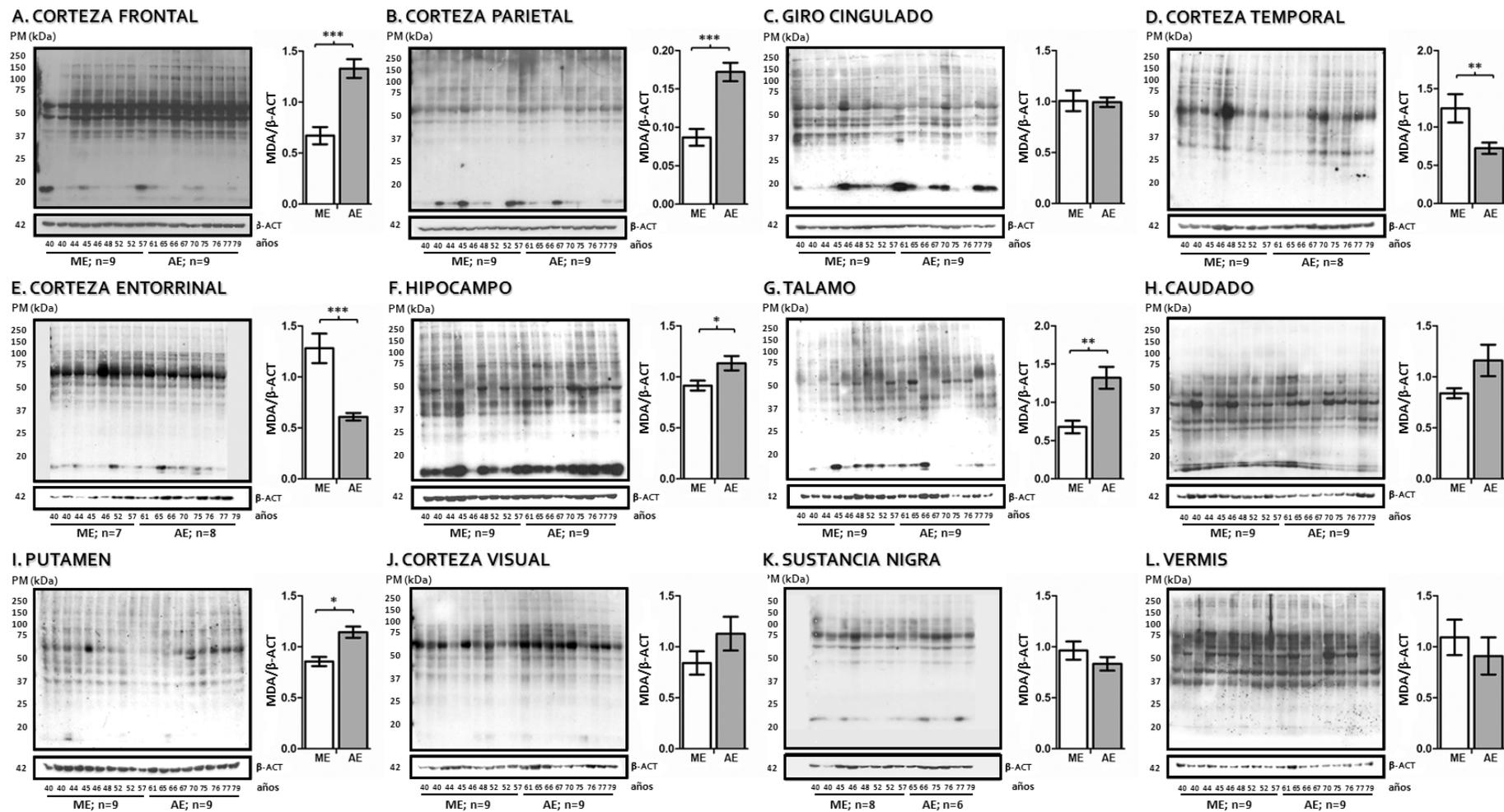


Figura 25. Niveles globales de proteínas modificadas por MDA en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de la carga. Se utilizó la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, a conveniencia, para evaluar las diferencias entre los grupos de edad. Los valores medios \pm error estándar por grupo de edad se muestran gráficamente. Los asteriscos indican diferencias significativas con * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

3. Cambios en los niveles de COX-2 y CYP2J2 con la edad en el cerebro y relación con los productos de peroxidación lipídica NKT y MDA

El daño oxidativo y la neuroinflamación coexisten en el envejecimiento del cerebro humano; posibles puntos de unión entre estos procesos podrían hallarse en la relación de los productos de PL y enzimas mediadoras de la respuesta inflamatoria a partir de ácidos grasos. Las variaciones con la edad de dos de estas proteínas (COX-2 y CYP2J2) y sus relaciones con los niveles globales de NKT y MDA se exploraron en las 12 regiones cerebrales en estudio.

3.1. Niveles de COX-2 y CYP2J2 con la edad en el cerebro

Los niveles de la proteína COX-2 fueron significativamente mayores en el grupo de AE respecto al de ME en corteza frontal ($p < 0.002$), corteza parietal ($p < 0.001$), corteza temporal ($p < 0.001$), hipocampo ($p < 0.01$) y sustancia nigra ($p < 0.01$). No se encontró una disminución de la expresión de COX-2 con la edad en ninguna de las regiones exploradas. Estos resultados se ilustran en la figura 26 (detalles estadísticos en el anexo 4).

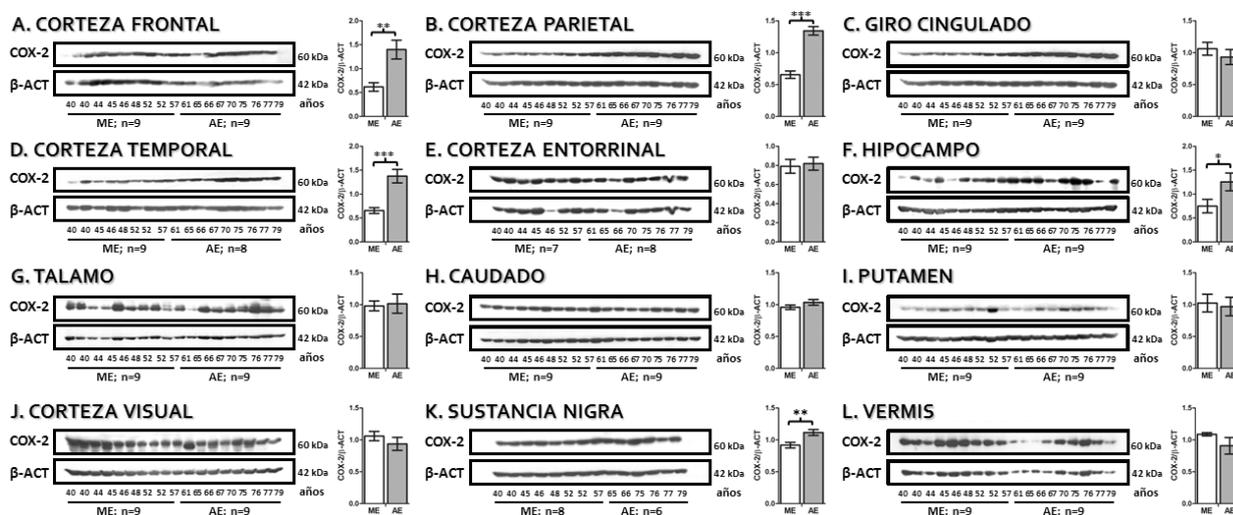


Figura 26. Niveles de la proteína COX-2 en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de la carga. Se utilizó la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, a conveniencia, para evaluar las diferencias entre los grupos de edad. Los valores medios \pm error estándar por grupo de edad se muestran gráficamente. Los asteriscos indican diferencias significativas con * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Por su parte, los niveles de la proteína CYP2J2 fueron significativamente menores en el grupo de AE respecto al de ME en la corteza frontal ($p < 0.004$), corteza temporal ($p < 0.01$), hipocampo ($p < 0.02$) y tálamo ($p < 0.007$). Se encontró un aumento de la expresión de CYP2J2 con la edad en el núcleo caudado ($p < 0.006$). Estos resultados se ilustran en la figura 27 (detalles estadísticos en el anexo 5).

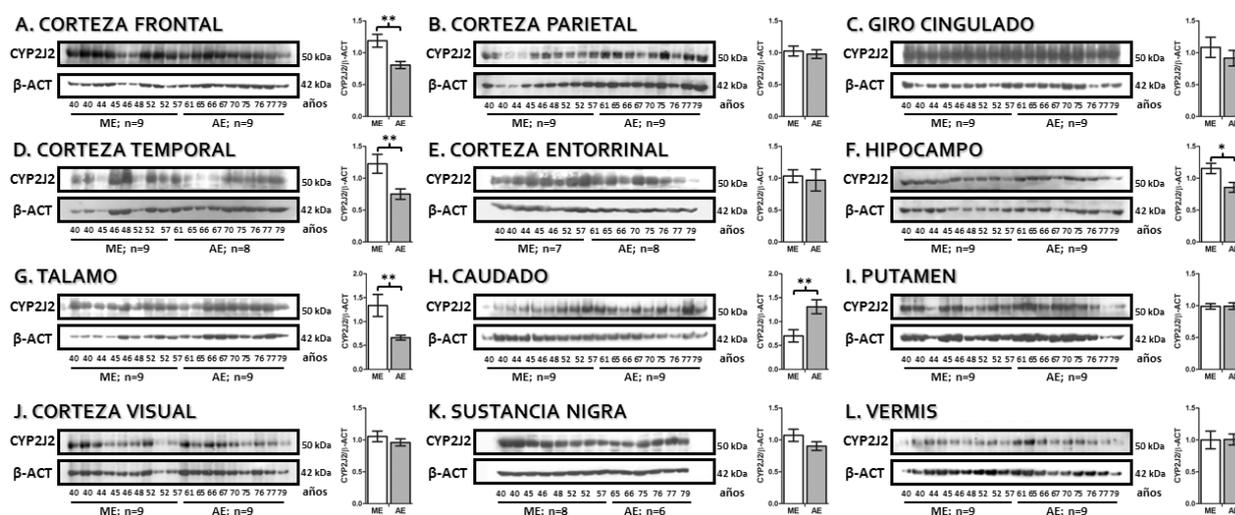


Figura 27. Niveles de la proteína CYP2J2 en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de la carga. Se utilizó la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, a conveniencia, para evaluar las diferencias entre los grupos de edad. Los valores medios \pm error estándar por grupo de edad se muestran gráficamente. Los asteriscos indican diferencias significativas con ** $p < 0.01$.

3.2. Relaciones entre los niveles de COX-2, CYP2J2 y los de los productos de peroxidación lipídica NKT y MDA en el cerebro

Como una primera aproximación se exploró la relación entre los niveles proteicos de COX-2 y CYP2J2 y el de los productos de peroxidación lipídica NKT y MDA en el cerebro mediante correlaciones. Se utilizó la correlación de Pearson para los datos normales y la correlación de rangos de Spearman para las variables no normales.

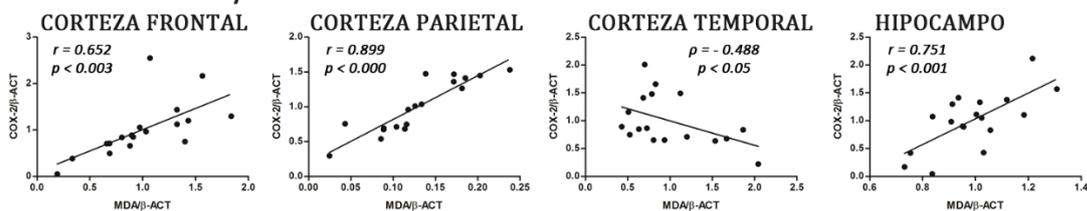
No se detectaron correlaciones significativas entre los niveles de NKT y los de COX-2 en ninguna de las regiones exploradas. Sin embargo, el nivel de MDA y el de COX-2 mostraron correlaciones positivas significativas en la corteza frontal ($r = 0.652$, $p < 0.003$), la corteza parietal ($r = 0.899$, $p < 0.001$) y el hipocampo ($r = 0.751$, $p < 0.001$), y una correlación negativa en la corteza temporal ($\rho = -0.488$, $p < 0.05$) (figura 28A).

Se detectaron correlaciones significativas entre los productos finales de PL y la proteína CYP2J2 solo en la corteza frontal. Estas fueron correlaciones negativas significativas entre los marcadores NKT ($r = 0.604$, $p < 0.001$) y MDA ($r = 0.706$, $p < 0.01$), y CYP2J2 en esta región (figura 28B).

No obstante, dado que muchas de estas relaciones pueden deberse a las variaciones con la edad detectadas en estas moléculas, se exploraron además mediante análisis de regresión múltiple. En cada una de las regiones, se probaron modelos de regresión para los niveles de COX-2 considerando los de NKT y la edad, y los de MDA y la edad (detalles estadísticos en el anexo 6); asimismo, los niveles de CYP2J2 considerando los de NKT y la edad, y los de MDA y la edad (detalles estadísticos en el anexo 7). De esta manera, se detectó que independientemente de la

edad solo se predice significativamente el nivel de COX-2 a partir del nivel de MDA en hipocampo ($\beta_{\text{MDA}} = 0.55$, $p < 0.01$); explicando este modelo un 40 % de la varianza de los datos ($R^2 = 0.40$, $F_{(2,15)} = 6.67$, $p < 0.008$).

A. Relaciones ALE / COX-2



B. Relaciones ALE / CYP2J2

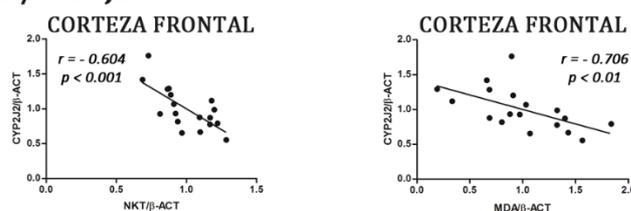


Figura 28. Gráficos de dispersión por región que muestran las correlaciones significativas entre los marcadores evaluados. (A) Relaciones entre los productos finales de peroxidación lipídica (ALE: *advanced lipoxidation end-products*) y COX-2. (B) Relaciones entre los productos finales de peroxidación lipídica y de CYP2J2. Se empleó análisis de correlación de Pearson en corteza frontal, corteza parietal e hipocampo; y correlación de rango de Spearman para los datos no normales de corteza temporal.

Se realizó, además, un análisis de componentes principales para explorar el perfil de agrupación de las regiones cerebrales de acuerdo a los niveles de NKT, MDA, COX-2 y CYP2J2, y la edad (figura 29). La corteza entorrinal y la sustancia nigra se excluyeron de este análisis debido a su limitado número de casos.

Empleando dos componentes (factores) principales fue posible explicar el 53.34 % de la varianza presente en los datos para el NKT, el 60.27 % para el MDA, el 54.25 % para la COX-2 y el 51.90% para el CYP2J2, siendo el MDA el marcador más informativo de variación respecto a la edad.

La proyección de las variables (marcador en cada región) en el plano de estos factores mostró para el NKT que las relaciones positivas con la edad más cercanas se produjeron para la corteza frontal y la corteza visual, sin una agrupación evidente de las regiones (figura 29A). En el caso del MDA, se encontraron relaciones positivas estrechas con la edad y en su comportamiento en las regiones corteza frontal, corteza parietal, hipocampo, tálamo, putamen y corteza visual (figura 29B). Para la COX-2, existió una estrecha relación positiva con la edad y entre regiones en la corteza frontal, la corteza parietal, la corteza temporal y el hipocampo (figura 29C). Para CYP2J2 la relación positiva más cercana con la edad se produjo en el núcleo caudado (figura 29D).

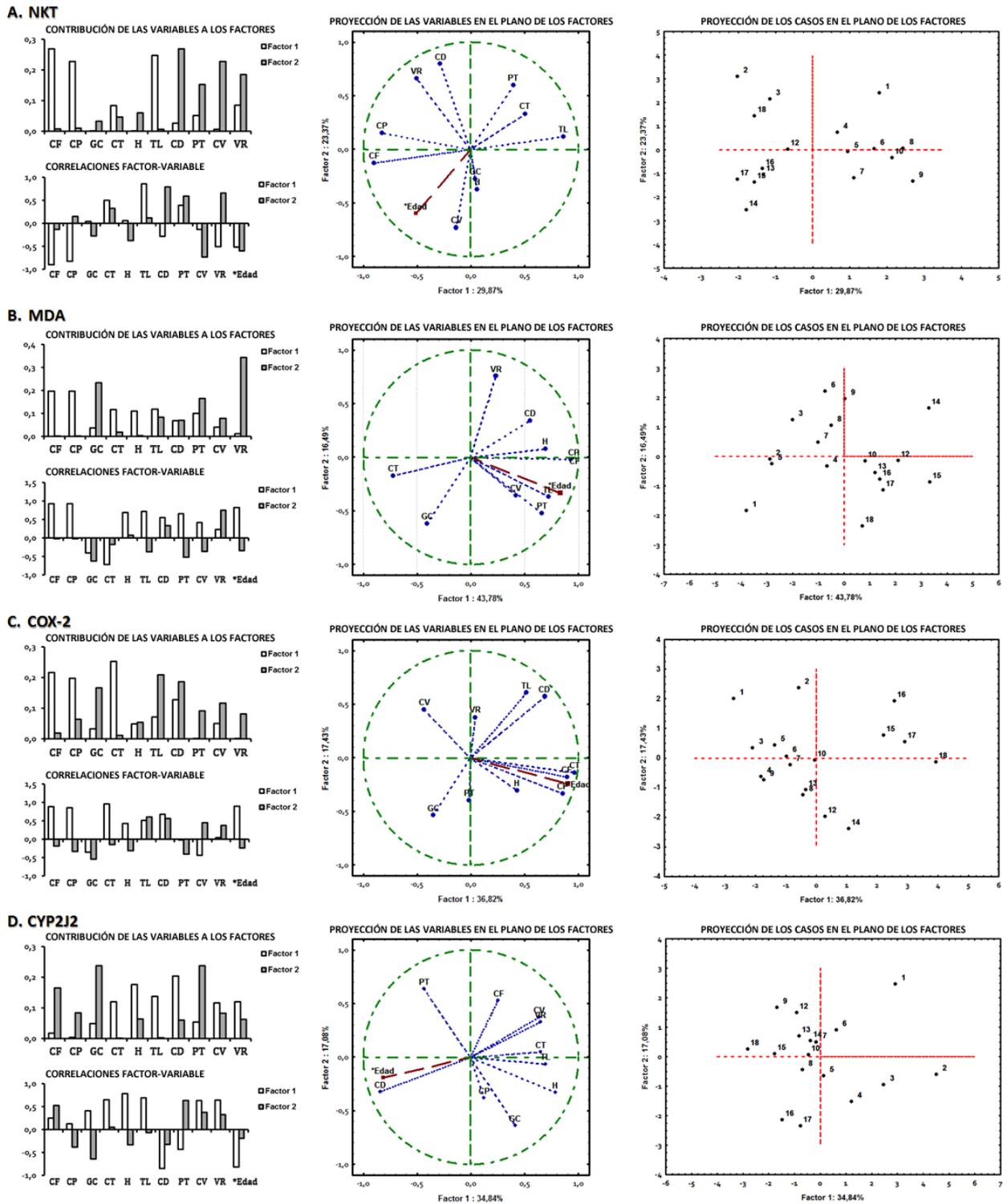


Figura 29. Análisis de componentes principales para los niveles de NKT (A), MDA (B), COX-2 (C) y CYP2J2 (D) en el cerebro con la edad, incluyendo varianza, contribución de las variables a los factores y las correlaciones entre variables y factores. Las relaciones entre las variables y la distribución de los casos se presentan gráficamente como proyección de las variables en el plano de los factores y proyección de los casos en el plano de los factores, respectivamente. CF: corteza frontal, CP: corteza parietal, GC: cíngulo giro, CT: corteza temporal, H: hipocampo, TL: tálamo, CD: núcleo caudado, PT: putamen, CV: corteza visual y VR: vermis.

4. Glicosidación proteica con el envejecimiento en el cerebro

Los niveles globales de modificación de proteínas por productos de glicosidación (CEL y CML) se exploraron mediante *Western-blot* y cuantificación densitométrica relativa a los niveles de β -actina. Se compararon las diferencias en cada región de sus niveles entre los grupos de edad previamente descritos (ME y AE). Se empleó la prueba t de Student para los datos normales, y la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para los no normales.

4.1. Cambios en los niveles de CEL con la edad en el cerebro

Los niveles de CEL en cada una de las regiones cerebrales y sus comparaciones estadísticas entre grupos de edad se muestran en la figura 30 (detalles estadísticos en el anexo 8). Solo se detectaron aumentos de los niveles de CEL en las proteínas con la edad; lo cual ocurrió en cuatro de las regiones exploradas: corteza frontal ($p < 0.002$, figura 30A), corteza temporal ($p < 0.01$, figura 30D), núcleo caudado ($p < 0.01$, figura 30H) y vermis ($p < 0.000$, figura 30L).

4.2. Cambios en los niveles de CML con la edad en el cerebro

La presencia de CML en proteínas y la comparación estadística de sus niveles entre grupos de edad en cada región cerebral se presentan en la figura 31 (detalles estadísticos en el anexo 9). Se detectó un aumento de sus niveles con la edad en corteza frontal ($p < 0.01$, figura 31A), corteza parietal ($p < 0.002$, figura 31B), giro cingulado ($p < 0.005$, figura 31C) y corteza visual ($p < 0.01$, figura 31J). Por su parte, el hipocampo mostró una disminución significativa de los niveles de CML en proteínas para el grupo de AE respecto al de ME ($p < 0.02$, figura 31F).

El análisis de componentes principales de estos marcadores para todas las regiones (excluyendo corteza entorrinal y la sustancia nigra) y la edad mostró que es posible explicar con dos factores principales el 51.27 % en el caso del CEL y el 56.30 % en el del CML (figura 32). La proyección de las variables en el plano de los factores muestra que para el CEL las relaciones positivas más cercanas con la edad la presentan la corteza temporal y el núcleo caudado, y para el CML las cortezas parietal y visual, sin una agrupación evidente de las regiones.

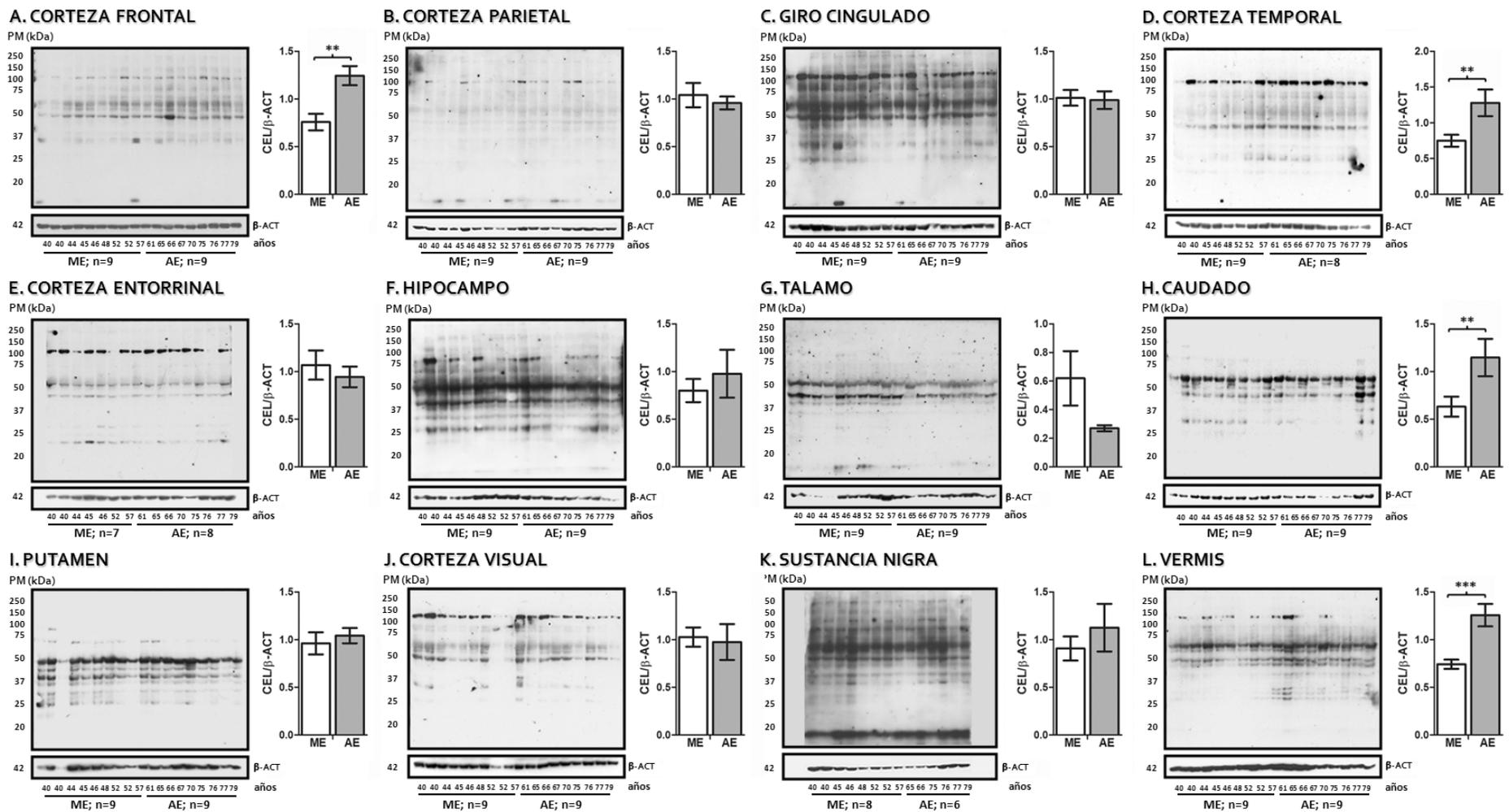


Figura 30. Niveles de CEL en proteínas en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de la carga. Se utilizó la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, a conveniencia, para evaluar las diferencias entre los grupos de edad. Los valores medios \pm error estándar por grupo de edad se muestran gráficamente. Los asteriscos indican diferencias significativas con ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

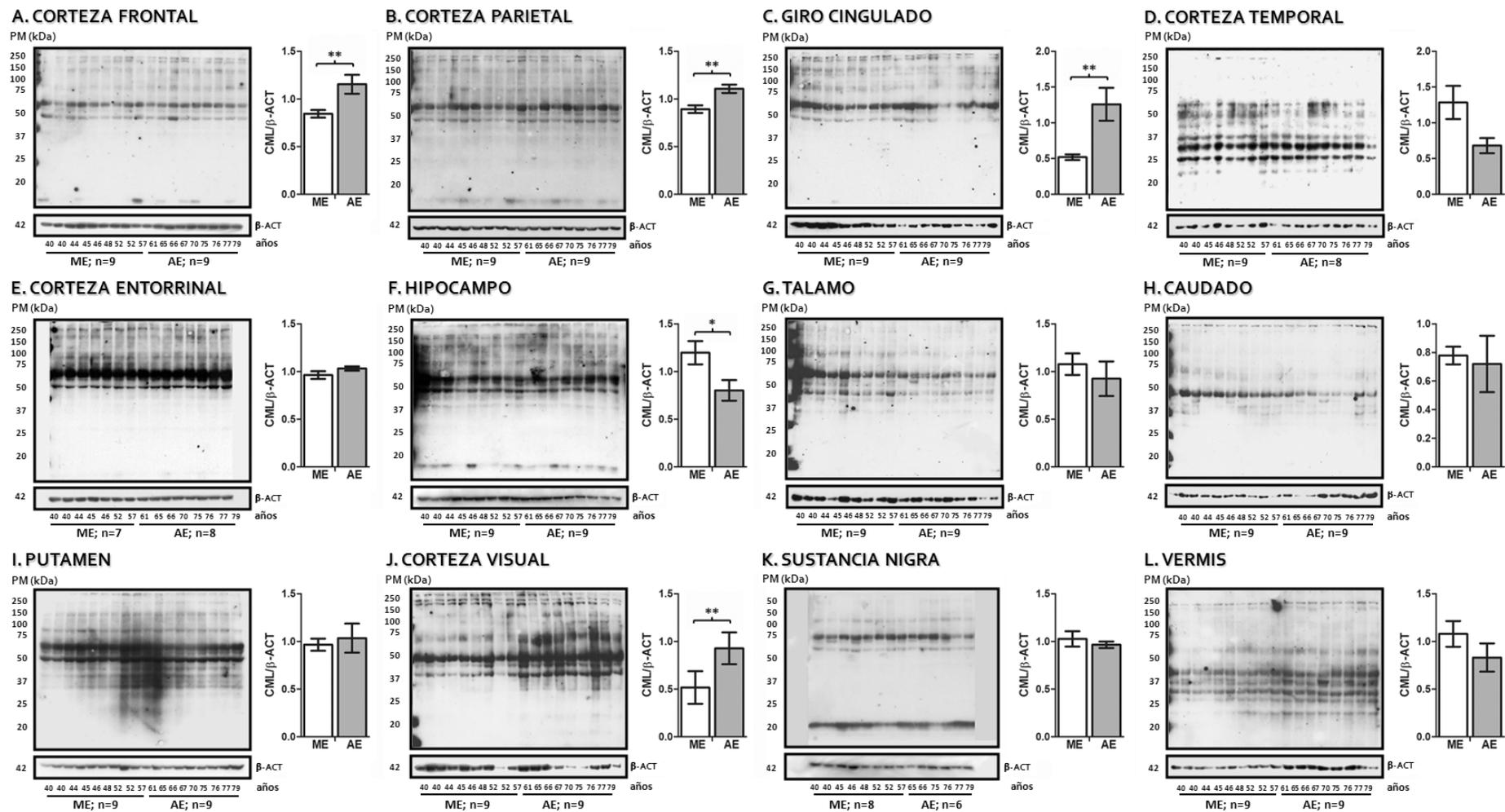


Figura 31. Niveles de CML en proteínas en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de la carga. Se utilizó la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, a conveniencia, para evaluar las diferencias entre los grupos de edad. Los valores medios \pm error estándar por grupo de edad se muestran gráficamente. Los asteriscos indican diferencias significativas con ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

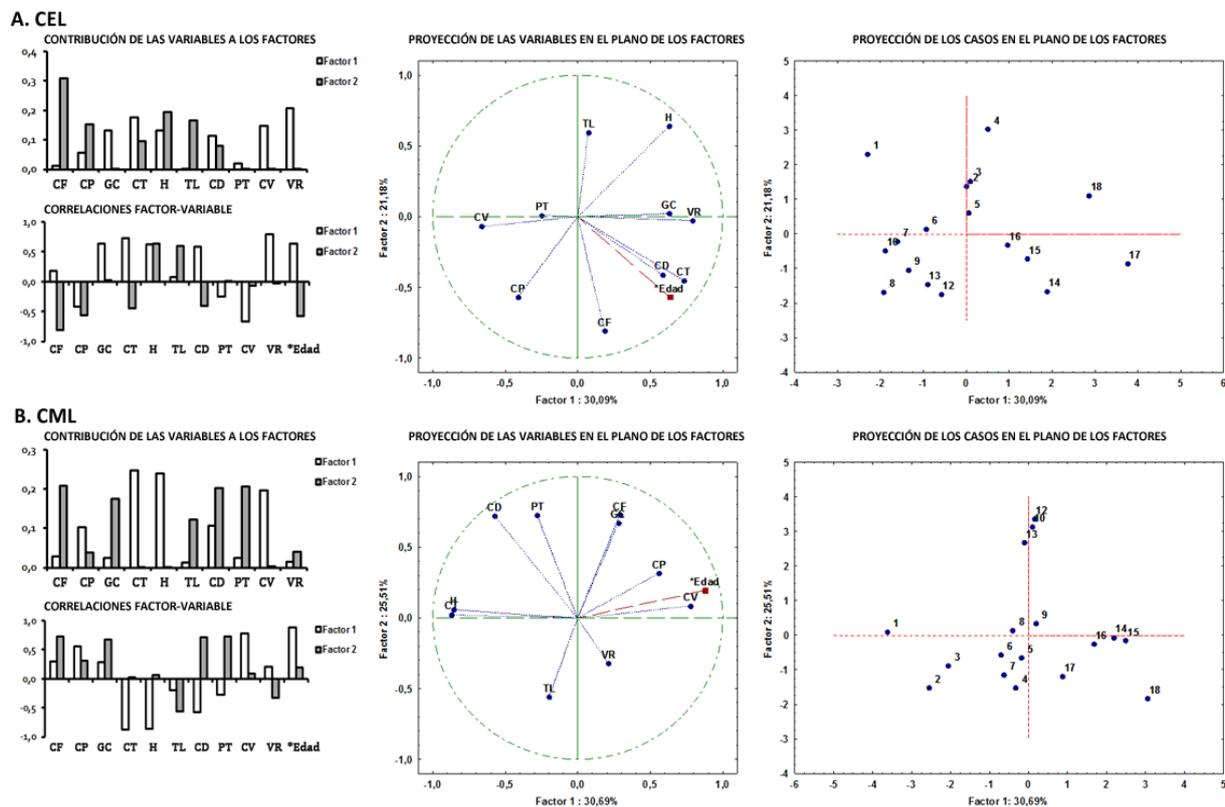


Figura 32. Análisis de componentes principales para los niveles de CEL (A) y CML (B), en el cerebro con la edad, incluyendo varianza, contribución de las variables a los factores y las correlaciones entre variables y factores. Las relaciones entre las variables y la distribución de los casos se presentan gráficamente como proyección de las variables en el plano de los factores y proyección de los casos en el plano de los factores, respectivamente. CF: corteza frontal, CP: corteza parietal, GC: cíngulo giro, CT: corteza temporal, H: hipocampo, TL: tálamo, CD: núcleo caudado, PT: putamen, CV: corteza visual y VR: vermis.

Es de mencionar que el CEL y el CML pueden generarse a partir de carbonilos reactivos como el glioxal y el metilglioxal, los cuales son generados por la oxidación de azúcares, pero también de lípidos. En este sentido, varias regiones muestran aumentos con la edad coincidentes de marcadores de lipoxidación y glicoxidación: corteza frontal (NKT, MDA, CEL y CML), corteza parietal (MDA y CML), corteza visual (NKT y CML). Sin embargo, varias regiones mostraron aumentos con la edad en sus marcadores de glicoxidación no coincidentes con variaciones en los marcadores de lipoxidación (giro cíngulo, corteza temporal, núcleo caudado y vermis); quizás más relacionados con la oxidación de carbohidratos. En particular, hipocampo mostró un aumento con la edad de los niveles de lipoxidación por MDA con una disminución del marcador de glicoxidación CEL.

5. Variaciones en los niveles de componentes del sistema de defensa antioxidante con el envejecimiento en el cerebro

Los niveles de diferentes proteínas implicadas en la defensa antioxidante (SOD1, SOD2, CAT, GPX4, TRX1 y Nrf2) se exploraron mediante *Western-blot* y

cuantificación densitométrica relativa a los niveles de β -actina. Se compararon las diferencias en cada región de sus niveles entre los grupos de edad previamente descritos (ME y AE). Se empleó la prueba t de Student para los datos normales, y la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para los no normales.

Los niveles de SOD1 detectados por *Western-blot* y su comparación estadística entre grupos de edad en cada región cerebral se muestran en la figura 33 (detalles estadísticos en el anexo 10). Existió un aumento significativo de los niveles de SOD1 en el grupo de AE respecto al de ME en seis de las regiones exploradas: hipocampo ($p < 0.02$, figura 33F), tálamo ($p < 0.005$, figura 33G), caudado ($p < 0.000$, figura 33H), putamen ($p < 0.000$, figura 33I), corteza visual ($p < 0.05$, figura 33J) y sustancia nigra ($p < 0.02$, figura 33K). No se detectó una disminución significativa con la edad de los niveles de SOD1 en ninguna de las regiones exploradas.

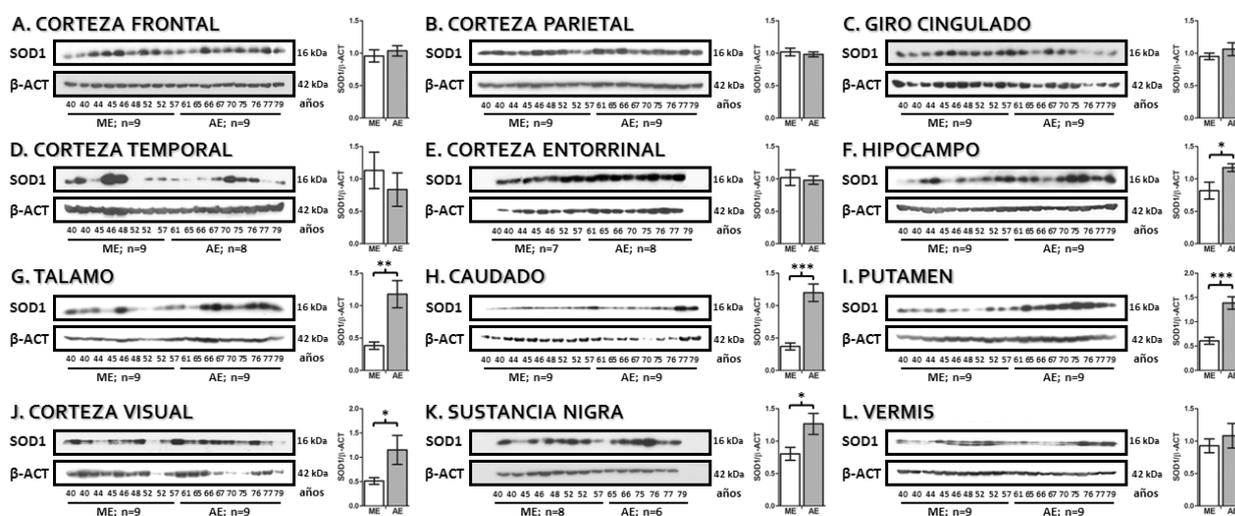


Figura 33. Niveles de SOD1 en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de carga. Se muestran gráficamente los valores medios \pm error estándar por grupo de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad se indican con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Los niveles de SOD2 detectados en cada región cerebral y su comparación estadística entre grupos de edad se muestran en la figura 34 (detalles estadísticos en el anexo 11). Se encontró un aumento significativo en los niveles de SOD2 en el grupo de AE respecto al de ME en cinco de las regiones exploradas: corteza parietal ($p < 0.008$, figura 34B), corteza entorrinal ($p < 0.02$, figura 34E), hipocampo ($p < 0.02$, figura 34F), putamen ($p < 0.001$, figura 34I) y corteza visual ($p < 0.001$, figura 34J). Dos regiones mostraron una disminución significativa con la edad en los niveles de SOD2: corteza temporal ($p < 0.04$, figura 34D) y sustancia nigra ($p < 0.02$, figura 34K).

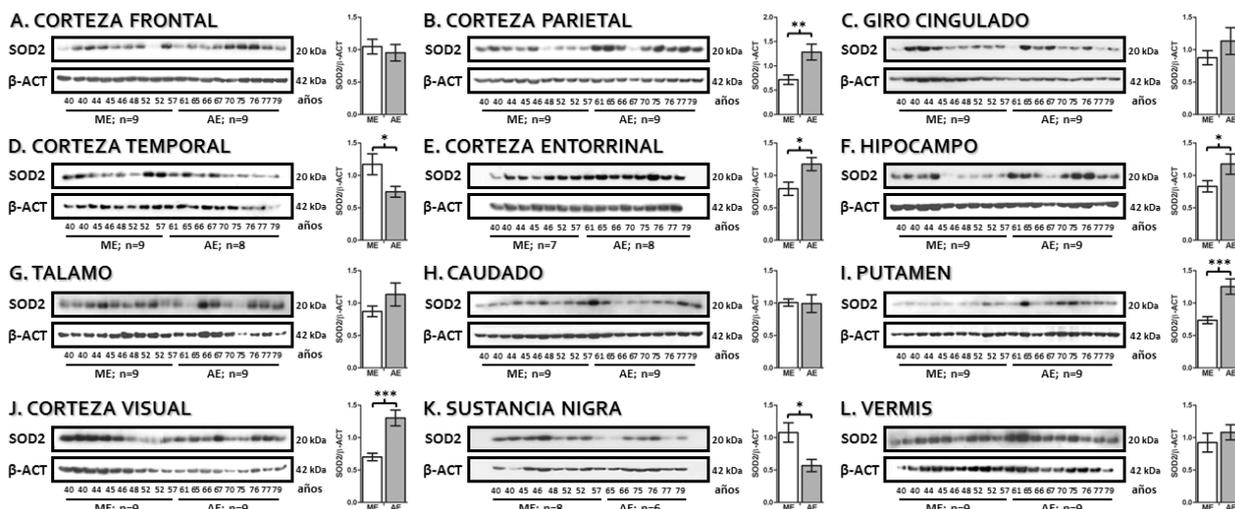


Figura 34. Niveles de SOD2 en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de carga. Se muestran gráficamente los valores medios \pm error estándar por grupo de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad se indican con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Los niveles de catalasa detectados en las regiones cerebrales exploradas y sus comparaciones entre grupos de edad se muestran en la figura 35 (detalles estadísticos en el anexo 12). Existió un aumento de sus niveles con la edad en la muestra estudiada en la corteza temporal ($p < 0.03$, figura 35D) y la corteza visual ($p < 0.001$, figura 35J). Por el contrario, tres regiones mostraron una disminución de sus niveles en el grupo de AE respecto al de ME: tálamo ($p < 0.003$, figura 35G), caudado ($p < 0.01$, figura 35H) y sustancia nigra ($p < 0.03$, figura 35K).

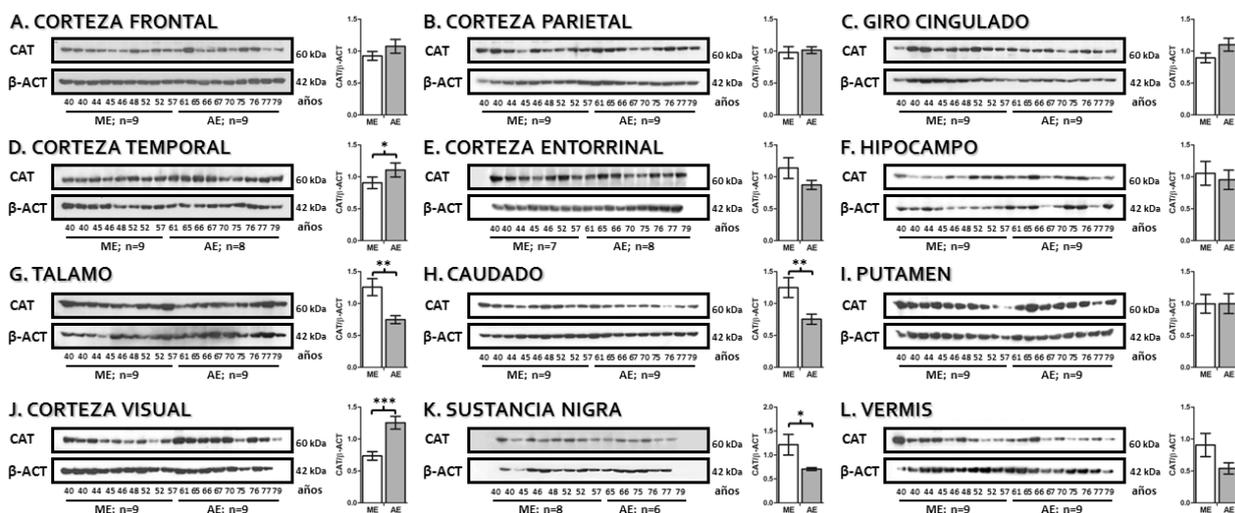


Figura 35. Niveles de catalasa en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de carga. Se muestran gráficamente los valores medios \pm error estándar por grupo de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad se indican con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Los niveles de GPX4 detectados por *Western-blot* y su comparación estadística entre grupos de edad en cada región cerebral se muestran en la figura 36 (detalles estadísticos en el anexo 13). Existió un aumento significativo de los niveles de GPX4 en el grupo de AE respecto al de ME en seis de las regiones exploradas: corteza frontal ($p < 0.01$, figura 36A), corteza entorrinal ($p < 0.001$, figura 36E), hipocampo ($p < 0.03$, figura 36F), tálamo ($p < 0.01$, figura 36G), corteza visual ($p < 0.03$, figura 36J) y vermis ($p < 0.004$, figura 36L). No se detectó una disminución significativa de sus niveles con la edad en ninguna de las regiones exploradas.

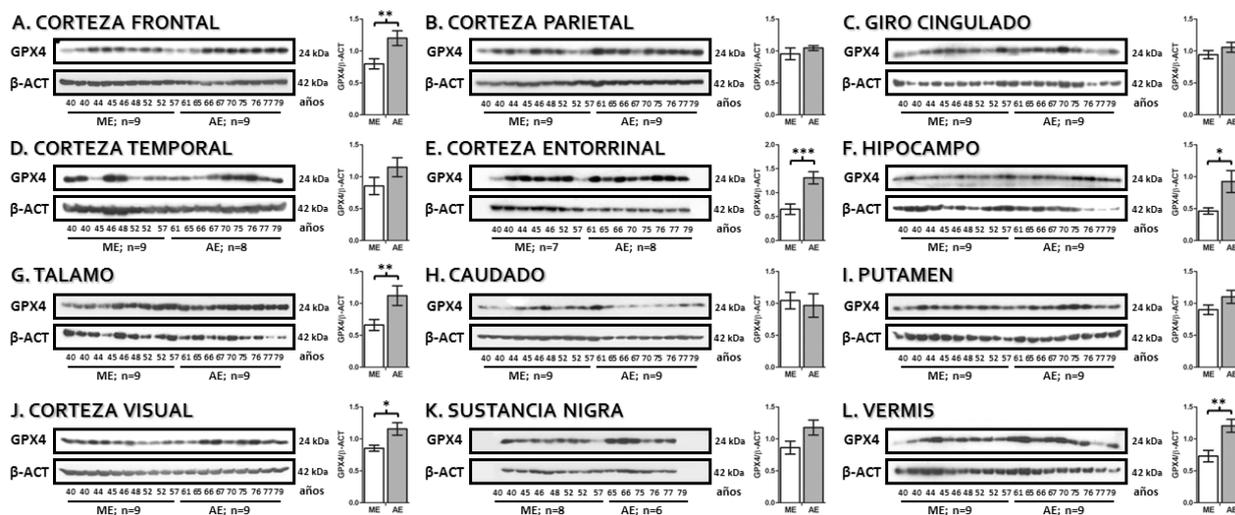


Figura 36. Niveles de GPX4 en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de carga. Se muestran gráficamente los valores medios \pm error estándar por grupo de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad se indican con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Los niveles de TRX1 detectados mediante *Western-blot* en cada región cerebral y su comparación estadística entre grupos de edad se muestran en la figura 37 (detalles estadísticos en el anexo 14). Se encontró un aumento significativo en los niveles de TRX1 en el grupo de AE respecto al de ME en la sustancia negra ($p < 0.02$, figura 37K). Por el contrario, cuatro regiones de corteza mostraron una disminución significativa de sus niveles con la edad: frontal ($p < 0.000$, figura 37A), parietal ($p < 0.005$, figura 37B), temporal ($p < 0.002$, figura 37D) y entorrinal ($p < 0.01$, figura 37E).

El factor de transcripción Nrf2 es reconocido como un regulador crítico en la respuesta al estrés celular. Es posible detectar esta proteína alrededor de 55-65 kDa (peso teórico estimado) tras resolverla en SDS-PAGE; sin embargo, es posible detectarla también sobre los 95-110 kDa (con frecuencia un doblete), variante que se ha descrito como la biológicamente relevante (Lau et al., 2012). Adicionalmente, el Nrf2 es sustrato de caspasas generando un péptido de 50 kDa y otro de 30 kDa; este último (fragmento C-terminal) puede inhibir la actividad transcripcional de Nrf2 en forma dosis-dependiente, además de actuar como molécula efectora *downstream* de caspasa-3 durante la apoptosis (Ohtsubo et al., 1999).

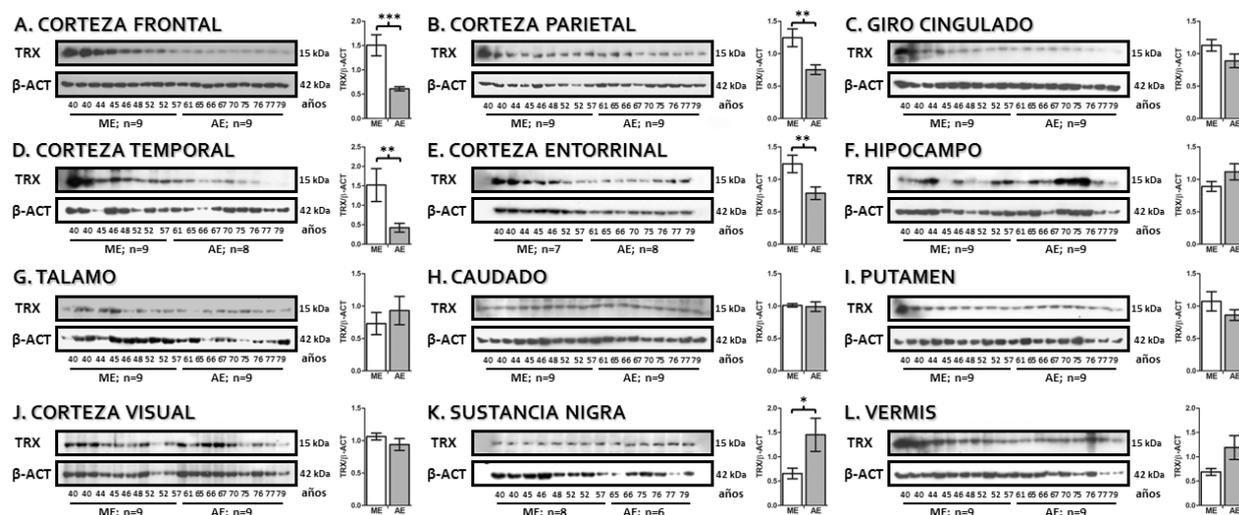


Figura 37. Niveles de TRX1 en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de carga. Se muestran gráficamente los valores medios \pm error estándar por grupo de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad se indican con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Fue posible detectar con el anticuerpo disponible para Nrf2 (ab3163, Abcam) las bandas previamente descritas. Se describen las bandas de ~ 100 , 65 y 30 kDa. Los niveles detectados mediante *Western-blot* en cada región cerebral y su comparación estadística entre grupos de edad se muestran en la figura 38 (detalles estadísticos en el anexo 15). Se detectó una disminución en el grupo de AE respecto al de ME en la banda biológicamente relevante de ~ 100 kDa en hipocampo ($p < 0.03$, figura 38F) y corteza visual ($p < 0.002$, figura 38J); por el contrario, tálamo ($p < 0.008$, figura 38G) mostró un aumento de sus niveles. A excepción de una disminución en hipocampo ($p < 0.01$, figura 38F), no se detectaron variaciones con la edad en la banda de 65 kDa. El fragmento C-terminal de 30 kDa mostró una disminución de sus niveles con la edad en las cortezas frontal ($p < 0.03$, figura 38A) y parietal ($p < 0.01$, figura 38B), y un aumento en la temporal ($p < 0.04$, figura 38D) y entorrinal ($p < 0.01$, figura 38E).

6. Variaciones en los niveles de componentes de la CTE y VDAC con el envejecimiento en el cerebro

La disfunción mitocondrial ha sido reiteradamente asociada al envejecimiento cerebral, por ello se exploró mediante *Western-blot* el contenido de mitocondrias estimado a partir de la porina VDAC empleando β -actina como control de carga y de componentes de los complejos de la CTE (CI-NDUFS3, CII-SDHA, CIII-UQCRC2, CIV-COX4 y CV-ATP5A1) empleando VDAC como control de carga. Se compararon las diferencias en cada región de sus niveles entre grupos de edad (ME y AE), empleando la prueba t de Student o la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, a conveniencia.

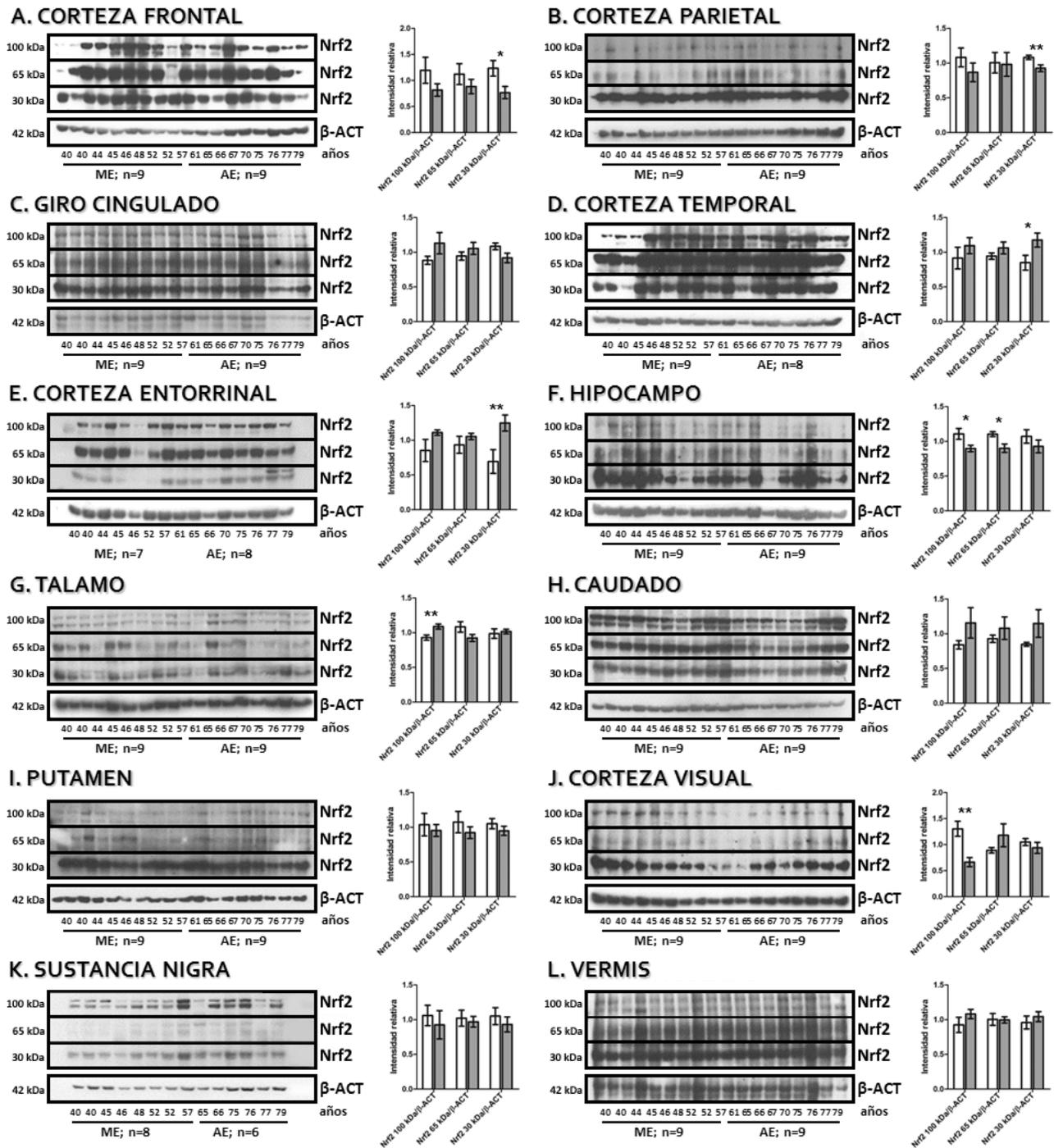


Figura 38. Niveles de Nrf2 en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β -actina como control de carga. Se muestran gráficamente los valores medios \pm error estándar por grupo de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos se indican con asteriscos: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Los niveles detectados de estas proteínas (complejos de la CTE y VDAC) en las regiones cerebrales exploradas y sus comparaciones entre grupos de edad se muestran en la figura 39 (detalles estadísticos en los anexos del 16 al 21).

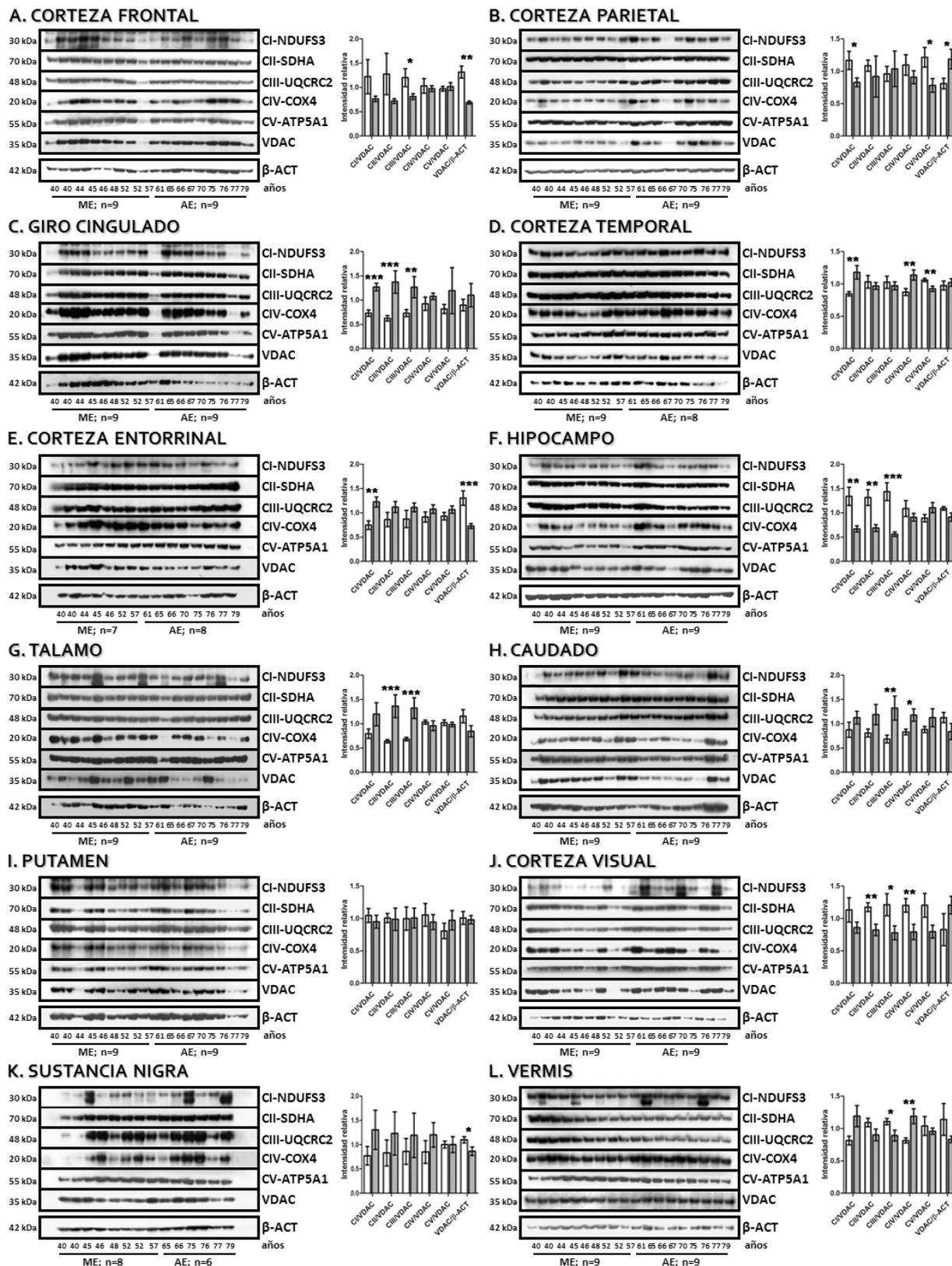


Figura 39. Niveles de VDAC y subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría. Se muestran gráficamente los valores medios \pm error estándar por grupo de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos se indican con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

El marcador de mitocondrias VDAC mostró una disminución estadísticamente significativa con la edad en tres de las regiones cerebrales exploradas: corteza frontal ($p < 0.004$, figura 39A), corteza entorrinal ($p < 0.001$, figura 39E) y sustancia nigra ($p < 0.04$, figura 39K). Se detectó un aumento en sus niveles en el grupo de ME respecto al de AE en la corteza parietal ($p < 0.04$, figura 39B).

En el caso de los complejos de las CTE mitocondrial se detectaron diferentes variaciones regionales en sus niveles con la edad. A excepción de en corteza temporal y vermis, las modificaciones detectadas para los mismos siguieron el mismo patrón (aumento o disminución) intrarregionalmente.

Existió una disminución estadísticamente significativa con la edad en los niveles de alguna de las subunidades de los complejos de la CTE en corteza frontal (CIII $p < 0.03$; figura 39A), corteza parietal (CI $p < 0.03$, CII $p < 0.007$, CV $p < 0.03$; figura 39B), corteza entorrinal (CI $p < 0.004$; figura 39E), hipocampo (CI $p < 0.01$, CII $p < 0.002$, CIII $p < 0.001$; figura 39F) y corteza visual (CII $p < 0.006$, CIII $p < 0.02$, CIV $p < 0.01$; figura 39J).

Tres regiones mostraron un aumento con la edad en los niveles de alguna de las subunidades de los complejos de la CTE mitocondrial: giro cingulado (CI $p < 0.000$, CII $p < 0.000$, CIII $p < 0.01$; figura 39C), tálamo (CII $p < 0.001$, CIII $p < 0.001$; figura 39G) y núcleo caudado (CIII $p < 0.009$, CIV $p < 0.02$; figura 39H).

En el caso de la corteza temporal (figura 39D) se detectó un aumento con la edad en los niveles de CI ($p < 0.006$) y CIV ($p < 0.01$), acompañado de una disminución en los niveles del CV ($p < 0.01$). Por su parte, vermis (figura 39L) mostró una disminución con la edad de CIII ($p < 0.04$) y un aumento de CIV ($p < 0.01$).

De manera general, existió una amplia variación con la edad en los niveles de los complejos mitocondriales del I al IV y poca en el CV (solo disminución en las cortezas parietal y temporal). Además, dos regiones no mostraron variaciones con la edad a nivel de complejos de la CTE mitocondrial: putamen y sustancia nigra.

7. Variaciones en los niveles de componentes de la vía NF- κ B con el envejecimiento en el cerebro

Se han descrito en el cerebro bajos niveles de inflamación crónica en el envejecimiento y en trastornos neurodegenerativos asociados. La vía del factor transcripcional NF- κ B es clave en el proceso inflamatorio, además de ser sensible al estado redox celular. Se exploraron los niveles de varios de los componentes de esta vía (p65, p50 e I κ B α) mediante *Western-blot* y cuantificación densitométrica relativa a los niveles de β -actina. Se compararon las diferencias en sus niveles entre grupos de edad en cada región mediante la prueba t de Student o la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, a conveniencia. Los niveles detectados y su comparación estadística entre grupos de edad en cada región cerebral se muestran en la figura 40 (detalles estadísticos en los anexos del 22 al 24).

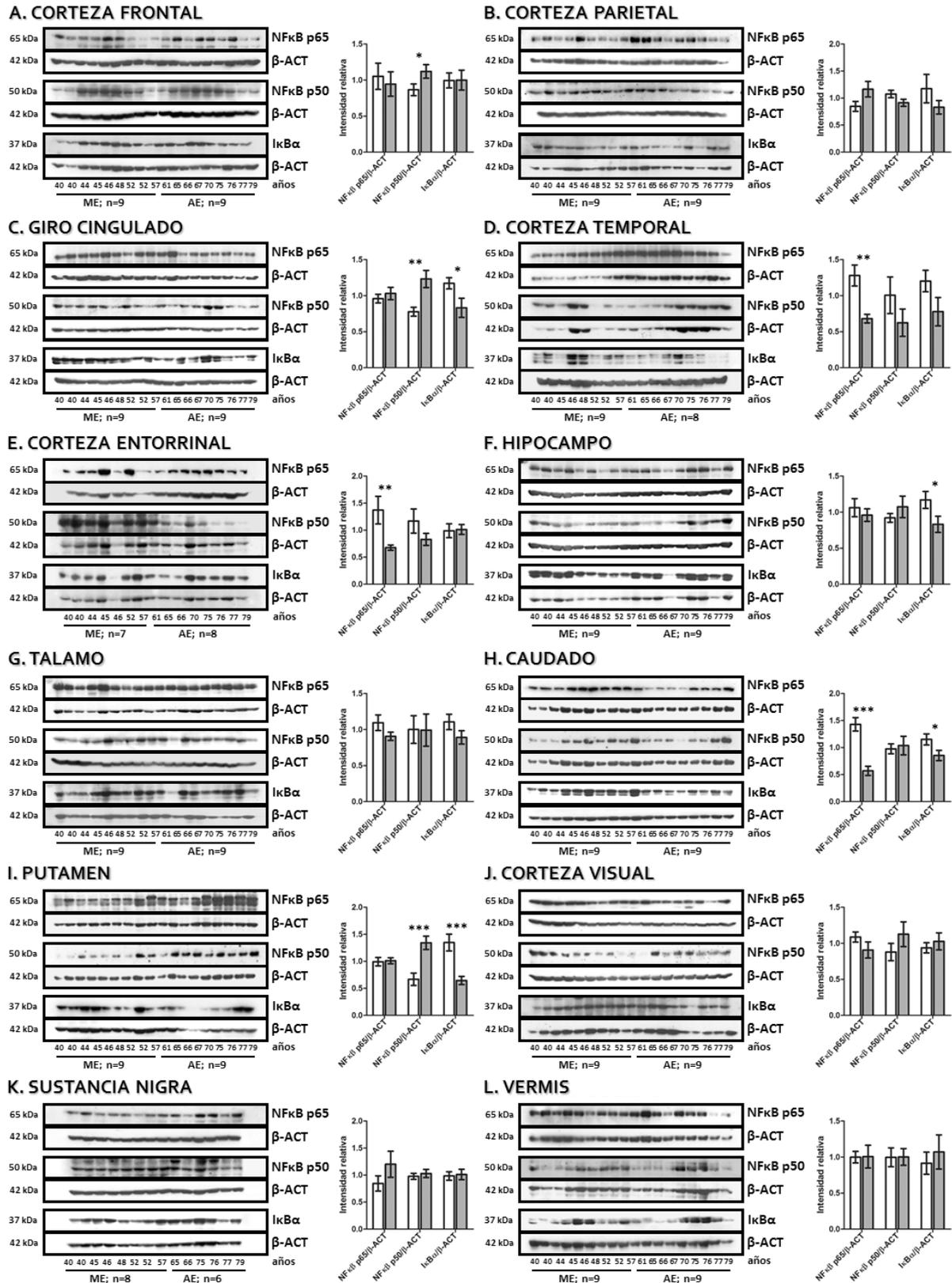


Figura 40. Niveles de los componentes de la vía NF-κB p65, p50 e IκBα en el cerebro en casos de mediana edad (ME) y avanzada edad (AE), detectados por *Western-blot* y densitometría utilizando β-actina como control de carga. Se muestran gráficamente los valores medios ± error estándar por grupo de edad. Las diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos se indican con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

La proteína NF- κ B p65 mostró variación de sus niveles con la edad solamente en tres de estas regiones cerebrales, siendo una disminución con la edad en las cortezas temporal ($p < 0.002$, figura 40D) y entorrinal ($p < 0.006$, figura 40E), y en el núcleo caudado ($p < 0.000$, figura 40H).

Por su parte, la NF- κ B p50 solo presentó un aumento de sus niveles en el grupo de AE respecto al de ME; en las regiones: corteza frontal ($p < 0.05$, figura 40A), giro cingulado ($p < 0.002$, figura 40C) y putamen ($p < 0.001$, figura 40I).

Con la edad, solo se detectaron disminuciones en los niveles del inhibidor I κ B α . Esto sucedió en cuatro de las regiones cerebrales exploradas: giro cingulado ($p < 0.04$, figura 40C), hipocampo ($p < 0.05$, figura 40F), núcleo caudado ($p < 0.04$, figura 40H) y putamen ($p < 0.001$, figura 40I).

8. Diferencias significativas en las moléculas exploradas con el envejecimiento en el cerebro tras ajuste por FDR

A lo largo este trabajo se han realizado 276 comparaciones independientes (23 marcadores/proteínas x 12 regiones); para detectar los efectos más significativos y controlar la tasa de falsos positivos se realizó un ajuste de comparaciones múltiples mediante FDR según el método de Benjamini y Hochberg incluyendo todas las comparaciones realizadas (anexo 25). Las diferencias significativas en cada región cerebral tras el ajuste por FDR (al 5 y 10 %) se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Diferencias significativas en cada región cerebral tras ajuste por FDR.

Región	Marcador/proteína (FDR = 5 %)	Marcador/proteína (FDR = 10 %)
Corteza frontal	MDA \uparrow , COX2 \uparrow , CYP2J2 \downarrow , CEL \uparrow , TRX \downarrow , VDAC \downarrow	MDA \uparrow , COX2 \uparrow , CYP2J2 \downarrow , CEL \uparrow , CML \uparrow , GPX4 \uparrow , TRX \downarrow , VDAC \downarrow , NRF2-30 \downarrow
Corteza parietal	COX2 \uparrow , CML \uparrow , TRX \downarrow	MDA \uparrow , COX2 \uparrow , CML \uparrow , SOD2 \uparrow , TRX \uparrow , NRF2-30 \downarrow
Giro cingulado	CML \uparrow , CI \uparrow , CII \uparrow , NFkBP50 \uparrow	CML \uparrow , CI \uparrow , CII \uparrow , CIII \uparrow , NFkBP50 \uparrow
Corteza temporal	COX2 \uparrow , TRX \downarrow , CI \uparrow , NFkBP65 \downarrow	COX2 \uparrow , CYP2J2 \downarrow , CEL \uparrow , TRX \downarrow , CI \uparrow , CIV \uparrow , CV \downarrow , NFkBP65 \downarrow
Corteza entorrinal	MDA \downarrow , GPX4 \uparrow , VDAC \downarrow , CI \uparrow , NFkBP65 \downarrow	MDA \downarrow , SOD2 \uparrow , GPX4 \uparrow , TRX \downarrow , VDAC \downarrow , CI \uparrow , NRF2-30 \downarrow , NFkBP65 \downarrow
Hipocampo	CI \downarrow , CII \downarrow , CIII \downarrow	CML \downarrow , CYP2J2 \downarrow , SOD1 \uparrow , GPX4 \uparrow , NRF2-65 \downarrow , CI \downarrow , CII \downarrow , CIII \downarrow
Tálamo	NKT \downarrow , SOD1 \uparrow , CAT \downarrow , NRF2-100 \uparrow	NKT \downarrow , MDA \uparrow , CYP2J2 \downarrow , SOD1 \uparrow , CAT \downarrow , GPX4 \uparrow , NRF2-100 \uparrow , CII \uparrow , CIII \uparrow
Caudado	CYP2J2 \uparrow , SOD1 \uparrow , NFkBP65 \downarrow	CYP2J2 \uparrow , CEL \uparrow , SOD1 \uparrow , CAT \downarrow , CIII \uparrow , CIV \uparrow , NFkBP65 \downarrow
Putamen	SOD1 \uparrow , SOD2 \uparrow , NFkBP50 \uparrow , I κ Ba \downarrow	MDA \uparrow , SOD1 \uparrow , SOD2 \uparrow , NFkBP50 \uparrow , I κ Ba \downarrow
Corteza visual	SOD2 \uparrow , CAT \uparrow , NRF2-100 \downarrow , CII \downarrow	NKT \uparrow , CML \uparrow , SOD2 \uparrow , CAT \uparrow , GPX4 \uparrow , NRF2-100 \downarrow , CII \downarrow , CIV \downarrow
Sustancia nigra		NKT \uparrow , COX2 \uparrow , SOD1 \uparrow , SOD2 \downarrow , TRX \uparrow
Vermis	CEL \uparrow , GPX4 \uparrow , CIV \uparrow	CEL \uparrow , GPX4 \uparrow , CIV \uparrow

FDR: *false discovery rate*, método de Benjamini y Hochberg. \uparrow aumento con la edad y \downarrow disminución con la edad. Se presentan los marcadores/proteínas en el orden en que se exploraron.

9. Análisis global de datos mediante IPA

A fin de analizar globalmente la información obtenida a partir de todos los marcadores/proteínas y regiones cerebrales, se exploró el conjunto de datos obtenido empleando el programa IPA. Como paso inicial se realizó un análisis núcleo de los datos disponibles incluyendo las variaciones significativas con la edad de estas moléculas en cada una de las regiones exploradas. Las vías de señalización canónicas significativamente modificadas (respecto al número de moléculas) por la edad en cada una de las regiones exploradas se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Vías canónicas de señalización modificadas con la edad en el cerebro.

Región	Vía canónica	p-valor
Corteza frontal	Disfunción mitocondrial	0.00003
	Regulación mediada por MIF de glucocorticoides	0.00007
	Regulación mediada por MIF de la respuesta inmune innata	0.0001
Corteza parietal	Disfunción mitocondrial	0.0000002
	Regulación mediada por MIF de glucocorticoides	0.00007
	Regulación mediada por MIF de la respuesta inmune innata	0.0001
Giro cingulado	Fosforilación oxidativa	0.000002
	Disfunción mitocondrial	0.000008
	Regulación mediada por MIF de glucocorticoides	0.00003
Corteza temporal	Disfunción mitocondrial	0.000000009
	Degradación de radicales superóxido	0.000007
	Fosforilación oxidativa	0.00001
Corteza entorrinal	Disfunción mitocondrial	0.0000001
	Señalización mediada por PEDF	0.0004
	Señalización de respuesta de fase aguda	0.0001
Hipocampo	Disfunción mitocondrial	0.000000001
	Degradación de radicales superóxido	0.00001
	Fosforilación oxidativa	0.00003
Tálamo	Disfunción mitocondrial	0.0000002
	Degradación de radicales superóxido	0.000004
	Respuesta al estrés oxidativo mediada por Nrf2	0.0004
Caudado	Degradación de radicales superóxido	0.000004
	Disfunción mitocondrial	0.00003
	Producción de NO y ROS por macrófagos	0.00004
Putamen	Señalización mediada por PEDF	0.0000005
	Degradación de radicales superóxido	0.000001
	Señalización de respuesta de fase aguda	0.000003
Corteza visual	Disfunción mitocondrial	0.000000000002
	Degradación de radicales superóxido	0.000000006
	Fosforilación oxidativa	0.0000001
Sustancia nigra	Degradación de radicales superóxido	0.000000002
	Disfunción mitocondrial	0.0000002
	Síntesis de prostanoides	0.0002
Vermis	Disfunción mitocondrial	0.0000000004
	Fosforilación oxidativa	0.000004
	Degradación de radicales superóxido	0.002

MIF: *macrophage migration inhibitory factor*; PEDF: *pigment epithelium derived factor*; NO: óxido nítrico; ROS: *reactive oxygen especies*.

Considerando todas las regiones, se encuentran ampliamente representadas las vías canónicas de disfunción mitocondrial, fosforilación oxidativa y vías relacionadas con la producción de ROS y el estrés oxidativo en general. Un resultado esperado ya que se trabaja con un pequeño número de moléculas preseleccionadas en relación a estas funciones. Sin embargo, este análisis muestra que estas moléculas también participan en vías como la regulación mediada por MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) de glucocorticoides y de la respuesta inmune innata (corteza frontal, corteza parietal y giro cingulado) y la señalización mediada por PEDF (*pigment epithelium derived factor*) (corteza entorrinal y núcleo caudado).

Tras este análisis inicial se procedió a explorar las diferencias entre regiones cerebrales en las variaciones de este conjunto de datos con la edad realizando un análisis de comparación. Se exploró de esta manera la respuesta diferencial significativa entre regiones cerebrales con la edad para vías canónicas de señalización, enfermedades y funciones (z-score estimado con $p < 0.05$). En este análisis cuatro vías canónicas de señalización mostraron variaciones entre regiones en su tendencia predicha hacia la activación o la inhibición (figura 41). Las mismas fueron la vía de respuesta de fase aguda, la señalización PI3K/Akt, la regulación mediada por MIF de la respuesta inmune innata y la señalización mediada por PPAR (*nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor*).

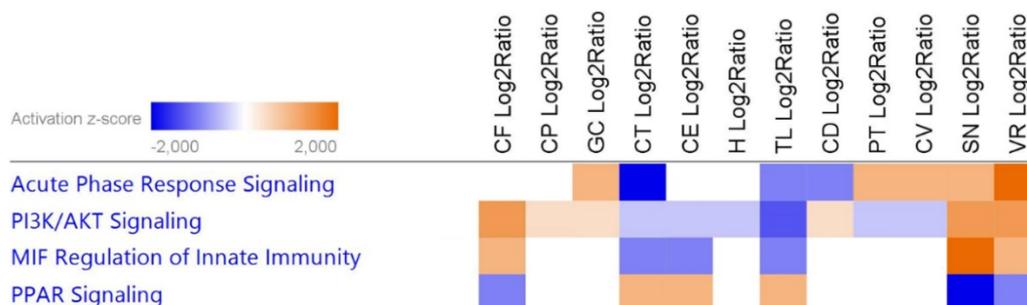


Figura 41. Heatmap para vías canónicas con comportamiento diferencial entre regiones cerebrales con la edad generado mediante análisis de comparación empleando el programa IPA. Las imágenes se muestran en inglés por obtenerse directamente del programa. CF: corteza frontal, CP: corteza parietal, GC: giro cingulado, CT: corteza temporal, CE: corteza entorrinal, H: hipocampo, TL: tálamo, CD: núcleo caudado, PT: putamen, CV: corteza visual, SN: sustancia nigra y VR: vermis.

La exploración del efecto sobre enfermedades y funciones en las diferentes regiones cerebrales con la edad obtenidas del conjunto de datos introducido mediante análisis de comparación se muestra en la figura 42. De manera general, el análisis de enfermedades y funciones mostró la activación de procesos relacionados con el daño en el SNC en la corteza frontal, la parietal y la temporal, y en menor medida en la sustancia nigra. A su vez regiones como el giro cingulado, putamen, corteza visual y vermis muestran una tendencia a la protección ante el mismo. El resto de las regiones (corteza entorrinal, hipocampo, tálamo y núcleo caudado) mostraron un comportamiento mixto.

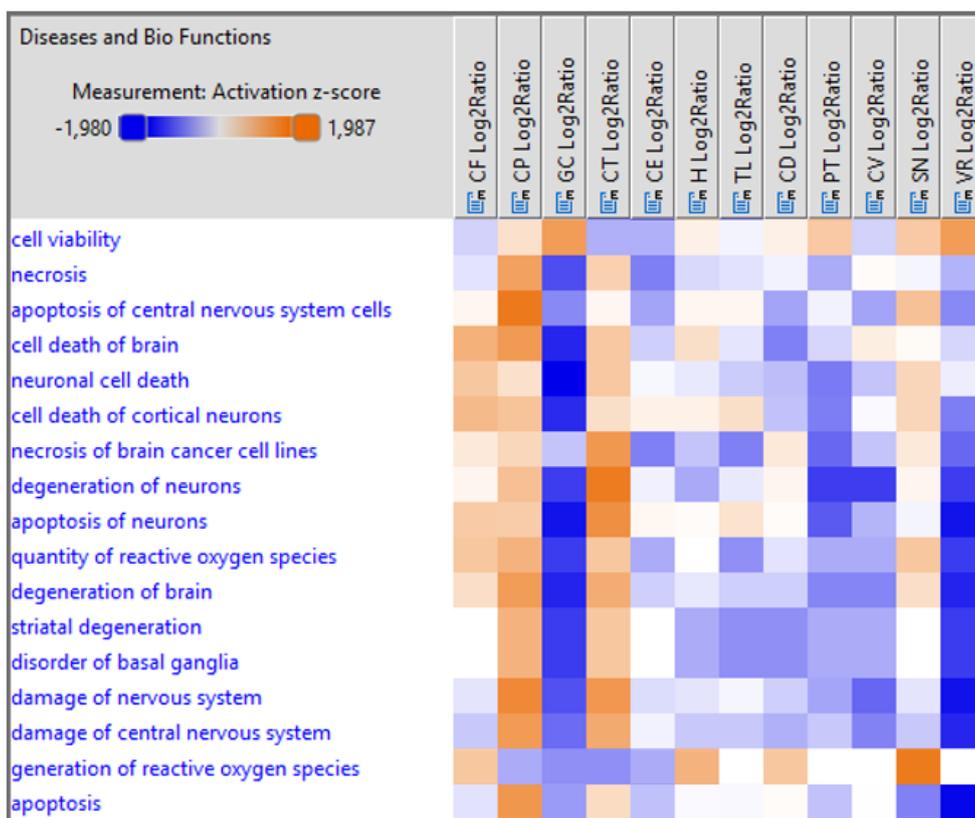


Figura 42. Heatmap para enfermedades y funciones que muestra el comportamiento diferencial entre regiones cerebrales con la edad generado mediante análisis de comparación empleando el programa IPA. Las imágenes se muestran en inglés por obtenerse directamente del programa. CF: corteza frontal, CP: corteza parietal, GC: cíngulo giro, CT: corteza temporal, CE: corteza entorrinal, H: hipocampo, TL: tálamo, CD: núcleo caudado, PT: putamen, CV: corteza visual, SN: sustancia nigra y VR: vermis.

V. DISCUSIÓN

El envejecimiento comprende una serie de eventos en los que el declive de las funciones fisiológicas resulta de la alteración de la homeostasis en células, tejidos y órganos, comprometiendo la supervivencia del organismo. En el SNC la acumulación de eventos perjudiciales como el daño oxidativo, la disfunción mitocondrial y la inflamación crónica se han asociado con el envejecimiento y la neurodegeneración (Calabrese et al., 2010; Matt y Johnson, 2016). Sin embargo, poco se sabe acerca de su contribución al envejecimiento normal en el cerebro teniendo en cuenta la vulnerabilidad específica de sus diferentes regiones.

El presente trabajo exploró, en doce regiones cerebrales, la variación asociada a la edad en los niveles de diferentes moléculas implicadas en estos procesos, en una muestra representativa del envejecimiento cerebral normal divididos en grupos de mediana (< 60 años) y avanzada (> 60 años) edad. No se incluyeron casos con factores diferentes de la edad que pudieran interferir con el análisis de proteínas oxidadas tales como en enfermedades metabólicas o hipoxia. El estudio neuropatológico de estos casos demostró que los sujetos de ME no presentaron signos de EA, mientras que algunos de AE presentaban signos de estadio I-II de Braak y Braak sin enfermedad neurológica o mental. Debido a que alrededor del 80 % de los sujetos de más de 65 años tienen presencia de ovillos neurofibrilares (Braak y Braak, 1997), estas modificaciones se interpretan como normales y sin relación patológica con la EA (Ferrer, 2012).

El rango de tiempo *post mortem* de las muestras empleadas, interpretado como una media de conservación, se encontró dentro del cual se ha descrito que los marcadores de daño oxidativo se mantienen estables (Ferrer et al., 2007). Como medida de control adicional, se exploraron las correlaciones entre el tiempo *post mortem* de las muestras y los niveles de los marcadores/proteínas explorados en cada región (resultados no mostrados). Solo 15 (5.4 %) de las 276 variables analizadas mostraron alguna correlación (positiva o negativa) con el tiempo *post mortem*, de estas solo 4 (1.5 % del total: VDAC en corteza parietal, TRX en corteza entorrinal, CML en hipocampo y CIV en el núcleo caudado) presentaron diferencias significativas entre grupos de edad, por lo que el tiempo *post mortem* de las muestras empleadas no explica las diferencias reportadas en el trabajo y se puede interpretar la conservación de las muestras como adecuada para estudios proteómicos.

1. Modificación de proteínas específicas por NKT y envejecimiento en el cerebro

Los NKT son γ -cetoaldehídos formados a través de la vía de neuroprostanos por la oxidación no enzimática del DHA (Bernoud-Hubac et al., 2001); PUFA altamente enriquecido en las membranas neuronales. Estos productos lipoxidados tienen la propiedad de formar aductos proteicos, e inducir al entrecruzamiento y la agregación de proteínas, afectando su estructura tridimensional y función (Bernoud-Hubac y Roberts, 2002). Considerando esto, el propósito inicial de la tesis se dirigió a la

identificación y caracterización de proteínas susceptibles de ser modificadas por NKT considerando las variaciones respecto a la edad y regiones del cerebro, mediante proteómica redox y análisis bioinformático.

1.1. La lipoxidación de proteínas específicas por NKT ocurre en la mediana edad y aumenta con el envejecimiento en el cerebro

Se detectaron proteínas modificadas por NKT en todos los casos analizados independientemente de la edad. Mediante MS se identificaron 30 proteínas susceptibles de ser aducidas por NKT, con incrementos de su nivel de lipoxidación con la edad, en regiones particulares. Adicionalmente, la identidad de un subgrupo de las mismas se confirmó mediante *Western-blot* con anticuerpos específicos.

Las proteínas más frecuentemente lipoxidadas fueron GFAP, HSPD1, CKB, GAPDH, NEFM y PEBP1. Estas proteínas (excepto NEFM) y la chaperona HSPA8 se encontraron modificadas por NKT en todas las regiones. Además, la GFAP y la HSPD1 mostraron el mismo nivel de lipoxidación en individuos de ME y AE en más de la mitad de las regiones exploradas.

Considerando la presencia acumulativa de proteínas lipoxidadas en los casos por grupo de edad, la aducción por NKT de estas proteínas aumentó en los individuos de AE respecto a los de ME en todas las regiones, a excepción de putamen y vermis. Las proteínas que más frecuentemente aumentaron su nivel de lipoxidación con la edad fueron ATP5B, UCHL1, GOT1, GAPDH y ENO1.

En conjunto, estas observaciones muestran que el cerebro de individuos entre 40-48 años contiene proteínas lipoxidadas, cuyos niveles varían entre regiones, y que la presencia acumulada de aductos de NKT se incrementa en sujetos entre 70-79 años en la mayoría de las regiones exploradas, especialmente en la corteza frontal, la corteza parietal y el giro cingulado. Es destacable que el incremento de la lipoxidación, al menos en las regiones de mayor aumento, no está relacionado con el aumento de los niveles de las proteínas particulares; sino más bien que se relaciona con una mayor vulnerabilidad a la lipoxidación. Lo cual es inferido de los mayores valores de proteínas dañadas oxidativamente en comparación con los niveles totales preservados para las mismas proteínas.

1.2. Lipoxidación proteica selectiva en el cerebro humano

La susceptibilidad a la lipoxidación no es uniforme en todas las proteínas, algunas son menos resistentes al estrés oxidativo (Martínez et al., 2010; Petrak et al., 2008). Asumiendo que los compuestos ROS actúan estocásticamente en la producción de daño molecular, diversos factores pueden influenciar esta susceptibilidad específica además de la abundancia, como son el tipo celular, la estructura proteica, la localización subcelular y la función (Eisenstein, 2009).

Un ejemplo de vulnerabilidad asociado al tipo celular se da en la GFAP, localizada en astrocitos, los mayores productores de DHA en el cerebro y sus derivados peroxidados (Lukiw y Bazan, 2008); también es este el tipo celular con

metabolismo glucolítico (GAPDH) incrementado en el cerebro (Barros y Deitmer, 2010). Respecto a la localización subcelular, varias de las proteínas con elevada tendencia a la lipoxidación (HSPD1) se localizan en la mitocondria, la principal fuente de ROS celular (Starkov, 2010). El NEFM forma parte del citoesqueleto neuronal y la PEBP1 participa en la neurotransmisión. Cabe destacar que los axones y las terminaciones sinápticas tienen alta demanda energética lograda por su continua actividad mitocondrial y la transducción energética rápida mediada por la CKB. Adicionalmente, los axones son estructuras radiales de pequeño diámetro en comparación con el cuerpo celular, lo cual favorece la probabilidad de interacciones entre las ROS y las membranas lipídicas, favoreciendo la PL.

Los presentes hallazgos también muestran que ciertas características estructurales, la presencia de α -hélices y bucles, produce proteínas susceptibles al daño oxidativo por NKT. Exceptuando las proteínas filamentosas del citoesqueleto y la BASP1 (completamente desordenada), el resto de las proteínas identificadas son moléculas solubles globulares, con grupos hidrofóbicos en su centro y grupos hidrofílicos expuestos, con un nivel de exposición mayor del 50 % en 20 de estas proteínas. Además, proteínas con los aminoácidos lisina, ácido glutámico y ácido aspártico expuestos parecen ser particularmente vulnerables a la lipoxidación.

1.3. Agrupación funcional de proteínas dañadas oxidativamente

Considerando el número de proteínas dañadas, los principales sistemas afectados son el metabolismo energético, la organización del citoesqueleto, la proteostasis, la neurotransmisión y el metabolismo del O_2/CO_2 /grupo hemo.

Existe una extensa evidencia de que el metabolismo energético está particularmente afectado en el envejecimiento y la neurodegeneración (Harman, 2001; Jové et al., 2014; Pamplona y Barja, 2006). Aquí se encuentran pistas de los sustratos moleculares del fallo energético con la edad, al identificarse proteínas lipoxidadas implicadas en la glicólisis (TPI1, GAPDH, PGAM1, ENO1, PKM2), el ciclo de Krebs (ACO2, DLD) y la fosforilación oxidativa (ATP5A1, ATP5B). Estas proteínas son componentes claves de las rutas metabólicas acopladas que sustentan los requerimientos de ATP celulares. La actividad neural es dependiente de estos procesos, ya que en condiciones normales la glucosa es el sustrato energético exclusivo del cerebro (Magistretti, 2000). Adicionalmente, la CKB se encarga de la producción rápida de ATP a partir de reservas de fosfocreatina en respuesta a un aumento agudo de la demanda energética en neuronas, es clave en el circuito fosfocreatina para mantener la homeostasis energética celular (Wallimann et al., 1992). De esta manera, la CKB provee a las neuronas de un reservorio y una fuente alternativa de ATP a la ruta glicólisis - ciclo de Krebs - fosforilación oxidativa, que también podría verse comprometida.

Las proteínas del citoesqueleto GFAP, NEFL y NEFM mostraron una elevada tendencia a la lipoxidación. Son proteínas filamentosas compuestas de cadenas largas paralelas unidas por puentes disulfuro, lo que las hace muy estables y con altos

tiempos de vida media. Estos resultados coinciden con observaciones previas que muestran que los neurofilamentos son dianas principales de productos de la PL en el SNC (Perry et al., 2013; Wataya et al., 2002). También apoyan la idea de que la oxidación de ciertas proteínas del citoesqueleto se encuentra bajo un mecanismo de control redox a lo largo de la vida (Wataya et al., 2002). La posible implicación funcional de niveles constantes de oxidación en estas proteínas es un tema por explicar, quizás cierto grado de oxidación en determinadas proteínas del citoesqueleto pueda ser útil para su funcionamiento normal al añadir estabilidad por entrecruzamientos. En el caso de la TPP y la CFL1 mostraron una elevada presencia de bucles en su estructura, lo que las hace accesible a la oxidación, las posibles alteraciones o implicaciones que estas modificaciones puedan generar en el citoesqueleto celular, así como su papel en el envejecimiento quedan por determinar.

La oxidación de chaperonas involucra moléculas mitocondriales (HSPD1) y citosólicas (HSPA8, CRYAB, PARK7). En conjunto, se encargan de generar y mantener el correcto plegamiento de las proteínas celulares (Broadley y Hartl, 2009), evitan la agregación proteica e incrementan la resistencia celular al daño oxidativo (Broadley y Hartl, 2009; Shendelman et al., 2004), mantienen la homeostasis mitocondrial (Broadley y Hartl, 2009; Chang et al., 2014b) y regulan la transcripción génica (Broadley y Hartl, 2009; Clements et al., 2006). Adicionalmente, se encontró modificada por NKT la UCHL1, ligasa de ubiquitina del sistema ubiquitina-proteosoma, encargada de marcar proteínas alteradas para su degradación. De esta manera, diferentes miembros del sistema celular de edición de proteínas se lipoxidan lo cual compromete la proteostasis, ampliamente reportada como alterada en el envejecimiento (López-Otín et al., 2013).

Acerca de proteínas lipoxidadas relacionadas con la neurotransmisión, PEBP1 modula a la enzima colina-acetiltransferasa durante la síntesis de acetilcolina (Ojika et al., 1998). La fosfoproteína SYN1 recubre vesículas sinápticas modulando su liberación, la transmisión sináptica y la plasticidad (Farisello et al., 2013). GOT1 participa en la síntesis y regulación de los niveles de glutamato (Rink et al., 2011), el neurotransmisor responsable del 90 % de las sinapsis excitatorias en el cerebro. BASP1 se localiza en las terminales nerviosas, las cuales están enriquecidas en las vesículas sinápticas y en la fracción de balsas lipídicas de las membranas plasmáticas sinápticas (Zakharov et al., 2003); regula el transporte de descarboxilasas de glutamato a las terminales presinápticas, así como su anclaje a las vesículas sinápticas (Maekawa et al., 2013). DPYSL2 tiene funciones relevantes en la orientación de los axones y el crecimiento de las neuritas, así como en el tráfico de vesículas sinápticas y de receptores de glutamato NMDA (Martins de Souza et al., 2015). YWHAG es un miembro del grupo de proteínas 14-3-3, las cuales exhiben diferentes funciones reguladoras como la activación de las hidroxilasas de triptófano y tirosina, enzimas limitantes en la síntesis de serotonina y catecolaminas respectivamente (Steinacker et al., 2011). La síntesis de estos neurotransmisores también podría afectarse debido a la alteración estructural de la QDPR, la cual produce tetrahidrobiopterina (BH-4), una coenzima esencial para las

hidroxilasas de fenilalanina, tirosina y triptófano. La modificación estructural de estas proteínas unida a la elevada demanda energética hace a las sinapsis especialmente vulnerables al daño oxidativo.

Más allá, el análisis de enriquecimiento funcional utilizando el programa Cytoscape con la información actual de las bases de datos GO, KEGG, REACTOME y STRING mostró que más de la mitad de las proteínas identificadas como modificadas por NKT se relaciona con el mantenimiento de la mielina. En el SNC de vertebrados, la mielina es una estructura multilamelar que encierra segmentos de los axones (Nave y Werner, 2014) e incrementa su velocidad de transmisión (Waxman, 1977), permitiéndoles soportar ráfagas de señales de alta frecuencia e integrar la información de las redes neuronales espacialmente distribuidas que soportan las funciones cognitivas y motoras (Fuster, 1999; Mesulam, 2000; Axmacher et al., 2006; Kreiman et al., 2006). Por ello, el mantenimiento de su integridad es necesario para el correcto desarrollo de las funciones cerebrales. De hecho, se ha descrito su deterioro con el envejecimiento y que el mismo se relaciona con una pérdida de conectividad y el decline de funciones cerebrales como el control motor y la memoria (Bartzokis et al., 2003; Bartzokis et al., 2007). El incremento con la edad del daño oxidativo de sus componentes o de moléculas involucradas en su mantenimiento puede contribuir a explicar este deterioro y la pérdida de conectividad asociada al mismo.

Las proteínas BLVRB, CA y HB1A, relacionadas con el metabolismo del grupo hemo y la regulación del O₂ y el CO₂ están también dañadas oxidativamente. CA participa en la conversión del CO₂ a bicarbonato y en la excreción del CO₂. BLVDR regula el paso final del metabolismo del grupo hemo, y también el metabolismo de la glucosa, además tiene efectos neuroprotectores (Baranano et al., 2002). HBA1 es un componente de la hemoglobina cuyo rol en el SNC es pobremente entendido. Ha sido hallada en neuronas, no obstante, su función exacta en las mismas queda por explorar (Biagioli et al., 2009); a mencionar, los niveles de hemoglobina están reducidos en neuronas en la EA (Ferrer et al., 2011). El daño oxidativo de estas proteínas identifica a la regulación del O₂ y CO₂ como un proceso disfuncional en el envejecimiento.

Adicionalmente, las interacciones moleculares de estas proteínas se exploraron para identificar sistemas que puedan estar indirectamente dañados como resultado de la lipoxidación y la pérdida de la función proteica. La ubiquitina C se identificó como un nodo central de la red de interacciones. Su conjugación a proteínas tiene un rol vital en el sistema proteosomal y el recambio proteico, el cual está afectado en las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento (Hoppe, 2010). En vista de que la conjugación de ubiquitina a proteínas blanco ocurre a través de los grupos ε-amino de la lisina, la aducción por NKT de este grupo pudiera limitar las interacciones ubiquitina-proteína y evitar la degradación de proteínas alteradas. Además, el 50 % de los sitios de unión a ubiquitina no participan en la degradación proteica por el sistema ubiquitina-proteosoma (Wagner et al., 2011), sugiriendo que la ubiquitina participa en otras vías moleculares. Si es así, dichas vías también

podrían desregularse como resultado de la ocupación por NKT de sitios de conjugación a ubiquitina.

1.4. Aducción por NKT y oligómeros solubles

Las estructuras proteicas aberrantes pueden generar oligómeros solubles, tales especies son reconocidas por su alto potencial citotóxico (Glabe, 2006; Guerrero-Muñoz et al., 2014). Los mismos se detectaron usando el anticuerpo dependiente de conformación A11 (Glabe, 2004), el cual fue inicialmente diseñado para reconocer oligómeros solubles β -amiloides. La aducción por NKT genera estructuras aberrantes y favorece el entrecruzamiento y la agregación (Bernoud-Hubac y Roberts, 2002). Por esta razón, los niveles globales de aducción proteica por NKT y la presencia de oligómeros se analizaron en las tres regiones con mayor aumento de la lipoxidación con la edad de proteínas específicas (corteza frontal, corteza parietal y giro cingulado). Se encontró una correlación positiva significativa entre los niveles de aducción por NKT y los de oligómeros solubles en estas regiones corticales (confirmada mediante regresión múltiple), sugiriendo que la modificación de proteínas por NKT se relaciona con la formación de oligómeros. Estos últimos aumentan con la edad en las cortezas frontal y parietal, los niveles de NKT aumentan con la edad solo en la corteza frontal, mientras que en el giro cingulado ambos marcadores permanecen constantes a lo largo del tiempo.

El análisis de componentes principales de estos datos evidenció relaciones estrechas entre las cortezas frontal y parietal y relativa independencia del giro cingulado durante el envejecimiento. Es interesante que esta relación entre las cortezas frontal y parietal coincide con hallazgos de la neurociencia cognitiva; estudios de tractografía han mostrado que existe un gradiente antero-posterior relacionado con la edad de alteraciones en los tractos de fibras de sustancia blanca que conectan estas cortezas (Davis et al., 2009); y también que existe un reclutamiento compensatorio de la corteza parietal en sujetos mayores sanos para desarrollar tareas cognitivas frontales (Huang et al., 2012).

De manera interesante, un amplio número de las proteínas identificadas como modificadas por NKT se describen como presentes en exosomas vesiculares extracelulares (tabla 7). Estas estructuras vesiculares actúan como mensajeros intercelulares que comunican células de igual o diferente tipo. Son esenciales para el normal funcionamiento fisiológico, pero, bajo circunstancias patológicas, pueden contribuir a potenciar el estrés y el daño celular (Allison y Chen, 2017). La propagación entre células/regiones de proteínas dañadas oxidativamente y especies moleculares aberrantes mediante los mismos podría contribuir a extender o comunicar sus efectos en el cerebro.

Adicionalmente, estos hallazgos complementan observaciones previas de que niveles incrementados de oligómeros solubles existen en las cortezas frontal y entorrinal de sujetos de AE con estadios I-II de Braak y Braak, respecto a sujetos de ME. De esta manera, el incremento de oligómeros solubles es una característica

del envejecimiento normal, así como de los primeros estadios de la EA (López-González et al., 2015). Dicho incremento es similar al de citoquinas y mediadores de la respuesta inmune en el cerebro de avanzada edad (López-González et al., 2015). Si estas coincidencias tienen una relación causa-efecto aún necesita ser investigado mediante modelos adecuados *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, el estudio de cerebros *post mortem* permite demostrar que tales cambios realmente existen en el cerebro humano y merecen ser investigados.

2. Lipoxidación proteica y envejecimiento en el cerebro

Los lípidos y sus metabolitos oxidados tienen un gran impacto en el envejecimiento y la neurodegeneración, participando, entre otros procesos, en el daño oxidativo a proteínas (Massey y Nicolaou, 2013; Naudí et al., 2015). Relativamente poco se sabe de la modificación global proteica por productos de PL durante el envejecimiento cerebral considerando las variaciones regionales. Por ello, se exploraron las variaciones en los niveles de lipoxidación proteica por NKT y MDA con la edad en doce regiones cerebrales de interés.

2.1. NKT, producto de peroxidación lipídica del DHA, muestra variaciones discretas con la edad en el cerebro

Niveles globales incrementados con la edad de modificación proteica por NKT se encontraron solamente en las cortezas frontal (en coincidencia con el análisis previo mediante *slot-blot*) y visual, y la sustancia nigra; a su vez niveles disminuidos se detectaron en tálamo. Lo cual sugiere que la variación del daño oxidativo con la edad debe ser interpretada en el contexto de marcadores y regiones cerebrales específicas.

La producción de NKT depende de diferentes factores que incluyen los niveles de ROS y de DHA susceptibles de experimentar oxidación no enzimática. El DHA ha sido reportado como el PUFA más abundante en el cerebro con un tiempo de vida medio estimado de 2.1 años, evidenciando el elevado control de la preservación del *pool* de DHA en el cerebro humano (Naudí et al., 2015). La liberación de DHA unido a membrana es un proceso regulado enzimáticamente que limita el nivel de DHA libre citoplasmático (Lukiw y Bazan, 2008); además, la composición lipídica de las membranas celulares del cerebro cambia con la edad, reportándose una disminución en los niveles y en el recambio de PUFA, incluyendo al DHA (Ledesma et al., 2012; Naudí et al., 2015). Estos hechos ayudan a explicar el limitado número de regiones donde existe un aumento significativo del nivel global de proteínas modificadas por NKT con la edad, así como su disminución en el tálamo, lo cual podría reflejar los cambios del metabolismo lipídico, además de los de la producción de ROS. Por otra parte, se alinean con la propuesta de que el daño oxidativo a proteínas por NKT podría concentrarse en un grupo de proteínas especialmente susceptibles al mismo; lo cual puede no reflejarse en el análisis global del mismo al incluir esta la señal de proteínas minoritarias que pueden ser subdetectadas al emplear la técnica de electroforesis bidimensional.

2.2. MDA, producto de peroxidación lipídica del AA, muestra variaciones pronunciadas con la edad en el cerebro

El tiempo de vida medio del AA en el cerebro se estima en 0.55 años (Rapoport et al., 2007), lo cual se puede considerar una tasa de recambio rápida respecto a la del DHA. Este elevado dinamismo del metabolismo del AA puede resultar en una mayor probabilidad de oxidaciones no enzimáticas por ROS. El metabolismo oxidativo incrementado del AA, por reacciones enzimáticas y no enzimáticas, es llamado “cascada del AA” (Rink y Khanna, 2011). Incluye la formación de productos lipoxidados y, también, proinflamatorios como prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. De este modo, la cascada del AA amplifica la producción de especies reactivas y el daño oxidativo.

En línea con estos hallazgos, la aducción de proteínas por MDA mostró un mayor número de cambios regionales con la edad en el cerebro en comparación con el NKT. Cinco regiones cerebrales (corteza frontal, corteza parietal, hipocampo, tálamo y putamen) mostraron un aumento de la aducción proteica por MDA en individuos de avanzada edad. A su vez, niveles disminuidos de modificación por MDA con la edad se observaron en corteza temporal y corteza entorrinal. Adicionalmente, el análisis de componentes principales para MDA evidenció la distribución más realista de los sujetos de acuerdo a su edad cronológica. Coincidentemente, la acumulación de aductos proteicos de MDA se ha relacionado con la formación de lipofuscina (Naudí et al., 2012), agregado intracelular compuesto de derivados de la oxidación de lípidos y proteínas, que se acumula linealmente con la edad en el SNC (Gray, 2005; Keller et al., 2004). Si la deposición regional de lipofuscina es paralela a la acumulación regional de aductos de MDA queda por explorar.

2.3. Especificidad regional en el cerebro del daño lipoxidativo a proteínas durante el envejecimiento

La toxicidad, así como las propiedades regulatorias y señalizadoras de los productos de PL, depende de su abundancia, reactividad y tiempo de vida media. Particularmente, su abundancia es dependiente de los niveles de PUFA precursores en cada región cerebral. Es posible estimar a partir del perfil de ácidos grasos en homogenados totales el PI de una región dada, el cual refleja la susceptibilidad a la PL (Hulbert et al., 2007; Pamplona et al., 2002). Las diferencias regionales de PI en el SNC se han explorado en un número limitado de regiones; según lo reportado para algunas de las regiones exploradas siguiendo el orden corteza frontal > corteza visual > hipocampo > sustancia nigra (Naudí et al., 2012).

Acorde con la relación descrita, los presentes resultados muestran que la corteza frontal es la región con un mayor aumento de la aducción proteica por productos de PL con la edad, independientemente del marcador utilizado (NKT, MDA), y potencialmente más vulnerable con la edad. Diversas alteraciones han sido halladas en la corteza frontal con el envejecimiento, incluyendo altos niveles de oligómeros citotóxicos, citoquinas y diversos mediadores de la respuesta inmune (López-

González et al., 2015), alteraciones en la transmisión sináptica (Erraji-Bencheikroun et al., 2005), regresión de espinas y árboles dendríticos (Dickstein et al., 2007) y reducción del volumen de la materia gris y blanca (Resnick et al., 2003). El daño oxidativo por PL unido a dichos cambios podría contribuir a la disminución funcional con el envejecimiento de la corteza frontal.

Otras seis regiones mostraron un incremento de la aducción proteica por productos de PL, dependiente del marcador usado (NKT: corteza visual y sustancia nigra; MDA: corteza parietal, hipocampo, tálamo y putamen). Se puede especular que esto sea un reflejo de la composición lipídica y PI particular de cada región, y sus posibles modificaciones durante el envejecimiento; sin embargo, se necesitan estudios sistemáticos en la materia para determinarlo.

El tálamo es una región particularmente interesante donde coexisten un aumento en MDA y una disminución de NKT con la edad. El tálamo juega un rol crítico en la coordinación del flujo e integración de la información en procesos como la memoria, la atención y la percepción (Ystad et al., 2010); conectando con las cortezas frontal, parietal, temporal y occipital (Behrens et al., 2003). Se han observado reducciones de volumen con la edad en áreas del tálamo que conectan con la corteza frontal, sin cambios en áreas conectadas con otras regiones corticales (Hughes et al., 2012). De forma especulativa, se puede suponer que esta organización se apoye en perfiles moleculares particulares como el lipídico, susceptibles de cambios temporales. Adicionalmente, la estrecha comunicación tálamo-corteza frontal puede implicar la transmisión de moléculas como el MDA, el cual presenta un perfil de estrecha relación entre dichas regiones en el análisis de componentes principales.

La corteza temporal y entorrinal mostraron una disminución del nivel de modificación proteico por MDA con la edad, coincidiendo con descripciones de una menor acumulación de lipofuscina en las neuronas temporales que en las frontales (Mountjoy et al., 2005). Se requiere profundizar el conocimiento de las relaciones entre PL, acumulación de lipofuscina y neurodegeneración.

3. Mediadores del metabolismo lipídico y envejecimiento en el cerebro, relaciones con productos de peroxidación lipídica

Bajos niveles de inflamación crónica se han descrito en el envejecimiento cerebral (Chung et al., 2011) y en enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad (Frank-Cannon et al., 2009; López-González et al., 2015). El metabolismo de PUFA, mediado entre otras moléculas por COX-2 y CYP2J2, produce mediadores de la respuesta inflamatoria; por ello, las variaciones con la edad de los niveles proteicos de dichas moléculas se exploraron en el envejecimiento cerebral.

La COX-2 es una proteína con roles clave en la inflamación, el envejecimiento y la neurodegeneración (Chung et al., 2011; Minghetti, 2004). La expresión de COX-2 es inducida en astrocitos y en microglia por diferentes estímulos inflamatorios, y es responsable de la producción de prostaglandinas en la inflamación aguda y en la

crónica (Hirst et al., 1999; Xia et al., 2015). La PGE₂, un producto derivado de COX-2, puede producir neurotoxicidad y pérdida de neuronas dopaminérgicas (Carrasco et al., 2007); se ha sugerido que la PGE₂ endógena ejerce un efecto estimulador moderado sobre la síntesis de NO (Minghetti et al., 1997). Además, las prostaglandinas pueden estimular la liberación dependiente de Ca²⁺ de glutamato en astrocitos, lo cual puede conllevar a excitotoxicidad mediada por glutamato (Hirst et al., 1999). También, la COX-2 puede causar citotoxicidad a través de la producción de ROS debida al paso de peroxidasa de su reacción (Minghetti, 2004). Por otra parte, una elevada expresión fisiológica de COX-2 existe en las neuronas glutamatérgicas de la corteza e hipocampo, y también en poblaciones neuronales discretas del cerebro anterior de ratón (Yamagata et al., 1993). Dicha expresión parece estar regulada por la actividad sináptica natural y se ha implicado en los procesos de aprendizaje y memoria (Chen et al., 2002; Teather, 2002).

Se encontró un incremento de los niveles proteicos de COX-2 con la edad en cinco regiones cerebrales (corteza frontal, corteza parietal, corteza temporal, hipocampo y sustancia nigra), siendo por tanto su aumento característico del envejecimiento cerebral; previamente descrito y también asociado a la neurodegeneración (Minghetti, 2004; Weiner y Frenkel, 2006). Si el balance neto de este patrón es beneficioso o perjudicial aún se desconoce, pero para comprenderlo es necesario considerar los posibles efectos de COX-2 teniendo en cuenta los tipos celulares donde se produce; sin embargo, no es posible determinarlo con los presentes resultados, obtenidos a partir de homogenados de proteínas totales.

Diferencias en los niveles de COX-2 fueron encontradas en regiones cerebrales con una alta expresión de esta proteína (Minghetti, 2004), pero también afectadas selectivamente por enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad (Mattson y Magnus, 2006). A modo de especulación, el incremento de la expresión de COX-2 a nivel neuronal podría estar relacionado con mecanismos moleculares compensatorios para mantener el rendimiento funcional. Además, la multiplicidad de funciones de acuerdo al tipo celular podría ayudar a explicar los resultados contradictorios que han arrojado estudios sobre el uso terapéutico de la inhibición de COX-2 en la EA: aunque elevados niveles de COX-2 se han reportado reiteradamente en la EA su inhibición no parece ser efectiva como terapia (Meraz-Ríos et al., 2013).

Por su parte, CYP2J₂ (CYP450 familia 2 subfamilia J miembro 2) es una monoxigenasa que cataliza diversas reacciones implicadas en la síntesis de lípidos y colesterol, con actividad epoxigenasa en el metabolismo de PUFA (Murray, 2016). CYP2J₂ genera epóxidos con variados efectos biológicos dependientes del tejido, aún poco estudiados, entre ellos actividad antiapoptótica y antiinflamatoria (Murray, 2016). Sus niveles proteicos disminuyeron significativamente con la edad en la corteza frontal, la corteza temporal, el hipocampo y el tálamo, sugiriendo una posible disminución de la respuesta antiinflamatoria mediada por CYP2J₂ en estas regiones, a diferencia de en el núcleo caudado donde se detectó un aumento de sus niveles.

En particular en la microglia, los epóxidos producidos por CYP2J2 inhiben de forma dosis-dependiente la producción de dos clásicos marcadores proinflamatorios (IL-6 y NO) mientras que aumentan la de la citoquina antiinflamatoria IL-10; por lo que se ha sugerido que modifican el fenotipo de la microglia de proinflamatorio a antiinflamatorio de reparación (McDougle et al., 2017). En el envejecimiento cerebral se ha descrito la acumulación de microglia senescente, con señalización alterada y fenotipos proinflamatorios (Norden y Godbout, 2013). También, una diversidad regional característica en el perfil génico de expresión microglial modificada diferencialmente por la edad, en el sentido de una distinción creciente de la microglia cerebelosa y una distinción reducida de la microglia hipocampal de la de corteza (Grabert et al., 2016). En línea con estos hallazgos, las regiones de corteza frontal, corteza temporal e hipocampo comparten una disminución con la edad en los niveles de CYP2J2 (además de un aumento de los niveles de COX-2) con un potencial impacto sobre el proceso inflamatorio y la susceptibilidad a la neurodegeneración en estas regiones.

Por otra parte, el metabolismo de lípidos y la PL generan una mezcla compleja de productos peroxidados, de los cuales se pensó originalmente que producían solamente efectos citotóxicos a través de daño oxidativo. Sin embargo, existen evidencias que estos compuestos intervienen en la señalización de respuestas celulares adaptativas (Minghetti et al., 1997; Pamplona, 2008). Más aún, se ha mostrado que otro producto de PL, el HNE, y proteínas LDL inducen cooperativamente la expresión génica de COX-2 (Uchida, 2008). Por lo que resultó interesante explorar las relaciones entre los mediadores del metabolismo lipídico COX-2 y CYP2J2 con los niveles de los productos de PL NKT y MDA.

No se encontró ninguna correlación significativa entre los niveles de NKT y COX-2. Por otra parte, existió una correlación positiva entre los niveles de MDA y COX-2 en la corteza frontal, la corteza parietal y el hipocampo; mientras que existe una correlación negativa en la corteza temporal. Se encontraron correlaciones negativas significativas entre el NKT y el MDA con la proteína CYP2J2 solo en la corteza frontal. Sin embargo, al emplear análisis de regresión múltiple a fin de controlar el posible efecto de confusión de la variable edad solo en hipocampo se detectó un efecto significativo del nivel de MDA sobre el de COX-2 independiente de la misma. No fue por ello posible inferir una relación general entre los niveles de estas moléculas.

A señalar, esta exploración de las relaciones entre las mismas se realizó de manera indirecta (proteínas modificadas por productos de PL), lo cual no descarta un posible efecto de estos productos de PL (NKT Y MDA) en su estado libre sobre la regulación de la expresión de estas enzimas del metabolismo lipídico. En particular, resultaría interesante la exploración de estas relaciones en hipocampo donde parece existir una relación entre el producto de PL MDA y la enzima COX-2.

4. Glicoxidación proteica y envejecimiento en el cerebro

La glicoxidación de proteínas produce AGE que causan cambios estructurales importantes en estas moléculas, afectando su función y, en general, el funcionamiento celular (Trnková et al., 2015; Vistoli et al., 2013); pudiendo contribuir al decline funcional asociado al envejecimiento en el cerebro. De esta manera, se exploraron los patrones regionales de cambios con la edad en los niveles de los AGE CEL y CML, resultantes de la reacción de las RCS metilglioxal y glioxal con la lisina, respectivamente.

El nivel de glicoxidación de proteínas resulta del balance, entre otros factores, de la producción de ROS, la tasa de reciclaje de proteínas y el contenido de RCS que pueden actuar como sustrato para la formación de AGE presentes en determinada región. De manera general, se considera que refleja la concentración de carbohidratos, involucrados en la glicólisis celular, que pueden generar RCS precursores de AGE como el CEL y el CML (Vistoli et al., 2013). Endógenamente, la principal ruta de formación de metilglioxal envuelve la degradación enzimática o no de intermediarios triosa-fosfato originados en la glicólisis, y el glioxal se genera esencialmente comenzando de azúcares por autooxidación o reacciones de Maillard (Trnková et al., 2015).

La reacción de glicación, especialmente por azúcares, es relativamente lenta, por lo que la acumulación de AGE durante el proceso normal de envejecimiento ocurre en gran medida en proteínas de larga vida (Simm et al., 2015). Este hecho puede contribuir a explicar que, en sentido general, a diferencia de los marcadores de lipoxidación, la tendencia de la modificación de los niveles globales de glicoxidación proteica con el envejecimiento fue homogénea, un aumento, con patrones regionales específicos (CEL en corteza frontal, corteza temporal, núcleo caudado y vermis; CML en corteza frontal, corteza parietal, giro cingulado y corteza visual), a excepción de una disminución en hipocampo (CML). Resultados, también, en concordancia con reportes previos de un aumento de los niveles de glicoxidación con la edad (Jové et al., 2014), a la vez que con la existencia de un perfil de especificidad regional para estos marcadores en el cerebro.

Una vez más, la corteza frontal mostró un aumento en el daño oxidativo a proteínas con la edad independientemente del marcador empleado. Dado que existe un aumento en los niveles de daño oxidativo a proteínas con la edad en corteza frontal independientemente del marcador empleado, es posible que en esta región factores como un aumento de ROS, la disminución en la defensa antioxidante y/o el fallo en la eliminación de proteínas dañadas jueguen un papel más relevante en determinar el nivel de proteínas dañadas que los sustratos que generan los marcadores específicos, mientras que otras regiones evidencian el daño oxidativo a proteínas de una manera más “perfil-metabólico-dependiente”.

Aunque los carbohidratos son frecuentemente vistos como la principal fuente de metilglioxal y glioxal, estas RCS pueden formarse también como resultado de la PL

(Fu et al., 1996; Vistoli et al., 2013). En este sentido, es interesante señalar que varias de las regiones cerebrales exploradas mostraron aumentos con la edad en los marcadores de glicoxidación no coincidentes con las variaciones de los de lipoxidación (giro cingulado, corteza temporal, núcleo caudado y vermis). Es posible que las particularidades asociadas al estado redox celular y al uso metabólico de carbohidratos en estas regiones impliquen que el daño a proteínas por glicoxidación juegue un papel más relevante que la lipoxidación en las mismas. En particular, el hipocampo mostró un aumento con la edad en la lipoxidación por MDA y una disminución de glicoxidación por CML, lo cual podría reflejar una disminución del metabolismo de carbohidratos o energético en general.

El cerebro consume grandes cantidades de energía metabólica (ATP) empleando esencialmente dos sustratos, la glucosa y el oxígeno. Existen variaciones en la producción y utilización de la energía metabólica de tipos celulares y regionales (Barros y Deitmer, 2010; Mielke et al., 1996), y consecuentemente en los ALE/AGE que se generan; contribuyendo a explicar la vulnerabilidad regional específica a la neurodegeneración. Resulta interesante mencionar que además de la glucosa empleada en la glicólisis concertada con el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, existe un 10-15 % de la glucosa en el cerebro que es metabolizada en “glicólisis aerobia” (Vaishnavi et al., 2010). El término se refiere al uso de la glucosa fuera de su papel habitual como sustrato para la fosforilación oxidativa en tejidos adecuadamente oxigenados, incluye a la glucosa que entra a glicólisis pero también la que pasa a la lanzadera de las pentosa-fosfato y a la síntesis de glicógeno (Vaishnavi et al., 2010). En esta línea, se ha descrito una congruencia entre las regiones cerebrales con mayor uso de glicólisis aerobia y la acumulación del péptido β A en pacientes con EA (Vlassenko et al., 2010). Es posible que la modificación del metabolismo energético en este sentido con la edad pueda contribuir también a explicar el patrón de regiones con aumento de AGE con la edad.

Adicionalmente, los AGE pueden modificar la acción de las hormonas, citoquinas y radicales libres a través de la participación de receptores de la superficie celular como los RAGE, propiciando reacciones inflamatorias (Wei et al., 2013). Por lo que en las regiones con un aumento de AGE pueden, además, contribuir a generar un ambiente proinflamatorio con la edad mediado por estos productos.

5. Mediadores de la respuesta antioxidante y envejecimiento en el cerebro

En la actualidad, no se ha encontrado una relación clara y consistente entre estudios para la modificación de los niveles de antioxidantes durante el envejecimiento. Aunque los antioxidantes pueden proteger contra diversas enfermedades relacionadas con la edad, no parecen controlar la tasa de envejecimiento ya que especies de larga vida tienen bajos niveles de antioxidantes en sus tejidos y el aumento de los mismos no modifica la longevidad máxima

(Pamplona y Barja, 2007; Pérez-Campo et al., 1998). Hechos que constituyen puntos débiles de la teoría del estrés oxidativo del envejecimiento (López-Otín et al., 2013).

Por otra parte, se acumula evidencia del papel de las ROS a niveles no tóxicos como moléculas de señalización que participan en el normal funcionamiento celular e inducen defensas ante el daño oxidativo (Sen y Packer, 1996; Labunskyy y Gladyshev, 2013). La producción intracelular compartimentalizada de ROS, particularmente el H_2O_2 , y su modulación local por el sistema antioxidante son esenciales en la señalización redox (D'Autréaux y Toledano, 2007). Considerar los participantes y las implicaciones de este sistema de señalización en la supervivencia celular puede ayudar a reconciliar los hallazgos contradictorios en la relación de los niveles de antioxidantes en el envejecimiento.

Según lo descrito en el acápite de introducción, las formas metabólicas más comunes de ROS son los radicales O_2^- , H_2O_2 y OH^\bullet . El radical O_2^- es producido, mayoritariamente, durante la respiración aerobia en la mitocondria, es un precursor de la formación de OH^\bullet catalizada por metales y se convierte en H_2O_2 menos reactivo. El H_2O_2 actúa como molécula de señalización al ser estable, con reactividad selectiva y capaz de difundir membranas, su toxicidad está dada por su transformación en OH^\bullet . El radical OH^\bullet es altamente reactivo, ataca la mayoría de las biomoléculas produciendo daños irreversibles.

La eliminación de ROS se lleva a cabo, además de por antioxidantes no enzimáticos, por la acción concertada de diferentes enzimas, representada esquemáticamente en la figura 43.

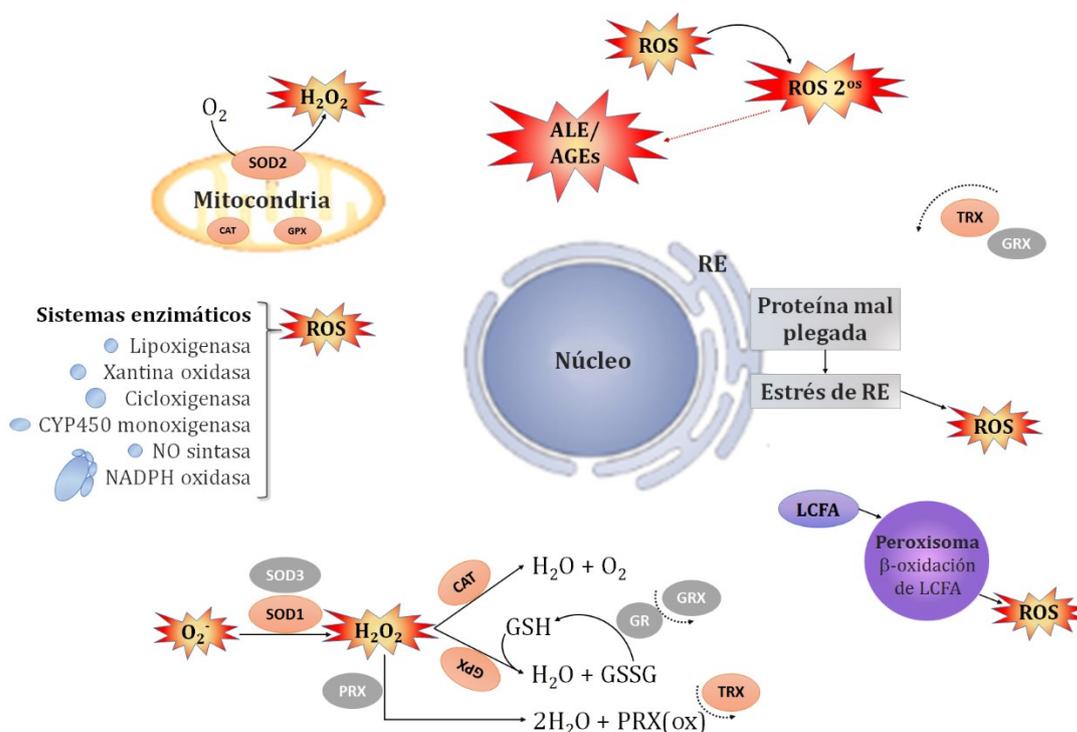


Figura 43. Representación esquemática de la producción y eliminación de especies reactivas del oxígeno en la célula. Se resaltan en rojo-naranja tenue las enzimas antioxidantes cuyas variaciones con la edad fueron exploradas.

Las enzimas antioxidantes SOD (convierten en O_2^- en H_2O_2), catalasa (convierte H_2O_2 en O_2 y H_2O) y GPX (elimina H_2O_2) constituyen la primera línea de defensa antioxidante en el cerebro humano (Salminen y Paul, 2014). La eliminación de H_2O_2 y también de endoperóxidos lipídicos es llevada a cabo por la GPX dependiendo de las reservas de GSH celulares, las cuales se mantienen con la participación de la TRX. De esta manera, existen enzimas detoxificadoras sólo para el O_2^- y el H_2O_2 , con su eliminación se limita la formación de OH^\bullet .

En el presente trabajo, los niveles de SOD1 (citósólica) aumentaron con la edad en la mitad de las regiones exploradas: hipocampo, tálamo, caudado, putamen, corteza visual y sustancia nigra. Por su parte, la SOD2 (mitocondrial) aumentó sus niveles con la edad en corteza parietal, corteza entorrinal, hipocampo, putamen y corteza visual, y los disminuyó en corteza temporal y sustancia nigra. La catalasa mostró un aumento con la edad en las cortezas temporal y visual, y una disminución en tálamo, caudado y sustancia nigra. La GPX4 mostró un aumento con la edad en la mitad de las regiones exploradas: corteza frontal, corteza entorrinal, hipocampo, tálamo, corteza visual y vermis. La TRX1 disminuyó sus niveles con la edad en las cortezas frontal, parietal, temporal y entorrinal, y los aumentó en sustancia nigra. Estas variaciones con la edad en el cerebro se representan esquemáticamente en la figura 44.

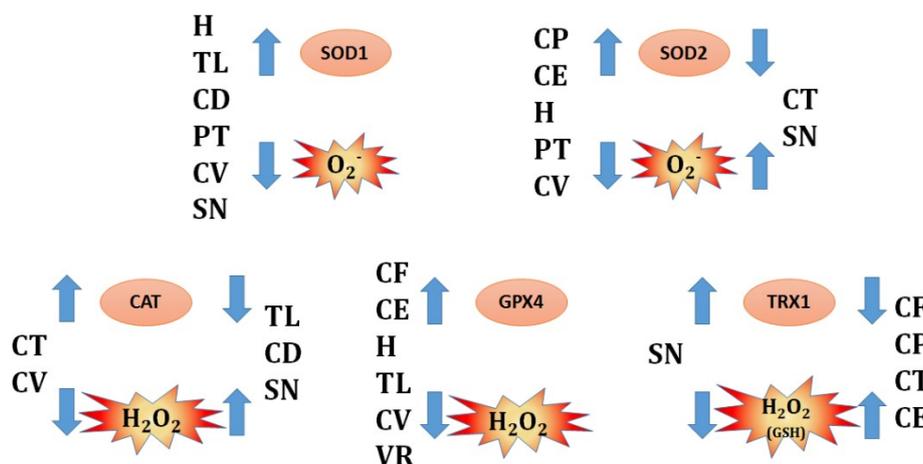


Figura 44. Representación esquemática de las variaciones con la edad en el cerebro de los niveles de las enzimas antioxidantes exploradas y su posible efecto sobre el nivel de radicales libres. El sentido de las flechas indica aumento o disminución con la edad. CF: corteza frontal, CP: corteza parietal, CT: corteza temporal, CE: corteza entorrinal, H: hipocampo, TL: tálamo, CD: núcleo caudado, PT: putamen, CV: corteza visual, SN: sustancia nigra y VR: vermis.

Dos regiones mostraron poca (vermis) o ninguna variación (giro cingulado) con la edad en los niveles de las enzimas antioxidantes exploradas, indicando un control estable de las ROS en las mismas. Estos resultados se alinean con las pocas variaciones detectadas en estas regiones en los marcadores de daño oxidativo (ninguna en los de PL) durante el envejecimiento. Podrían interpretarse como una menor vulnerabilidad de estas regiones al estrés oxidativo y a la acumulación de

daño por el mismo (más allá de sus niveles característicos), debido a la preservación de su balance redox con la edad.

Dado que las enzimas antioxidantes trabajan sinérgicamente en el control de los niveles de ROS celulares, sus modificaciones con la edad y posibles implicaciones se analizan conjuntamente para el resto de las regiones.

Así, con la edad, tres regiones (hipocampo, tálamo y corteza visual) mostraron un aumento en la eliminación de O_2^- (citoplásmico o mitocondrial) acompañado de la de H_2O_2 , sin una disminución de TRX1. En particular, la corteza visual mostró una fuerte respuesta antioxidante enzimática con la edad, con el aumento de los niveles de cuatro de las enzimas analizadas (SOD1, SOD2, CAT y GPX4), sin modificación de los de TRX1. En estas regiones, considerando las enzimas exploradas, parece existir un aumento en la producción de ROS (O_2^- y H_2O_2) que puede ser eliminado, evadiendo los efectos nocivos sobre las biomoléculas de la posible generación de OH^\bullet . Sin embargo, estas variaciones podrían alterar la comunicación redox con resultados aún por investigar.

En el caso del estriado y la sustancia nigra, existió un aumento con la edad del nivel de enzimas encargadas de la eliminación de O_2^- acompañado por la no modificación de los niveles en las que eliminan H_2O_2 (putamen) o por una disminución (catalasa en caudado y sustancia nigra). De esta manera, podría generarse un exceso de H_2O_2 no resuelto que altere el funcionamiento celular mediado por señalización redox y que, además, puede ser transformado en OH^\bullet potenciando el daño oxidativo. En este sentido, se sabe que el exceso de H_2O_2 es un fuerte inductor del fenotipo de senescencia celular (Ben-Porath y Weinberg, 2005).

A señalar, además, parece existir un aumento con la edad en la respuesta antioxidante enzimática mediada por SOD1 en regiones basales del cerebro frente a la no modificación de sus niveles en zonas de corteza (exceptuando visual). De manera interesante, se ha reportado el incremento de los niveles de hierro con la edad en varias regiones basales del cerebro (Ward et al., 2014). Dado la elevada capacidad de este metal para participar en ciclos redox en los que se producen especies reactivas, es posible que mecanismos compensatorios de defensa existan e involucren la expresión de SOD1.

Por otra parte, las regiones de corteza, a excepción de la visual, presentaron una disminución en los niveles de TRX1 con la edad (cortezas frontal, parietal, temporal y entorrinal), además de modificaciones particulares de alguna otra de las enzimas exploradas. Por lo que, la reducción de los niveles de TRX1 parece ser característica de las zonas de corteza en el envejecimiento cerebral. Esta proteína garantiza la regeneración del estado reducido de moléculas antioxidantes que son empleadas por las enzimas eliminadoras de H_2O_2 ; entre ellas, la GRX, esencial para mantener la razón GSH:GSSG celular (Apel y Hirt, 2004). Su disminución podría contribuir a explicar las disminuciones de esta razón reportadas con la edad y la neurodegeneración en el cerebro (Perluigi et al., 2010; Romero et al., 1998). En este sentido, se ha descrito una disminución de TRX1 en la EA (Akterin et al., 2006),

indicando su importancia en la supervivencia celular. Esta enzima es, además, capaz de reparar proteínas dañadas oxidativamente (Arnér y Holmgren, 2000). En células postmitóticas como las neuronas es esencial el control y la eliminación del daño oxidativo, dado la limitada posibilidad de “diluirlo” mediante divisiones celulares. Una disminución en los mecanismos disponibles para su reparación, puede contribuir a la acumulación de proteínas dañadas oxidativamente en estas regiones, susceptibles a los procesos de agregación.

Por otra parte, también se exploraron en estas regiones las variaciones con la edad en los niveles del factor de transcripción Nrf2, un *master regulator* de la respuesta al estrés oxidativo (Niture et al., 2014), previamente relacionado con el envejecimiento (Suh et al., 2004; Valcarcel-Ares et al., 2012). Se detectaron pocas variaciones con la edad en la banda biológicamente relevante de Nrf2 (~100 kDa) (Lau et al., 2012), una disminución en hipocampo y corteza visual, y un aumento en tálamo. Por lo que no existió una relación evidente entre la modificación de sus niveles y los de enzimas antioxidantes que regula. Esto podría relacionarse con el hecho de que los mecanismos de control de la expresión de enzimas antioxidantes son redundantes, compartidos entre diversos factores transcripcionales, lo cual también se evidencia en sus diferentes patrones de variación con la edad y por regiones.

El Nrf2 regula la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes que incluyen a CYP450, mediadores de la síntesis del glutatión, chaperonas, enzimas del metabolismo energético, TRX y subunidades del proteasoma (Valcarcel-Ares et al., 2012). Por lo que su modulación con la edad, en las tres regiones en que ocurrió, podría tener un gran significado funcional. No obstante, es de mencionar, que tales efectos dependen de su translocación al núcleo, no explorado en el presente trabajo, y que podría ser también diferencial entre regiones y con la edad en el cerebro.

Se ha descrito, también, que el Nrf2 es sustrato de caspasas generando un fragmento C-terminal de 30 kDa de interés biológico. El mismo puede inhibir la actividad transcripcional de Nrf2 en forma dosis-dependiente y actuar como molécula efectora *downstream* de caspasa-3 durante la apoptosis (Ohtsubo et al., 1999). Los niveles de este fragmento aumentaron con la edad en las cortezas temporal y entorrinal, planteando la posibilidad de que estos mecanismos contribuyan a los déficits encontrados en las mismas con el envejecimiento y a su elevada susceptibilidad a la neurodegeneración.

6. Componentes de la CTE mitocondrial y VDAC en el envejecimiento en el cerebro

El cerebro representa solo el 2 % del peso corporal, no obstante, es uno de los órganos con mayor tasa metabólica del organismo, consumiendo el 20 % del oxígeno total corporal en reposo (Magistretti, 2000; Rink et al., 2011). De esta manera, la generación de energía metabólica en el mismo es altamente dependiente de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Además, este proceso se considera la principal

fuelle de ROS en la célula, lo que fundamenta la importancia de su adecuada regulación para la supervivencia celular. Por ello, se exploraron las variaciones regionales en el cerebro con la edad en los niveles de componentes de la CTE mitocondrial y del marcador de mitocondrias VDAC.

Existió una disminución de los niveles de VDAC en tres de las regiones exploradas: corteza frontal, corteza entorrinal y sustancia nigra; sugiriendo una disminución en el número de mitocondrias disponibles para producir ATP o mitocondrias alteradas en estas regiones. Coincidentemente, son regiones altamente vulnerables a la neurodegeneración, especialmente afectadas en la EA las dos primeras y en la EP la última; las enfermedades neurodegenerativas más frecuentemente asociadas a la edad en el SNC (Mattson y Magnus, 2006). También, se alinean con los resultados previamente descritos para las mismas de una disfunción mitocondrial con alteraciones en la morfología y perturbación de la homeostasis energética en la neurodegeneración y el envejecimiento (Onyango et al., 2010; Swerdlow, 2011).

Por otra parte, en general, existió una amplia variación regional y con la edad en los niveles de las subunidades exploradas de los complejos mitocondriales del I al IV (de algunas de ellas: disminución en corteza frontal, corteza parietal, corteza entorrinal, hipocampo y corteza visual; aumento en giro cingulado, corteza temporal, tálamo y caudado; ambos en vermis) y poca en el CV (disminución en las cortezas parietal y temporal). Solo dos regiones no mostraron variaciones con la edad a nivel de complejos de la CTE mitocondrial (putamen y sustancia nigra).

Estos datos muestran que la regulación del nivel de los complejos de la CTE, al menos del I al IV, se modifica ampliamente, respecto a regiones, en el cerebro humano con la edad. A resaltar, el hipocampo mostró una clara disminución del metabolismo energético con la edad, que afectó a tres de los complejos de la CTE mitocondrial (CI-III), en contraste con el patrón inverso en giro cingulado (aumento con la edad de CI-III). Estos cambios se alinean con el sentido del daño por glicoxidación a proteínas en estas regiones, indicando que, al menos en parte, el mismo refleja la dinámica del metabolismo energético en las mismas. Además, dos regiones (cortezas parietal y temporal) mostraron una disminución en los niveles del CV con la edad, responsable de la síntesis de ATP, lo cual podría traducirse en una baja disponibilidad del mismo que comprometa las reservas de energía celulares.

Estos resultados coinciden con la ampliamente reportada disfunción mitocondrial asociada a la edad, una de las marcas moleculares del envejecimiento (López-Otín et al., 2013), la cual resulta una característica generalizada en el cerebro. La amplia variación en los niveles de los integrantes de la CTE mitocondrial puede resultar en un déficit bioenergético celular, pero además tener implicaciones en la producción de los niveles de ROS celulares. Dado que el acoplamiento de sus integrantes es necesario para un eficiente funcionamiento de la misma, variaciones en componentes particulares podrían afectar el transporte de electrones y alterar la tasa de generación de ROS mitocondrial.

7. Componentes de la vía de respuesta celular NF- κ B y envejecimiento en el cerebro

El papel del factor de transcripción redox sensible NF- κ B en el mantenimiento del correcto funcionamiento celular es destacable, dado que coordina la transcripción de múltiples genes reguladores de la inmunidad, la inflamación, el desarrollo, la proliferación y la supervivencia celular (Trachootham et al., 2008). Dada la relevancia de estos procesos en el envejecimiento, se exploraron las variaciones en los niveles de algunos de sus componentes (p65, p50 e I κ B α) con la edad en el cerebro.

Se detectaron pocas variaciones con la edad y en cuanto a regiones cerebrales en los niveles de los componentes de la vía de respuesta NF- κ B explorados. La proteína NF- κ B p65 mostró una disminución con la edad en tres regiones (corteza temporal, corteza entorrinal y caudado), NF- κ B p50 un aumento en tres regiones (corteza frontal, giro cingulado y putamen), e I κ B α una disminución en cuatro de las regiones cerebrales exploradas (giro cingulado, hipocampo, caudado y putamen). En conjunto, giro cingulado, caudado y putamen parecen ser las regiones en las que más comúnmente se modifica el nivel de los componentes de la vía NF- κ B con la edad, sugiriendo una participación dinámica de la misma en la regulación.

La activación de esta vía es constitutiva en el cerebro (Kaltschmidt et al., 1994), teniendo efectos diversos dependiendo del tipo celular. Se ha observado que en el cerebro la señalización por NF- κ B se activa en procesos fisiológicos como la neurogénesis del hipocampo, el crecimiento neuronal, el aprendizaje y la memoria (Crampton y O'Keeffe, 2013), y también en patológicos como en la polarización funcional de la microglia (Brifault et al., 2015) y los astrocitos (Jha et al., 2016) hacia un fenotipo proinflamatorio en enfermedades neurodegenerativas (Frakes et al., 2014; Ghosh et al., 2007). Estas funciones podrían verse modificadas durante el envejecimiento en las regiones en que existió una variación en los niveles de los componentes de esta vía con la edad. La exploración de los tipos celulares en los que se modifican sus niveles con el envejecimiento puede contribuir a la comprensión de sus efectos en el mismo.

Por otra parte, las ROS parecen tener efectos paradójicos en la regulación de NF- κ B, pudiendo activar o inhibir su actividad en dependencia del nivel de ROS, tipo de estímulo y tipo celular. El aumento moderado de ROS a menudo conduce a la activación de NF- κ B; por el contrario, un aumento severo de ROS puede inactivarlo conduciendo a la muerte celular (Trachootham et al., 2008). Es posible, que en regiones con elevado daño oxidativo con la edad (ej. corteza frontal) ocurran eventos de inactivación de esta vía perjudiciales para la supervivencia celular.

8. Variaciones regionales en procesos moleculares y funcionales en el envejecimiento en el cerebro

A lo largo del presente trabajo se han identificado variaciones con la edad en diferentes moléculas y regiones cerebrales, muchas de las cuales se corroboran tras ajustar el posible efecto del azar sobre comparaciones múltiples mediante FDR. Lo cual apoya la existencia de dichas modificaciones con el envejecimiento en el cerebro. Sin embargo, el análisis de proteínas (genes) individuales diferencialmente expresadas permite dilucidar solo parcialmente los mecanismos moleculares subyacentes al proceso biológico de interés. Por esta razón, resulta muy informativo explorar las vías de señalización celulares y los procesos moleculares enriquecidos (diferencialmente expresados) en los grupos de estudio (ME/AE) y entre condiciones (regiones) empleando el conjunto global de los datos obtenido.

En este sentido, como herramienta de análisis, el programa IPA ayuda a explorar conjuntos de datos de entrada, basándose en relaciones de enriquecimiento e interacción de genes (proteínas) contenidas en la base de datos manualmente curada Ingenuity® Knowledge Base (Krämer et al., 2014). Produce características de los conjuntos de datos introducidos con resultados estadísticos, como las principales funciones de las biomoléculas, vías canónicas, etc. Para generarlas interactúa con el conjunto de datos específico superponiéndolos en una red molecular global desarrollada a partir de la información almacenada en la Ingenuity® Knowledge Base (Krämer et al., 2014). Así, el análisis mediante IPA permitió la exploración en conjunto de los resultados, así como extender y traducir la información contenida a vías de interés con un potencial significado funcional en el proceso de envejecimiento en el cerebro.

El análisis núcleo de IPA confirmó que las moléculas con variaciones significativas de sus niveles con la edad participan en la señalización de las vías canónicas disfunción mitocondrial, fosforilación oxidativa y relacionadas con la producción de ROS y el estrés oxidativo. Resultado esperado dado que se seleccionaron en este sentido. Sin embargo, también indican que sus patrones de variación con la edad involucran el funcionamiento de la regulación mediada por MIF de glucocorticoides y de la inmunidad innata (corteza frontal, corteza parietal y giro cingulado), y la señalización mediada por PEDF (corteza entorrinal y núcleo caudado).

El factor de transcripción MIF es una proteína multifacética con funciones en la inmunidad innata y adquirida, la inflamación y la supervivencia celular. Presenta actividad proinflamatoria, al ser un regulador negativo de los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los glucocorticoides; pero también, posee actividad redox lo cual le permite inhibir la apoptosis inducida por estrés oxidativo y facilita la entrada de glucosa y su metabolismo durante la deprivación energética (Leyton-Jaimes et al., 2017). En el cerebro de ratas se ha descrito su expresión basal en las neuronas corticales y del hipocampo, el hipotálamo y el cerebelo

(Bacher et al., 1998). En la EA, en particular, se ha descrito tanto su aumento como disminución, con lo que se propone un papel de esta molécula en la misma, pero quedan por explorar los mecanismos de acción específicos (Leyton-Jaimes et al., 2017). Por su parte, PEDF, es un potente factor neurotrófico ampliamente distribuido en el cerebro humano, incluidas las regiones exploradas (Tombran-Tink et al., 1996). Promueve la supervivencia neuronal en el SNC al proteger de la citotoxicidad por glutamato y el daño oxidativo (Yabe et al., 2010). También, se ha descrito su aumento en neuronas y astrocitos corticales de pacientes con EA, lo cual se ha interpretado como un mecanismo compensatorio (Yamagishi et al., 2004). Es posible que estas moléculas también jueguen un papel relevante en los cambios asociados al envejecimiento y la vulnerabilidad regional en el cerebro, con lo que su investigación en este sentido resulta de interés.

Por su parte, el análisis de comparación IPA predice que las vías canónicas respuesta de fase aguda, señalización PI3K/Akt, señalización mediada por PPAR y regulación mediada por MIF de la inmunidad innata (previamente comentado) presentan variaciones diferenciales entre regiones cerebrales en su tendencia a la activación o la inhibición durante el envejecimiento. Señalando que las mismas pueden ser claves para definir perfiles de vulnerabilidad regional en el cerebro con el envejecimiento.

La señalización de respuesta de fase aguda responde a cambios sistémicos causados por un estado inflamatorio agudo (ej. controlados por IL-1 e IL-6), protegiendo del daño por el mismo al modificar dicha respuesta mediante la variación del tráfico celular y la liberación de mediadores de fase aguda (Kushner y Rzewnicki, 1994). La vía PI3K/Akt regula diferentes procesos involucrados en la supervivencia a partir de, entre otras señales, el estado bioenergético celular, y se considera muy relevante en el proceso de envejecimiento (López-Otín et al., 2013; Rollo 2010). En el SNC, se expresa predominantemente en neuronas y tiene impacto funcional sobre la plasticidad sináptica, la neurotransmisión, la proteostasis, el control metabólico y la respuesta al estrés (Neill, 2013). Por su parte, los receptores PPAR son activados por diferentes sustancias (ej. ácidos grasos y drogas hipolipídicas), produciendo la proliferación de los peroxisomas, y participando en la regulación de procesos como la inflamación, la homeostasis de la glucosa y la β -oxidación de ácidos grasos (Ahmadian et al., 2013). En conjunto, la modificación diferencial de estas vías apoya la relevancia de los procesos de inflamación, metabolismo energético y lipídico en definir el fenotipo de envejecimiento en el cerebro.

El análisis del impacto de estas modificaciones en la señalización sobre procesos funcionales y enfermedades mostró que durante el envejecimiento en el cerebro se tiende a la activación de procesos relacionados con el daño en el SNC (ej. apoptosis y degeneración neuronal) en las cortezas frontal, parietal y temporal, y en menor medida en la sustancia nigra. Mientras tanto, las regiones giro cingulado, putamen, corteza visual y vermis muestran una tendencia a la protección ante el daño dada por la inactivación de procesos relacionados con el mismo. Por su parte, las regiones

corteza entorrinal, hipocampo, tálamo y núcleo caudado mostraron un perfil mixto a partir de la información de los datos disponibles. Este hecho puede reflejar la participación de moléculas no exploradas en definir el fenotipo de envejecimiento en estas regiones, pero también una elevada complejidad o menor homogeneidad metabólica en estas regiones.

De esta manera, existe un perfil de vulnerabilidad regional asociado al envejecimiento en el cerebro, discernible a partir del perfil de expresión de las moléculas exploradas, involucradas en el balance redox celular y/o susceptibles de ser reguladas por el mismo. El mismo refleja en cierta medida, en su tendencia al daño, regiones muy vulnerables a la neurodegeneración asociada a la edad en el cerebro, apoyando la relevancia de los procesos redox en el envejecimiento y la susceptibilidad a la neurodegeneración.

VI. CONCLUSIONES

1. Se identificaron 30 proteínas susceptibles de ser lipoxidadas por NKT con patrones de modificación respecto a la edad y regionales específicos; existió un marcado incremento de formas lipoxidadas de estas proteínas con la edad en CF, CP y GC. Su vulnerabilidad a la lipoxidación se relaciona, al menos en parte, con patrones de localización, estructurales y funcionales; y participan en procesos claves para la supervivencia celular y el funcionamiento cerebral que podrían verse afectados por su modificación estructural. El nivel global de modificación por NKT se relacionó con el nivel de oligómeros solubles en las regiones con mayor aumento de la lipoxidación con la edad de proteínas específicas (CF, CP y GC), lo cual podría favorecer procesos de agregación.
2. La lipoxidación proteica mediada por NKT y MDA presenta cambios con la edad que ocurren de manera específica tanto para la región cerebral como el marcador estudiado. Los niveles globales de NKT se modificaron con la edad solo en 4 regiones cerebrales (CF, TL, CVi y SN), en contraste los de MDA lo hicieron en 7 de ellas (CF, CP, CT, CE, H, TL y PT), siendo este último el marcador que experimenta más acusadamente cambios asociados a la edad. Existe mayormente un aumento de la lipoxidación con la edad en las regiones en que varían sus niveles (excepto NKT en TL y MDA en CT y CE), que es posible detectar en CF con cualquiera de estos marcadores. Las particularidades de las modificaciones con la edad podrían reflejar, entre otros factores, perfiles metabólicos de ácidos grasos.
3. Los niveles de las enzimas COX-2 y CYP2J2 presentan variaciones con la edad y regionales en el cerebro. Existió una modificación de los niveles de COX-2 con la edad en 5 regiones (aumento en CF, CP, CT, H y SN) y de los de CYP2J2 también en 5 regiones (disminución en CF, CT, H y TL; aumento en CD); siendo el aumento de COX-2 característico del envejecimiento. Considerando los efectos generales pro- (COX-2) y anti- (CYP2J2) inflamatorios descritos de estas enzimas: CF, CT e H podrían ser regiones particularmente susceptibles a alteraciones inflamatorias con la edad que involucren el metabolismo lipídico. No fue posible establecer una relación general entre los niveles de expresión de estas enzimas y los de marcadores de lipoxidación independiente de la edad, aunque es posible que exista entre los niveles de MDA y COX-2 en H.
4. Los niveles globales de glicoxidación proteica tienden a aumentar durante el envejecimiento con patrones regionales específicos (CEL en CF, CT, CD y VR; CML en CF, CP, GC y CVi), a excepción de una disminución en H (CML). Varias regiones mostraron aumentos con la edad en los marcadores de glicoxidación no coincidentes con las variaciones de los de lipoxidación (GC, CT, CD y VR); es posible que el daño a proteínas por glicoxidación juegue un papel más relevante en estas regiones que la lipoxidación. En particular, H mostró un aumento de MDA y una disminución de CML con la edad, lo cual podría reflejar una disminución del metabolismo de carbohidratos.

5. Se encontró una amplia modulación región-específica con la edad del nivel de enzimas antioxidantes. De acuerdo a la modificación de las enzimas exploradas (SOD1, SOD2, catalasa, GPX4 y TRX1) con la edad: GC y VR resultan regiones estables; H, TL y CVi regiones con defensas ante O_2^- y H_2O_2 ; CD, PT y SN regiones con defensa ante el O_2^- donde podría existir un exceso de H_2O_2 ; y CF, CP, CT y CE regiones con disminución de TRX1 que podría incidir en la disminución de los niveles de GSH. Destacan la fuerte respuesta antioxidante en CVi, el aumento preferencial de SOD1 en zonas basales y la disminución de TRX1 en cortezas. Los niveles del factor de transcripción Nrf2 mostraron variaciones región-específicas con la edad de potencial significado funcional: la banda de ~100 kDa (induce la expresión de genes diana) disminuyó en H y CVi, y aumentó en TL; el fragmento C-terminal de 30 kDa (pro-apoptótico) aumentó en CT y CE, y disminuyó en CF y CP.
6. Se detectaron variaciones en los niveles de componentes de la CTE mitocondrial y del marcador de mitocondrias VDAC con patrones regionales específicos. Existió disminución de VDAC en CF, CE y SN, sugiriendo una disminución de las mitocondrias disponibles para sintetizar ATP. En general, existió una amplia variación con la edad y regional en los niveles de los complejos de la CTE del I al IV (modificado algunos de ellos en CF, CP, CT, GC, CE, H, TL, CD, CVi y VR; destacan el aumento de CI a CIII en GC y su disminución en H) y poca en el CV (disminución en CP y CT); dos regiones no mostraron variaciones a nivel de complejos (PT y SN). Estos datos ilustran las particularidades en el cerebro de la disfunción mitocondrial característica del envejecimiento.
7. Se detectaron pocas variaciones con la edad y en cuanto a regiones cerebrales en los niveles de los componentes de la vía de respuesta NF- κ B explorados. La p65 mostró una disminución en CT, CE y CD, p50 un aumento en CF, GC y PT, e I κ B α una disminución en GC, H, CD y PT. En conjunto: GC, CD y PT resultan las regiones en las que más se modifican los componentes de la vía NF- κ B con la edad, sugiriendo una participación dinámica de la misma en la regulación.
8. Las moléculas modificadas con la edad en el cerebro participan en las vías canónicas disfunción mitocondrial, fosforilación oxidativa, relacionadas con la producción de ROS y estrés oxidativo, regulación por MIF de glucocorticoides y de la inmunidad innata, y señalización por PEDF. Se predicen con activación diferencial entre regiones las vías respuesta de fase aguda, señalización PI3K/Akt, señalización por PPAR y regulación por MIF de la inmunidad innata. El conjunto de datos permitió establecer un perfil de vulnerabilidad regional con el envejecimiento de regiones con tendencia al daño en el SNC (CF, CP, CT y SN), regiones con protección (GC, PT, CVi y VR) y regiones de comportamiento mixto (CE, H, TL y CD); la tendencia al daño refleja, en parte, regiones vulnerables a la neurodegeneración, apoyando la relevancia de los procesos redox en el envejecimiento y la susceptibilidad a la neurodegeneración.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Agadjanyan ZS, Dmitriev LF, Dugin SF. (2005). A new role of phosphoglucose isomerase. Involvement of the glycolytic enzyme in aldehyde metabolism. *Biochem.*, 70(11), 1251–1255.
- Agarwal S, Sohal RS. (1995). Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging. *Mech. Ageing Dev.*, 85(1), 55–63.
- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.*, 19(5), 557–566.
- Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. (1997). N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.*, 324, 565–570.
- Akterin S, Cowburn RF, Miranda-Vizuete A, Jiménez A, Bogdanovic N, Winblad B, Cedazo-Minguez A. (2006). Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in β -amyloid toxicity and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.*, 13(9), 1454–1465.
- Ames BN. (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic. Res. Commun.*, 7(3–6), 121–128.
- Andrews-Hanna JR, Snyder AZ, Vincent JL, Lustig C, Head D, Raichle ME, Buckner RL. (2007). Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron*, 56(5), 924–935.
- Anzai K, Ogawa K, Goto Y, Senzaki Y, Ozawa T, Yamamoto H. (1999). Oxidation-dependent changes in the stability and permeability of lipid bilayers. *Antioxid. Redox Signal.*, 1(3), 339–347.
- Apel K, Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55(1), 373–399.
- Arnér ES, Holmgren A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, 267(20), 6102–6109.
- Aso E, Ferrer I. (2013). Potential therapeutic strategies to prevent the progression of Alzheimer to disease states. En I Zerr (Ed.), *Understanding Alzheimer's Disease* (pp. 251–302). Rijeka: InTech.
- Avery SV. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J.*, 434(2), 201–210.
- Axmacher N, Mormann F, Fernandez G, Elger CE, Fell J. (2006). Memory formation by neuronal synchronization. *Brain Res.*, 52(1), 170–182.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, 360438.
- Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Dhabhar FS, Mu W, Metz CN, ..., Bucala R. (1998). MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol. Med.*, 4, 217–230.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, ... van Deursen JM. (2011). Clearance of p16^{Ink4a}-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232–236.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120, 483–495.

- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(25), 16093–16098.
- Barja G. (2004). Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 79(2), 235–251.
- Barja G, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M. (1994). Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radic. Res.*, 21(5), 317–327.
- Barja G, Herrero A. (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.*, 14(2), 312–318.
- Barros LF, Deitmer JW. (2010). Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Res. Rev.*, 63(1–2), 149–159.
- Bartzokis G, Cummings JL, Sultzer D, Henderson VW, Nuechterlein KH, Mintz J. (2003). White matter structural integrity in healthy aging adults and patients with Alzheimer disease: a magnetic resonance imaging study. *Arch. Neurol.*, 60(3), 393–398.
- Bartzokis G, Lu PH, Geschwind D, Tingus K, Huang D, Mendez MF, Edwards N, Mintz J. (2007). Apolipoprotein E affects both myelin breakdown and cognition: implications for age-related trajectories of decline into dementia. *Biol. Psychiatry*, 62(12), 1380–1387.
- Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. (2012). The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes*, 61(6), 1315–1322.
- Beckman KB, Ames BN. (1997). Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.*, 272(32), 19633–19636.
- Behrens TEJ, Johansen-Berg H, Woolrich MW, Smith SM, Wheeler-Kingshott CAM, Boulby PA, ... Matthews PM. (2003). Non-invasive mapping of connections between human thalamus and cortex using diffusion imaging. *Nat. Neurosci.*, 6(7), 750–757.
- Ben-Porath I, Weinberg RA. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37(5), 961–976.
- Benassi B, Fanciulli M, Fiorentino F, Porrello A, Chiorino G, Loda M, ... Biroccio A. (2006). c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Mol. Cell*, 21(4), 509–519.
- Benjamini Y, Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 57(1), 289–300.
- Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z. (2003). The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomed. Pharmacother.*, 57(5–6), 203–208.
- Bernoud-Hubac N, Davies SS, Boutaud O, Montine TJ, Roberts LJ. (2001). Formation of highly reactive γ -ketoaldehydes (neuroketals) as products of the neuroprostate pathway. *J. Biol. Chem.*, 276(33), 30964–30970.
- Bernoud-Hubac N, Roberts LJ. (2002). Identification of oxidized derivatives of

- neuroketals. *Biochemistry*, 41(38), 11466–11471.
- Bi X, Yong AP, Zhou J, Gall CM, Lynch G. (2000). Regionally selective changes in brain lysosomes occur in the transition from young adulthood to middle age in rats. *Neuroscience*, 97(2), 395–404.
- Biagioli M, Pinto M, Cesselli D, Zaninello M, Lazarevic D, Roncaglia P, ... Gustincich S. (2009). Unexpected expression of α - and β -globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(36), 15454–15459.
- Bigelow DJ, Squier TC. (2005). Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1703(2), 121–134.
- Bindea G, Galon J, Mlecnik B. (2013). CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics*, 29(5), 661–663.
- Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, ... Galon J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plugin to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25(8), 1091–1093.
- 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(10), 1133–1138.
- Blalock EM, Chen K, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, Landfield PW. (2003). Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J. Neurosci.*, 23(9), 3807–3819.
- Blasco MA. (2007). Telomere length, stem cells and aging. *Nat. Chem. Biol.*, 3(10), 640–649.
- Bodles AM, Barger SW. (2004). Cytokines and the aging brain. What we don't know might help us. *Trends Neurosci.*, 27(10), 621–626.
- Bohr VA. (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 32(9), 804–812.
- Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. (2004). The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.*, 125(10–11), 811–826.
- Bourre JM. (2006). Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 2. Macronutrients. *J. Nutr. Health Aging*, 10(5), 386–399.
- Boveris A, Chance B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, 134(3), 707–716.
- Boveris A, Oshino N, Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 128(3), 617–630.
- Braak H, Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.*, 239–259.
- Braak H, Braak E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging*, 18(4), 351–357.

- Brifault C, Gras M, Liot D, May V, Vaudry D, Wurtz O. (2015). Delayed pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide delivery after brain stroke improves functional recovery by inducing M2 microglia/macrophage polarization. *Stroke*, 46(2), 520–528.
- Broadley SA, Hartl FU. (2009). The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Lett.*, 583(16), 2647–2653.
- Brody H. (1955). Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.*, 102(2), 511–516.
- Brosens JJ, Wilson MSC, Lam EWF. (2009). FOXO transcription factors: from cell fate decisions to regulation of human female reproduction. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 665, 227–241.
- Bunn HF, Higgins PJ. (1981). Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, 213(4504), 222–224.
- Burgering BMT, Kops GJPL. (2002). Cell cycle and death control: long live forkheads. *Trends Biochem. Sci.*, 27(7), 352–360.
- Burtner CR, Kennedy BK. (2010). Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11(8), 567–578.
- Butterfield DA, Bader Lange ML, Sultana R. (2010). Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1801(8), 924–929.
- Butterfield DA, Kanski J. (2001). Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech. Ageing Dev.*, 122(9), 945–962.
- Butterfield DA, Perluigi M, Reed T, Muharib T, Hughes CP, Robinson RAS, Sultana R. (2012). Redox proteomics in selected neurodegenerative disorders: from its infancy to future applications. *Antioxid. Redox Signal.*, 17(11), 1610–1655.
- Butterfield DA, Reed T, Perluigi M, De Marco C, Coccia R, Cini C, Sultana R. (2006). Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neurosci. Lett.*, 397(3), 170–173.
- Butterfield DA, Stadtman ER. (1998). Protein oxidation processes in aging brain. In JW Geddes, MP Mattson (Eds.), *Advances in Cell Aging and Gerontology* (Vol. 2, pp. 161–191). Amsterdam: Elsevier.
- Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Lentile R, Stella AMG, Butterfield DA. (2010). Redox homeostasis and cellular stress response in aging and neurodegeneration. *Methods Mol. Biol.*, 610, 285–308.
- Calderwood SK, Murshid A, Prince T. (2009). The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging. A mini-review. *Gerontology*, 55(5), 550–558.
- Cameron HA, McKay RD. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat. Neurosci.*, 2(10), 894–897.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(9), 729–740.
- Carrasco E, Casper D, Werner P. (2007). PGE2 receptor EP1 renders dopaminergic neurons selectively vulnerable to low-level oxidative stress and direct PGE2

- neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.*, 85(14), 3109–3117.
- Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, ... Butterfield DA. (2002). Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J. Neurochem.*, 82(6), 1524–1532.
- Cefalu CA. (2011). Theories and mechanisms of aging. *Clin. Geriatr. Med.*, 27(4), 491–506.
- Chang C, Wu G, Gao P, Yang L, Liu W, Zuo J. (2014b). Upregulated Parkin expression protects mitochondrial homeostasis in DJ-1 knockdown cells and cells overexpressing the DJ-1 L166P mutation. *Mol. Cell. Biochem.*, 387(1–2), 187–195.
- Chang YT, Chang W, Tsai N, Huang C, Kung C, Su YJ, ... Lu C. (2014a). The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review. *Biomed Res. Int.*, 2014, 1–14.
- Chen C, Magee JC, Bazan NG. (2002). Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J. Neurophysiol.*, 87(6), 2851–2857.
- Chung HY, Lee EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, ... Yu BP. (2011). Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J. Dent. Res.*, 90(7), 830–840.
- Ciechanover A, Kwon YT. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.*, 47(3), e147.
- Circu ML, Aw TY. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 48(6), 749–762.
- Clements CM, McNally RS, Conti BJ, Mak TW, Ting JPY. (2006). DJ-1, a cancer and Parkinson's disease associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(41), 15091–15096.
- Collado M, Blasco MA, Serrano M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 130(2), 223–233.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, ... Weindruch R. (2009). Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325(5937), 201–204.
- Conboy IM, Rando TA. (2012). Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches. *Cell Cycle*, 11(12), 2260–2267.
- Conde JR, Streit WJ. (2006). Microglia in the aging brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 65(3), 199–203.
- Connor JR, Menzies SL. (1996). Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia*, 17(2), 83–93.
- Coubard OA, Ferrufino L, Boura M, Gripon A, Renaud M, Bherer L. (2011). Attentional control in normal aging and Alzheimer's disease. *Neuropsychology*, 25(3), 353–367.
- Crampton SJ, O'Keeffe GW. (2013). NF-κB: emerging roles in hippocampal development and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 45(8), 1821–1824.

- Cutler RG. (1984). Antioxidants, aging and longevity. En WA Pryor (Ed.), *Free Radicals and Biology* (Vol. 6, pp. 371–428). Cambridge, MA: Academic Press.
- Cutler RG. (1991). Antioxidants and aging. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53(Suppl. 1), 373S–379S.
- D'Autréaux B, Toledano MB. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(10), 813–824.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*, 329(1–2), 23–38.
- Davies MJ. (2012). Oxidative damage to proteins. En C Chatgililoglu, A Studer (Eds.), *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials* (pp. 1425–1458). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd.
- Davis SW, Dennis NA, Buchler NG, White LE, Madden DJ, Cabeza R. (2009). Assessing the effects of age on long white matter tracts using diffusion tensor tractography. *Neuroimage*, 46(2), 530–541.
- De Bernardez Clark E. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(2), 157–163.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.*, 1–18.
- Debette S, Seshadri S, Beiser A, Au R, Himali JJ, Palumbo C, ... DeCarli C. (2011). Midlife vascular risk factor exposure accelerates structural brain aging and cognitive decline. *Neurology*, 77(5), 461–468.
- DeCarli C. (2013). Clinically asymptomatic vascular brain injury: a potent cause of cognitive impairment among older individuals. *J. Alzheimers. Dis.*, 33(Suppl. 1), S417–S426.
- DeCarli C, Fletcher E, Ramey V, Harvey D, Jagust WJ. (2005b). Anatomical mapping of white matter hyperintensities (WMH): exploring the relationships between periventricular WMH, deep WMH, and total WMH burden. *Stroke*, 36(1), 50–55.
- DeCarli C, Massaro J, Harvey D, Hald J, Tullberg M, Au R, ... Wolf PA. (2005a). Measures of brain morphology and infarction in the framingham heart study: establishing what is normal. *Neurobiol. Aging*, 26(4), 491–510.
- Dei R, Takeda A, Niwa H, Li M, Nakagomi Y, Watanabe M, ... Sobue G. (2002). Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 104(2), 113–122.
- Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR. (2007). Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell*, 6(3), 275–284.
- Dohm CP, Kermer P, Baumhr M. (2008). Aggregopathy in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic implication. *Neurodegener. Dis.*, 5(6), 321–338.
- Donato AJ, Pierce GL, Lesniewski LA, Seals DR. (2009). Role of NF- κ B in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. *Aging (Albany. NY)*, 1(8), 678–680.
- Dong X, Milholland B, Vijg J. (2016). Evidence for a limit to human lifespan.

- Nature*, 538(7624), 257–259.
- Droste P, Frenzel A, Steinwand M, Pelat T, Thullier P, Hust M, ... Dübel S. (2015). Structural differences of amyloid- β fibrils revealed by antibodies from phage display. *BMC Biotechnol.*, 15(1), 57.
- Eckl PM. (2003). Genotoxicity of HNE. *Mol. Aspects Med.*, 24(4–5), 161–165.
- Eisenstein M. (2009). Location, location, location. *Nat. Methods*, 6(9), 630–631.
- England K, Cotter TG. (2005). Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Rep.*, 10(5), 237–245.
- Erraji-Benchekroun L, Underwood MD, Arango V, Galfalvy H, Pavlidis P, Smyrniotopoulos P, ... Sibille E. (2005). Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life. *Biol. Psychiatry*, 57(5), 549–558.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, 11(1), 81–128.
- Farisello P, Boido D, Nieuws T, Medrihan L, Cesca F, Valtorta F, ... Benfenati F. (2013). Synaptic and extrasynaptic origin of the excitation/inhibition imbalance in the hippocampus of synapsin I/II/III knockout mice. *Cereb. Cortex*, 23(3), 581–593.
- Farooqui AA, Horrocks LA. (1998). Lipid peroxides in the free radical pathophysiology of brain diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 18(6), 599–608.
- Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, ... Morley JE. (2003). The antioxidants α -lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J. Neurochem.*, 84(5), 1173–1183.
- Fernández-Moriano C, González-Burgos E, Gómez-Serranillos MP. (2015). Mitochondria-targeted protective compounds in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2015, 1–30.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, ... Beal MF. (1997). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.*, 69, 2064–2074.
- Ferrer I. (2012). Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Prog. Neurobiol.*, 97(1), 38–51.
- Ferrer I, Gómez A, Carmona M, Huesa G, Porta S, Riera-Codina M, ... Aso E. (2011). Neuronal hemoglobin is reduced in Alzheimer's disease, argyrophilic grain disease, Parkinson's disease, and dementia with Lewy bodies. *J. Alzheimer's Dis.*, 23(3), 537–550.
- Ferrer I, Martínez A, Boluda S, Parchi P, Barrachina M. (2008). Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell Tissue Bank.*, 9(3), 181–194.
- Ferrer I, Santpere G, Arzberger T, Bell J, Blanco R, Boluda S, ... Kretschmar H. (2007). Brain protein preservation largely depends on the postmortem storage temperature: implications for study of proteins in human neurologic diseases and management of brain banks: a BrainNet Europe Study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 66(1), 35–46.
- Flood JF, Morley JE. (1993). Age-related changes in footshock avoidance acquisition

- and retention in senescence accelerated mouse (SAM). *Neurobiol. Aging*, 14(2), 153–157.
- Flores I. (2005). Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science*, 309(5738), 1253–1256.
- Floyd RA, Hensley K. (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging*, 23(5), 795–807.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD. (2010). Extending healthy life span – from yeast to humans. *Science*, 328(5976), 321–326.
- Forsberg LA, Rasi C, Razzaghian HR, Pakalapati G, Waite L, Thilbeault KS, ... Dumanski JP. (2012). Age-related somatic structural changes in the nuclear genome of human blood cells. *Am. J. Hum. Genet.*, 90(2), 217–228.
- Fotinos AF, Snyder AZ, Girton LE, Morris JC, Buckner RL. (2005). Normative estimates of cross-sectional and longitudinal brain volume decline in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 64(6), 1032–1039.
- Fraga MF, Esteller M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.*, 23(8), 413–418.
- Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, ... Kaspar BK. (2014). Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*, 81(5), 1009–1023.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. (2006). Inflammaging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 908(1), 244–254.
- Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, ... Jensen LJ. (2013). STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.*, 41(Database issue), D808–D815.
- Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. (2009). Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol. Neurodegener.*, 4(1), 47.
- Fraser HB, Khaitovich P, Plotkin JB, Pääbo S, Eisen MB. (2005). Aging and gene expression in the primate brain. *PLoS Biol.*, 3(9), e274.
- Frost B, Diamond MI. (2009). Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, 11(3), 155–159.
- Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. (1996). The advanced glycation end product, N-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.*, 271(17), 9982–9986.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.*, 15(6), 1583–1606.
- Fuster JM. (1999). Synopsis of function and dysfunction of the frontal lobe. *Acta Psychiatr. Scand.*, 99(s395), 51–57.
- García-Ruiz I, de la Torre P, Díaz T, Esteban E, Fernández I, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. (2002). Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.*, 277(34), 30551–30558.

- Ge Y, Grossman RI, Babb JS, Rabin ML, Mannon LJ, Kolson DL. (2002). Age-related total gray matter and white matter changes in normal adult brain. Part I: volumetric MR imaging analysis. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.*, 23(8), 1327–1333.
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119(3097), 623–626.
- Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, ... Pahan K. (2007). Selective inhibition of NF- κ B activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(47), 18754–18759.
- Giordano G, White CC, Costa LG. (2011). Assessment of glutathione homeostasis. *Methods Mol. Biol.*, 758, 205–214.
- Glabe CG. (2004). Conformation-dependent antibodies target diseases of protein misfolding. *Trends Biochem. Sci.*, 29(10), 542–547.
- Glabe CG. (2006). Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging*, 27(4), 570–575.
- Gleichmann M, Mattson MP. (2011). Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid. Redox Signal.*, 14(7), 1261–1273.
- Gold G, Kövari E, Corte G, Herrmann FR, Canuto A, Bussi ere T, ... Giannakopoulos P. (2001). Clinical validity of A beta-protein deposition staging in brain aging and Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60(10), 946–952.
- Goldsmith TC. (2014). *An Introduction to Biological Aging Theory* (2^{da} Edici n). Crownsville, MD: Azinet Press.
- Gompertz B. (1825). On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philos. Trans. R. Soc. London*, 115, 513–583.
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. (1999). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(9), 5263–5267.
- Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, ..., McCol BW. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to ageing. *Nat. Neurosci.*, 19(3): 504–516.
- Gray DA. (2005). Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *Sci. Aging Knowl. Environ.*, 2005(5), re1.
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), 1109–1112.
- Gruber R, Koch H, Doll BA, Tegtmeier F, Einhorn TA, Hollinger JO. (2006). Fracture healing in the elderly patient. *Exp. Gerontol.*, 41(11), 1080–1093.
- Guerrero-Mu oz MJ, Castillo-Carranza DL, Kaye R. (2014). Therapeutic approaches against common structural features of toxic oligomers shared by multiple amyloidogenic proteins. *Biochem. Pharmacol.*, 88(4), 468–478.
- Guiotto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G. (2005). Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr. Med. Chem.*, 12(20), 2293–2315.

- Haddad JJ. (2002). Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell. Signal.*, 14(11), 879–897.
- Haigis MC, Yankner BA. (2010). The aging stress response. *Mol. Cell*, 40(2), 333–344.
- Halliwell B. (1998). Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. *Free Radic. Res.*, 29(6), 469–486.
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11(3), 298–300.
- Harman D. (1968). Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice. *J. Gerontol.*, 23(4), 476–482.
- Harman D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.*, 20(4), 145–147.
- Harman D. (2001). Aging: overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 928(1), 1–21.
- Harries LW, Hernandez D, Henley W, Wood AR, Holly AC, Bradley-Smith RM, ... Melzer D. (2011). Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging Cell*, 10(5), 868–878.
- Harris SB, Weindruch R, Smith GS, Mickey MR, Walford RL. (1990). Dietary restriction alone and in combination with oral ethoxyquin/2-mercaptoethylamine in mice. *J. Gerontol.*, 45(5), B141–147.
- Hayflick L, Moorhead PS. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 25, 585–621.
- Hayn M, Kremser K, Singewald N, Cairns N, Nemethova M, Lubec B, Lubec G. (1996). Evidence against the involvement of reactive oxygen species in the pathogenesis of neuronal death in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Life Sci.*, 59(7), 537–544.
- Head E, Liu J, Hagen TM, Muggenburg BA, Milgram NW, Ames BN, Cotman CW. (2002). Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *J. Neurochem.*, 82(2), 375–381.
- Herranz D, Muñoz-Martín M, Cañamero M, Mulero F, Martínez-Pastor B, Fernández-Capetillo O, Serrano M. (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat. Commun.*, 1(1), 1–8.
- Hirst WD, Young KA, Newton R, Allport VC, Marriott DR, Wilkin GP. (1999). Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.*, 13(1), 57–68.
- Hitt R, Young-Xu Y, Silver M, Perls T. (1999). Centenarians: the older you get, the healthier you have been. *Lancet*, 354, 652.
- Hoeijmakers JHJ. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.*, 361(15), 1475–1485.
- Hoenicke L, Zender L. (2012). Immune surveillance of senescent cells – biological significance in cancer and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis*, 33(6), 1123–1126.
- Hof PR, Bouras C, Morrison JH. (1999). Cortical neuropathology in aging and dementing disorders: neuronal typology, connectivity, and selective vulnerability. En A Peters, J Morrison (Eds.), *Cerebral Cortex*:

- Neurodegenerative and Age-Related Changes in Structure and Function of Cerebral Cortex* (Vol. 14, pp. 175–311). New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum/Springer US.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, ... Le Bouc Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*, 421(6919), 182–187.
- Hoppe T. (2010). Life and destruction: ubiquitin-mediated proteolysis in aging and longevity. *F1000 Biol. Rep.*, 2(November), 79.
- Houtkooper RH, Williams RW, Auwerx J. (2010). Metabolic networks of longevity. *Cell*, 142(1), 9–14.
- Huang CM, Polk TA, Goh JO, Park DC. (2012). Both left and right posterior parietal activations contribute to compensatory processes in normal aging. *Neuropsychologia*, 50(1), 55–66.
- Huang Y, Mucke L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148(6), 1204–1222.
- Hudson EK, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Croteau DL, Anson RM, Bohr VA, Hansford RG. (1998). Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free Radic. Res.*, 29(6), 573–579.
- Hughes EJ, Bond J, Svrckova P, Makropoulos A, Ball G, Sharp DJ, ... Counsell SJ. (2012). Regional changes in thalamic shape and volume with increasing age. *Neuroimage*, 63(3), 1134–1142.
- Hulbert AJ. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.*, 234(2), 277–288.
- Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol. Rev.*, 87(4), 1175–1213.
- Isola AL, Suzie Chen. (2017). Exosomes: the messengers of health and disease. *Curr. Neuropharmacol.*, 15(1), 157–165.
- Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JAC, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, ... Holstege JC. (2000). Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol. Dis.*, 7(6), 623–643.
- Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, Wacholder S, Wang Z, Rodríguez-Santiago B, ... Chanock SJ. (2012). Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat. Genet.*, 44(6), 651–658.
- Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, ... Scadden DT. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4a}. *Nature*, 443(7110), 421–426.
- Jellinger KA. (2009). Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J. Neural Transm.*, 116(9), 1111–1162.
- Jha MK, Lee WH, Suk K. (2016). Functional polarization of neuroglia: implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochem. Pharmacol.*, 103, 1–16.
- Jiang CH, Tsien JZ, Schultz PG, Hu Y. (2001). The effects of aging on gene

- expression in the hypothalamus and cortex of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(4), 1930–1934.
- Jin K. (2010). Modern biological theories of aging. *Aging Dis.* 1(2), 72–74.
- Joshi G, Hardas S, Sultana R, St Clair DK, Vore M, Butterfield DA. (2007). Glutathione elevation by gamma-glutamyl cysteine ethyl ester as a potential therapeutic strategy for preventing oxidative stress in brain mediated by in vivo administration of adriamycin: implication for chemobrain. *J. Neurosci. Res.*, 85(3), 497–503.
- Jové M, Portero-Otín M, Naudí A, Ferrer I, Pamplona R. (2014). Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 73(7), 640–657.
- Juckett DA. (1987). Cellular aging (the Hayflick limit) and species longevity: a unification model based on clonal succession. *Mech. Ageing Dev.*, 38(1), 49–71.
- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. (1994). Constitutive NF- κ B activity in neurons. *Mol. Cell Biol.*, 14(6), 3981–3992.
- Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, ... Cohen HY. (2012). The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature*, 483(7388), 218–221.
- Karademir B, Ozer NK. (2014). Molecular function of tocopherols in age related diseases. *Curr. Pharm. Des.*, 20(18), 3030–3035.
- Karin M, Lin A. (2002). NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.*, 3(3), 221–227.
- Keller JN, Dimayuga E, Chen Q, Thorpe J, Gee J, Ding Q. (2004). Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(12), 2376–2391.
- Keller JN, Gee J, Ding Q. (2002). The proteasome in brain aging. *Ageing Res. Rev.*, 1(2), 279–293.
- Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, Markesbery WR. (2005). Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology*, 64(7), 1152–1156.
- Kirkwood TBL. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*, 120(4), 437–447.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. (2012). Protein homeostasis and aging: the importance of exquisite quality control. *Ageing Res. Rev.*, 10(2), 205–215.
- Kopitar-Jerala N. (2015). Innate immune response in brain, NF- κ B signaling and cystatins. *Front. Mol. Neurosci.*, 8(December), 73.
- Krämer A, Green J, Pollard J, Tugendreich S. (2014). Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*, 30(4), 523–530.
- Kreiman G, Hung CP, Kraskov A, Quiroga RQ, Poggio T, DiCarlo JJ. (2006). Object selectivity of local field potentials and spikes in the macaque inferior temporal cortex. *Neuron*, 49(3), 433–445.
- Krinsky NI. (1993). Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.*, 13(1), 561–587.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.*, 87(1), 99–163.
- Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, ... Prolla

- TA. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*, 309(5733), 481–484.
- Kumar A, Singh A. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol. Reports*, 67(2), 195–203.
- Kumar A, Yegla B, Foster TC. (2017). Redox signaling in neurotransmission and cognition during aging. *Antioxid. Redox. Signal.*, doi: 10.1089/ars.2017.7111.
- Kushner AI, Rzewnicki DL. (1994). The acute phase response: general aspects. *Baillieres Clin. Rheumatol.*, 8(3), 513–530.
- Labunskyy VM, Gladyshev VN. (2013). Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging. *Antioxid. Redox. Signal.*, 19(12), 1362–1372.
- Lardenoije R, Iatrou A, Kenis G, Kompotis K, Steinbusch HWM, Mastroeni D, ... Rutten BPF. (2015). The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.*, 131, 21–64.
- Lau A, Tian W, Whitman SA, Zhang DD. (2012). The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. *Antioxid. Redox Signal.*, 18(1), 91–93.
- Leal SL, Yassa MA. (2015). Neurocognitive aging and the hippocampus across species. *Trends Neurosci.*, 38(12), 800–812.
- Ledesma MD, Martin MG, Dotti CG. (2012). Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog. Lipid Res.*, 51(1), 23–35.
- Leyton-Jaimes MF, Kahn J, Israelson A. (2017). Macrophage migration inhibitory factor: a multifaceted cytokine implicated in multiple neurological diseases. *Exp. Neurol.*, doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.021.
- Lockhart SN, DeCarli C. (2014). Structural imaging measures of brain aging. *Neuropsychol. Rev.*, 24(3), 271–289.
- Loft S, Poulsen HE. (1996). Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 74(6), 297–312.
- López-González I, Schluter A, Aso E, García-Esparcia P, Ansoleaga B, Llorens F, ... Ferrer I. (2015). Neuroinflammatory signals in Alzheimer disease and APP/PS1 transgenic mice: correlations with plaques, tangles, and oligomeric species. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 74(4), 319–344.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217.
- López-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G. (1993a). Maximum life span in vertebrates: relationship with liver antioxidant enzymes, glutathione system, ascorbate, urate, sensitivity to peroxidation, true malondialdehyde, in vivo H₂O₂, and basal and maximum aerobic capacity. *Mech. Ageing Dev.*, 70(3), 177–199.
- López-Torres M, Pérez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Barja G. (1993b). Simultaneous induction of SOD, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 15(2), 133–142.
- Lu T, Pan Y, Kao S, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA. (2004). Gene regulation and DNA damage in the aging human brain. *Nature*, 429(6994), 883–891.
- Lukiw WJ, Bazan NG. (2008). Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J. Nutr.*, 138(12), 2510–2514.

- Luxford C, Dean RT, Davies MJ. (2002). Induction of DNA damage by oxidised amino acids and proteins. *Biogerontology*, 3(1–2), 95–102.
- Lynn WS, Wallwork JC. (1992). Does food restriction retard aging by reducing metabolic rate? *J. Nutr.*, 122(9), 1917–1918.
- Madian AG, Regnier FE. (2010). Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J. Proteome Res.*, 9(8), 3766–3780.
- Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, Shen L, Zhang L, Zhang J, ... Issa JPI. (2010). Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res.*, 20(3), 332–340.
- Maekawa S, Kobayashi Y, Odagaki SI, Makino M, Kumanogoh H, Nakamura S, ... Hayashi F. (2013). Interaction of NAP-22 with brain glutamic acid decarboxylase (GAD). *Neurosci. Lett.*, 537, 50–54.
- Magistretti PJ. (2000). Cellular bases of functional brain imaging: insights from neuron-glia metabolic coupling. *Brain Res.*, 886(1–2), 108–112.
- Makrantonaki E, Zouboulis CC. (2007). Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1119, 40–50.
- Malone MJ, Szoke MC. (1982). Neurochemical studies in aging brain. I. Structural changes in myelin lipids. *J. Gerontol.*, 37(3), 262–267.
- Marnett LJ, Buck J, Tuttle MA, Basu AK, Bull AW. (1985). Distribution and oxidation of malondialdehyde in mice. *Prostaglandins*, 30(2), 241–254.
- Martínez A, Portero-Otín M, Pamplona R, Ferrer I. (2010). Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates. *Brain Pathol.*, 20(2), 281–297.
- Martins-de-Souza D, Cassoli JS, Nascimento JM, Hensley K, Guest PC, Pinzón-Velasco AM, Turck CW. (2015). The protein interactome of collapsin response mediator protein-2 (CRMP2/DPYSL2) reveals novel partner proteins in brain tissue. *Proteomics. Clin. Appl.*, 9(9–10), 817–831.
- Masoro EJ. (2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.*, 126(9), 913–922.
- Massey KA, Nicolaou A. (2013). Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 59, 45–55.
- Matheu A, Maraver A, Collado M, García-Cao I, Cañamero M, Borrás C, ... Serrano M. (2009). Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell*, 8(2), 152–161.
- Matt SM, Johnson RW. (2016). Neuro-immune dysfunction during brain aging: new insights in microglial cell regulation. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 26, 96–101.
- Mattson MP. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1(2), 120–129.
- Mattson MP, Magnus T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7(4), 278–294.
- Mayes J, Tinker-Mill C, Kolosov O, Zhang H, Tabner BJ, Allsop D. (2014). β -amyloid fibrils in Alzheimer disease are not inert when bound to copper ions but can degrade hydrogen peroxide and generate reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.*, 289(17), 12052–12062.
- McDougle DR, Watson JE, Abdeen AA, Adili R, Caputo MP, Krapf JE, ..., Das A.

- (2017). Anti-inflammatory ω -3 endocannabinoid epoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 14(30), E6034–E6043.
- Mecocci P, Beal MF, Cecchetti R, Polidori MC, Cherubini A, Chionne F, ... Senin U. (1997). Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 31(1), 53–64.
- Medvedev ZA. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 65(3), 375–398.
- Meraz-Ríos MA, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V. (2013). Inflammatory process in Alzheimer's disease. *Front. Integr. Neurosci.*, 7(August), 59.
- Mesulam M. (2000). Brain, mind, and the evolution of connectivity. *Brain Cogn.*, 42(1), 4–6.
- Mielke R, Schröder R, Fink GR, Kessler J, Herholz K, Heiss WD. (1996). Regional cerebral glucose metabolism and postmortem pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 91(2), 174–179.
- Miller E, Morel A, Saso L, Saluk J. (2014). Isoprostanes and neuroprostanes as biomarkers of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, ID572491.
- Miller YI, Shaklai N. (1994). Oxidative crosslinking of LDL protein induced by hemin: involvement of tyrosines. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 34(6), 1121–1129.
- Minghetti L. (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63(9), 901–910.
- Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, Créminon C, Maclouf J, Levi G. (1997). Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat microglial cultures is downregulated by exogenous prostaglandin E2 and by cyclooxygenase inhibitors. *Glia*, 19(2), 152–160.
- Mitchell DY, Petersen DR. (1987). The oxidation of alpha-beta unsaturated aldehydic products of lipid peroxidation by rat liver aldehyde dehydrogenases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 87(3), 403–410.
- Mockett RJ, Orr WC, Rahmandar JJ, Benes JJ, Radyuk SN, Klichko VI, Sohal RS. (1999). Overexpression of Mn-containing superoxide dismutase in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 371(2), 260–269.
- Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, ... Morrison SJ. (2006). Increasing p16^{INK4a} expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, 443(7110), 448–452.
- Monnier VM, Mustata GT, Biemel KL, Reihl O, Lederer MO, Zhenyu D, Sell DR. (2005). Cross-linking of the extracellular matrix by the Maillard reaction in aging and diabetes: an update on “a puzzle nearing resolution.” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1043, 533–544.
- Monyer H, Hartley DM, Choi DW. (1990). 21-aminosteroids attenuate excitotoxic neuronal injury in cortical cell cultures. *Neuron*, 5(2), 121–126.
- Moreira PI, Santos MS, Oliveira CR, Shenk JC, Nunomura A, Smith MA, ... Perry G. (2008). Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 7(1), 3–10.
- Moreira PI, Sayre LM, Zhu X, Nunomura A, Smith MA, Perry G. (2010). Detection

- and localization of markers of oxidative stress by in situ methods: application in the study of Alzheimer disease. En RM Uppu, SN Murthy, WA Pryor, NL Parinandi (Eds.), *Free Radicals and Antioxidant Protocols* (Vol. 610, pp. 419–434). Totowa, NJ: Humana Press.
- Morrison JH, Hof PR. (1997). Life and death of neurons in the aging brain. *Science*, 278(5337), 412–419.
- 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(2), 661–684.
- Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, ... Alt FW. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2), 315–329.
- Mountjoy CQ, Dowson JH, Harrington C, Cairns MR, Wilton-Cox H. (2005). Characteristics of neuronal lipofuscin in the superior temporal gyrus in Alzheimer's disease do not differ from non-diseased controls: a comparison with disease-related changes in the superior frontal gyrus. *Acta Neuropathol.*, 109(5), 490–496.
- Muller FL, Mele J, Van Remmen H, Richardson A. (2003). Probing the in vivo relevance of oxidative stress in aging using knockout and transgenic mice. En T von Zglinicki (Ed.), *Aging at the Molecular Level* (pp. 131–144). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Murray M. (2016). CYP2J2 – regulation, function and polymorphism. *Drug Metab. Rev.*, 2532(June), 1–18.
- Naudí A, Cabré R, Jové M, Ayala V, Gonzalo H, Portero-Otín M, ... Pamplona R. (2015). Lipidomics of human brain aging and Alzheimer's disease pathology. *Int. Rev. Neurobiol.*, 122, 133–189.
- Naudí A, Jové M, Ayala V, Ramírez O, Cabré R, Prat J, ... Pamplona R. (2012). Region specific vulnerability to lipid peroxidation in the human central nervous system. En A Catalá (Ed.), *Lipid Peroxidation* (pp. 437–456). Rijeka: InTech.
- Naudí A, Jové M, Cacabelos D, Ilieva E, Boada J, Ayala MV, ... Pamplona R. (2007). The biological basis of the aging process. *Contrib. to Sci.*, 3(4), 469–479.
- Navas P, Villalba JM, Córdoba F. (1994). Ascorbate function at the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 1197(1), 1–13.
- Nave KA, Werner HB. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 30, 503–533.
- Nettiksimmons J, Beckett L, Schwarz C, Carmichael O, Fletcher E, DeCarli C. (2013). Subgroup of AD I normal controls characterized by atrophy and cognitive decline associated with vascular damage. *Psychol. Aging*, 28(1), 191–201.
- Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. (2014). Regulation of Nrf2 – an update. *Free Radic. Biol. Med.*, 66, 36–44.
- Nixon RA. (2003). The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res. Rev.*, 2(4), 407–418.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-

- electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 64(2), 113–122.
- Norden DM, Godbout JP. (2013). Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 39(1), 19–34.
- Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, Lee H, Zhu X, Smith MA, Perry G. (2012). Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders. *Neurotox. Res.*, 22(3), 231–248.
- Nyberg L, Lövdén M, Riklund K, Lindenberger U, Bäckman L. (2012). Memory aging and brain maintenance. *Trends Cogn. Sci.*, 16(5), 292–305.
- O'Brien JS, Sampson EL. (1965). Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J. Lipid Res.*, 6(4), 537–544.
- Ohtsubo T, Kamada S, Mikami T, Murakami H, Tsujimoto Y. (1999). Identification of Nrf2, a member of the NF-E2 family of transcription factors, as a substrate for caspase-3(-like) proteases. *Cell Death Differ.*, 6(9), 865–872.
- Ojika K, Tsugu Y, Mitake S, Otsuka Y, Katada E. (1998). NMDA receptor activation enhances the release of a cholinergic differentiation peptide (HCNP) from hippocampal neurons in vitro. *Dev. Brain Res.*, 106(1–2), 173–180.
- Olovnikov AM. (1996). Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp. Gerontol.*, 31(4), 443–448.
- O'Neill C. (2013). PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.*, 48(7), 647–653.
- Orr WC, Mockett RJ, Benes JJ, Sohal RS. (2003). Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 278(29), 26418–26422.
- Onyango IG, Lu J, Rodova M, Lezi E, Crafter AB, Russell H, Swerdlow RH. (2010). Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochim. Biophys. Acta*, 1802(1), 228–234
- Palmer AM, Burns MA. (1994). Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 645(1–2), 338–342.
- Pamplona R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1777(10), 1249–1262
- Pamplona R, Barja G. (2003). Aging rate, mitochondrial free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies. En A Catalá (Ed.), *Aging at the Molecular Level* (pp. 47–64). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Pamplona R, Barja G. (2006). Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1757(5–6), 496–508.
- Pamplona R, Barja G. (2007). Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res. Rev.*, 6(3), 189–210.
- Pamplona R, Barja G, Portero-Otín M. (2002). Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-

- longevity adaptation? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 959, 475–490.
- Pamplona R, Portero-Otín M, Riba D, Ruiz C, Prat J, Bellmunt MJ, Barja G. (1998). Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J. Lipid Res.*, 39(10), 1989–1894.
- Pamplona R, Portero-Otín M, Sanz A, Ayala V, Vasileva E, Barja G. (2005). Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigar and canaries than in mice. Relation to aging rate. *Age (Omaha)*, 27(4), 267–280.
- Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López Torres M, Barja G. (1996). Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mech. Ageing Dev.*, 86(1), 53–66.
- Park CB, Larsson NG. (2011). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J. Cell Biol.*, 193(5), 809–818.
- Perez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G. (1998). The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B.*, 168(3), 149–158.
- Perluigi M, Coccia R, Butterfield DA. (2012). 4-hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. *Antioxid. Redox Signal.*, 17(11), 1590–1609.
- Perluigi M, Di Domenico F, Giorgi A, Schininà ME, Coccia R, Cini C, ... Calabrese V. (2010). Redox proteomics in aging rat brain: involvement of mitochondrial reduced glutathione status and mitochondrial protein oxidation in the aging process. *J. Neurosci. Res.*, 88(16), 3498–3507.
- Perluigi M, Swomley AM, Butterfield DA. (2014). Redox proteomics and the dynamic molecular landscape of the aging brain. *Ageing Res. Rev.*, 13, 75–89.
- Perry EA, Castellani RJ, Moreira PI, Nunomura A, Lui Q, Harris PLR, ... Perry G. (2013). Neurofilaments are the major neuronal target of hydroxynonenal-mediated protein cross-links. *Free Radic. Res.*, 47(6–7), 507–510.
- Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, 1–11.
- Peters A. (1996). Age-related changes in oligodendrocytes in monkey cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.*, 371(1), 153–163.
- Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, ... Vulpe CD. (2008). Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics*, 8, 1744–1749.
- Pizzimenti S, Ciamporcero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, ... Barrera G. (2013). Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front. Physiol.*, 4 SEP(September), 1–17.
- Plank M, Wuttke D, van Dam S, Clarke SA, de Magalhães JP. (2012). A meta-analysis of caloric restriction gene expression profiles to infer common signatures and regulatory mechanisms. *Mol. Biosyst.*, 8(4), 1339–1349.
- Pollina EA, Brunet A. (2011). Epigenetic regulation of aging stem cells. *Oncogene*, 30(28), 3105–3126.

- Poon H, Castegna A, Farr S, Thongboonkerd V, Lynn B, Banks W, ... Butterfield DA. (2004). Quantitative proteomics analysis of specific protein expression and oxidative modification in aged senescence-accelerated-prone 8 mice brain. *Neuroscience*, 126(4), 915–926.
- Poon HF, Shepherd HM, Reed TT, Calabrese V, Stella AMG, Pennisi G, ... Butterfield DA. (2006). Proteomics analysis provides insight into caloric restriction mediated oxidation and expression of brain proteins associated with age-related impaired cellular processes: mitochondrial dysfunction, glutamate dysregulation and impaired protein synthesis. *Neurobiol. Aging*, 27(7), 1020–1034.
- Porcellotti S, Fanelli F, Fracassi A, Sepe S, Ceconi F, Bernardi C, ... Moreno S. (2015). Oxidative stress during the progression of β -amyloid pathology in the neocortex of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2015, 1–18.
- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu. Rev. Biochem.*, 78(1), 959–991.
- Pratt DA, Tallman KA, Porter NA. (2011). Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: new mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Acc. Chem. Res.*, 44(6), 458–467.
- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro P, Ferri C. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement.*, 9(e2), 63–75.
- Quarrie JK, Riabowol KT. (2004). Murine models of life span extension. *Sci. Aging Knowledge Environ.*, 2004(31), re5.
- Raffaello A, Rizzuto R. (2011). Mitochondrial longevity pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1813(1), 260–268.
- Rahman I, Marwick J, Kirkham P. (2004). Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF- κ B and pro-inflammatory gene expression. *Biochem. Pharmacol.*, 68(6), 1255–1267.
- Rahmanto AS, Morgan PE, Hawkins CL, Davies MJ. (2010). Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides. *Free Radic. Biol. Med.*, 48(8), 1071–1078.
- Rapoport SI, Rao JS, Igarashi M. (2007). Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*, 77(5–6), 251–261.
- Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.*, 24(5), 981–990.
- Requena JR, Levine RL, Stadtman ER. (2003). Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids*, 25(3–4), 221–226.
- Resnick SM, Pham DL, Kraut MA, Zonderman AB, Davatzikos C. (2003). Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. *J. Neurosci.*, 23(8), 3295–3301.
- Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. (2012). Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J. Biol. Chem.*, 287(7), 4403–4410.
- Richter C. (1987). Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes.

- Chem. Phys. Lipids*, 44(2–4), 175–189.
- Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, ... Yaffee M. (1995). Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1271(1), 67–74.
- Rink C, Gnyawali S, Peterson L, Khanna S. (2011). Oxygen-inducible glutamate oxaloacetate transaminase as protective switch transforming neurotoxic glutamate to metabolic fuel during acute ischemic stroke. *Antioxid. Redox Signal.*, 14(10), 1777–1785.
- Rink C, Khanna S. (2011). Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke. *Antioxid. Redox Signal.*, 14(10), 1889–1903.
- Roberts LJ, Reckelhoff JF. (2001). Measurement of F(2)-isoprostanes unveils profound oxidative stress in aged rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287(1), 254–256.
- Rollo CD. (2010). Aging and the mammalian regulatory triumvirate. *Aging Dis.*, 1(2), 105–138.
- Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J. (1998). Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health Perspect.*, 106 Suppl(October), 1229–1234.
- Ross CA, Poirier MA. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.*, 10(7), S10–S17.
- Ross CA, Poirier MA. (2005). What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(11), 891–898.
- Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 447(7145), 725–729.
- Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. (2011). Autophagy and aging. *Cell*, 146(5), 682–695.
- Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. (2012). Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany. NY)*, 4(3), 166–175.
- Salminen LE, Paul RH. (2014). Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. *Rev. Neurosci.*, 25(6), 805–819.
- Samuels DC. (2005). Life span is related to the free energy of mitochondrial DNA. *Mech. Ageing Dev.*, 126(10), 1123–1129.
- Sanz A, Pamplona R, Barja G. (2006). Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid. Redox Signal.*, 8(3–4), 582–599.
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, ... Rabinovitch PS. (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 308(5730), 1909–1911.
- Sen CK, Packer L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.*, 10, 709–720.
- Sen R, Smale ST. (2010). Selectivity of the NF- κ B response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2(4), a000257.
- Sennepin AD, Charpentier S, Normand T, Sarré C, Legrand A, Mollet LM. (2009). Multiple reprobing of Western blots after inactivation of peroxidase activity by

- its substrate, hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.*, 393(1), 129–131.
- Shacter E. (2000). Protein oxidative damage. *Methods Enzymol.*, 319, 428–436.
- Sharpless NE, DePinho RA. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(9), 703–713.
- Shay JW, Wright WE. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1(1), 72–76.
- Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol.*, 2(11), e362.
- Siegel SJ, Bieschke J, Powers ET, Kelly JW. (2007). The oxidative stress metabolite 4-hydroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. *Biochemistry*, 46(6), 1503–1510.
- Sies H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*, 27(9–10), 916–921.
- Simm A, Müller B, Nass N, Hofmann B, Bushnaq H, Silber RE, Bartling B. (2015). Protein glycation - between tissue aging and protection. *Exp. Gerontol.*, 68, 71–75.
- Simoncini C, Orsucci D, Caldarazzo Ienco E, Siciliano G, Bonuccelli U, Mancuso M. (2015). Alzheimer's pathogenesis and its link to the mitochondrion. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2015, 1–8.
- Sohal RS, Allen RG. (1990). Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp. Gerontol.*, 25(6), 499–522.
- Springer JE, Azbill RD, Mark RJ, Begley JG, Waeg G, Mattson MP. (1997). 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, rapidly accumulates following traumatic spinal cord injury and inhibits glutamate uptake. *J. Neurochem.*, 68(6), 2469–2476.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, ... Spiegelman BM. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127(2), 397–408.
- Starkov AA. (2010). Measurement of mitochondrial ROS production. *Methods Mol. Biol.*, 648(17), 245–255.
- Steinacker P, Aitken A, Otto M. (2011). 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 22(7), 696–704.
- Strehler BL. (1987). Understanding aging. En *Aging Methods and Protocols* (Vol. 15, pp. 1–19). Clifton, NJ: Humana Press.
- Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM. (2004). Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(10), 3381–3386.
- Sullivan EV, Pfefferbaum A. (2007). Neuroradiological characterization of normal adult ageing. *Br. J. Radiol.*, 80 Spec No, S99–S108.
- Sultana R, Butterfield DA. (2004). Oxidatively modified GST and MRP1 in Alzheimer's disease brain: implications for accumulation of reactive lipid peroxidation products. *Neurochem. Res.*, 29(12), 2215–2220.
- Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. (2013). Lipid peroxidation triggers

- neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic. Biol. Med.*, 62, 157–169.
- Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, ... Nishimura M. (2008). Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 39(6), 673–682.
- Swerdlow RH. (2011). Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.*, 1812(12), 1630–1639.
- Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, ... Yamamuro T. (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.*, 17(2), 183–194.
- Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, ... Heijmans BT. (2012). Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Ageing Cell*, 11(4), 694–703.
- Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 296(5575), 1991–1995.
- Teather LA. (2002). Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. *Learn. Mem.*, 9(1), 41–47.
- Toescu EC, Verkhatsky A, Landfield PW. (2004). Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci.*, 27(10), 614–620.
- Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, ... Kasahara M. (2012). Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am. J. Pathol.*, 180(3), 963–972.
- Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker T, Englander E, Chader GJ. (1996). Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol. Vis.*, 2, 11.
- Tonks NK. (2005). Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*, 121(5), 667–670.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RDV, Huang P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.*, 10(8), 1343–1374.
- Tramutola A, Lanzillotta C, Perluigi M, Butterfield DA. (2016). Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res. Bull.*, 1–9.
- Travers LM, García-González F, Simmons LW. (2015). Live fast die young life history in females: evolutionary trade-off between early life mating and lifespan in female *Drosophila melanogaster*. *Sci. Rep.*, 5, 15469.
- Trnková L, Dršata J, Boušová I. (2015). Oxidation as an important factor of protein damage: implications for Maillard reaction. *J. Biosci.*, 40(2), 419–439.
- Tsurumi A, Li W. (2012). Global heterochromatin loss. *Epigenetics*, 7(7), 680–688.
- Turpaev KT. (2002). Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry. (Mosc.)*, 67(3), 281–292.
- Turrens JF. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 552, 335–344.

- Uchida K. (2008). A lipid-derived endogenous inducer of COX-2: a bridge between inflammation and oxidative stress. *Mol. Cells*, 25(3), 347–351.
- Vaishnavi SN, Vlassenko AG, Rundle MM, Snyder AZ, Mintun MA, Raichle ME. (2010). Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(41), 17757–17762.
- Valcarcel-Ares MN, Gautam T, Warrington JP, Bailey-Downs L, Sosnowska D, De Cabo R, ... Csiszar A. (2012). Disruption of Nrf2 signaling impairs angiogenic capacity of endothelial cells: implications for microvascular aging. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 67 A(8), 821–829.
- van Ham TJ, Holmberg MA, van der Goot AT, Teuling E, García-Arencibia M, Kim H eui, ... Nollen EAA. (2010). Identification of MOAG-4/SERF as a regulator of age-related proteotoxicity. *Cell*, 142(4), 601–612.
- van Heemst D. (2010). Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging Dis.*, 1(2), 147–157.
- Veneskoski M, Turunen SP, Kummu O, Nissinen A, Rannikko S, Levenon AL, Hörkkö S. (2011). Specific recognition of malondialdehyde and malondialdehyde acetaldehyde adducts on oxidized LDL and apoptotic cells by complement anaphylatoxin C3a. *Free Radic. Biol. Med.*, 51(4), 834–843.
- Vijg J. (1999). Profiling aging by gene arrays. *Mech. Ageing Dev.*, 112, 1–4.
- Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic. Res.*, 47(Suppl. 1), 3–27.
- Vlassenko AG, Vaishnavi SN, Couture L, Sacco D, Shannon BJ, Mach RH, ... Mintun MA. (2010). Spatial correlation between brain aerobic glycolysis and amyloid- β (A β) deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(41), 17763–17767.
- Volterra A, Meldolesi J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6(8), 626–640.
- Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, Mann M, Choudhary C. (2011). A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol. Cell. Proteomics*, 10(10), M111.013284–M111.013284.
- Wallace DC. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.*, 39(1), 359–407.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.*, 281, 21–40.
- Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, Von Zglinicki T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell*, 8(3), 311–323.
- Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, ... Murray CJL. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic

- analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388(10053), 1459–1544.
- Wang X, Lei XG, Wang J. (2014). Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 382(1), 8–16.
- Ward RJ, Dexter DT, Crichton RR. (2015). Ageing, neuroinflammation and neurodegeneration. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, 7, 189–204.
- Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. (2014). The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.*, 13(10), 1045–1060.
- Wataya T, Nunomura A, Smith MA, Siedlak SL, Harris PLR, Shimohama S, ... Perry G. (2002). High molecular weight neurofilament proteins are physiological substrates of adduction by the lipid peroxidation product hydroxynonenal. *J. Biol. Chem.*, 277(7), 4644–4648.
- Waxman SG. (1977). Conduction in myelinated, unmyelinated, and demyelinated fibers. *Arch. Neurol.*, 34(10), 585–589.
- Wei Q, Ren X, Jiang Y, Jin H, Liu N, Li J. (2013). Advanced glycation end products accelerate rat vascular calcification through RAGE/oxidative stress. *BMC Cardiovasc. Disord.*, 13(1), 13.
- Weiner HL, Frenkel D. (2006). Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 6(5), 404–416.
- Wessel D, Flügge UI. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.*, 138(1), 141–143.
- West IC. (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet. Med.*, 17(3), 171–180.
- Wickelgren I. (1996). For the cortex, neuron loss may be less than thought. *Science*, 273(5271), 48–50.
- Woulfe J. (2008). Nuclear bodies in neurodegenerative disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1783(11), 2195–2206.
- Xia Q, Hu Q, Wang H, Yang H, Gao F, Ren H, ... Wang G. (2015). Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. *Cell Death Dis.*, 6, e1702.
- Yabe T, Sanagi T, Yamada H. (2010). The neuroprotective role of PEDF: implication for the therapy of neurological disorders. *Mol. Med.*, 10, 259–266.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11(2), 371–386.
- Yankner BA, Lu T, Loerch P. (2008). The aging brain. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 3(1), 41–66.
- Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, Mostofsky DI. (2002). The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol. Aging*, 23(5), 843–853.
- Ystad M, Eichele T, Lundervold AJ, Lundervold A. (2010). Subcortical functional

- connectivity and verbal episodic memory in healthy elderly. A resting state fMRI study. *Neuroimage*, 52(1), 379–388.
- Yun MH. (2015). Changes in regenerative capacity through lifespan. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(10), 25392–25432.
- Zakharov VV, Capony JP, Derancourt J, Kropolova ES, Novitskaya VA, Bogdanova MN, Mosevitsky MI. (2003). Natural N-terminal fragments of brain abundant myristoylated protein BASP1. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 1622(1), 14–19.
- Zaman MB, Leonard MO, Ryan EJ, Nolan NP, Hoti E, Maguire D, ... O'Farrelly C. (2007). Lower expression of Nrf2 mRNA in older donor livers: a possible contributor to increased ischemia-reperfusion injury? *Transplantation*, 84(10), 1272–1278.
- Zarkovic N, Cipak A, Jaganjac M, Borovic S, Zarkovic K. (2013). Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *J. Proteomics*, 92, 239–247.
- Zhao Y, Zhao B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2013, 1–10.
- Ziegler DA, Piguet O, Salat DH, Prince K, Connally E, Corkin S. (2010). Cognition in healthy aging is related to regional white matter integrity, but not cortical thickness. *Neurobiol. Aging*, 31(11), 1912–1926.

VIII. ANEXOS

Anexo1. Artículo publicado.

Free Radical Biology and Medicine 95 (2016) 1–15



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original Contribution

Redox proteomic profiling of neuroketal-adducted proteins in human brain: Regional vulnerability at middle age increases in the elderly

Mayelín Domínguez^a, Eliandre de Oliveira^b, María Antonia Odena^b, Manuel Portero^c, Reinald Pamplona^c, Isidro Ferrer^{a,d,e,*}^a Institute of Neuropathology, University Hospital of Bellvitge, IDIBELL (Biomedical Research Institute of Bellvitge), Carrer Feixa Llarga sn, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain^b Proteomics Platform, Barcelona Science Park, 08028 Barcelona, Spain^c Department of Experimental Medicine, University of Lleida-Biomedical Research Institute of Lleida, 25198 Lleida, Spain^d Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Carrer Feixa Llarga sn, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain^e CIBERNED (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2015

Received in revised form

3 February 2016

Accepted 27 February 2016

Available online 8 March 2016

Keywords:

Aging

Oxidative damage

Oligomers

Lipopoxidation

ABSTRACT

Protein lipoxidation was assessed in the parietal cortex (PC), frontal cortex (FC), and cingulate gyrus (CG) in middle-aged and old-aged individuals with no clinical manifestations of cognitive impairment, in order to increase understanding of regional brain vulnerability to oxidative damage during aging. Twenty-five lipoxidized proteins were identified in all the three regions although with regional specificities, by using redox proteomics to detect target proteins of neuroketals (NKT) adduction. The number of cases with NKT-adducted proteins was higher in old-aged individuals but most oxidized proteins were already present in middle-aged individuals. Differences in vulnerability to oxidation were dependent on the sub-cellular localization, secondary structure, and external exposition of certain amino acids. Lipoxidized proteins included those involved in energy metabolism, cytoskeleton, proteostasis, neurotransmission and O₂/CO₂, and heme metabolism. Total NKT and soluble oligomer levels were estimated employing slot-blot, and these were compared between age groups. Oligomers increased with age in PC and FC; NKT significantly increased with age in FC, whereas total NKT and oligomer levels were not modified in CG, thus highlighting differences in brain regional vulnerability with age. Oligomers significantly correlated with NKT levels in the three cortical regions, suggesting that protein NKT adduction parallels soluble oligomer formation.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: ACO2, aconitate hydratase; ATP5A1, ATP synthase subunit alpha; AD, Alzheimer's disease; BASP1, brain acid soluble protein 1; BLVRB, NADPH-flavin reductase; CA1, carbonic anhydrase 1; CG, cingulate gyrus; CKB, creatine kinase B-type; CRYAB, alpha-crystallin B chain; DHA, docosahexaenoic acid; DLD, dihydrolipoyl dehydrogenase; DPYSL2, dihydropyrimidinase-related protein 2; ENO1, alpha-enolase; FC, frontal cortex; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GO, gene ontology; GOT1, aspartate aminotransferase; HBA1, hemoglobin subunit alpha; HSPD1, 60 kDa heat shock protein; LC-MS/MS, liquid chromatography–tandem mass spectrometry; NEFL, neurofilament light polypeptide; NEFM, neurofilament medium polypeptide; NKT, neuroketals; PARK7, protein DJ-1; PC, parietal cortex; PEBP1, phosphatidylethanolamine-binding protein 1; PGAM1, phosphoglycerate mutase 1; PKM2, pyruvate kinase isozymes M1/M2; ROS, reactive oxygen species; SYN1, synapsin-1; TPPP, tubulin polymerization-promoting protein; UCHL1, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1; YWHAG, 14-3-3 protein gamma

* Corresponding author at: Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge, Carrer Feixa Llarga sn, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain.

E-mail addresses: mdominguez@idibell.cat (M. Domínguez), eloliveira@pcb.ub.es (E. de Oliveira), maodena@pcb.ub.es (M.A. Odena), manuel.portero@mex.udl.cat (M. Portero), reinald.pamplona@mex.udl.cat (R. Pamplona), 8082ifa@gmail.com (I. Ferrer).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.034>

0891-5849/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aging produces changes in the structure and function of biological systems, leading to increased vulnerability to disease and death [1,2]. Senescence results from the accrual of declining processes including unbalanced oxidation, accumulation of abnormal and damaging molecules, and loss of repair capacities, among other factors [3]. In the brain, aging is manifested by reduction in white matter size, selective loss of neurons, dendrites and dendritic spines, modifications in neurotransmission, and senescence of glial cells [4–7]. Regional vulnerability results from the vulnerability of a particular region to damage by distinct noxious stimuli together with its specific capacity to react to the harmful stimuli. The combination of external factors such as blood flow and internal factors such as specificities of distinct neuronal and glial cell types contributes to delineating regional brain profiles of vulnerability during aging [8].

Reactive oxygen species (ROS) have been implicated as sources of molecular injury when reaching undesirable thresholds [9,10]

and have been directly implicated in the process of aging [11]. The human brain has high energy metabolism and high oxygen consumption demands, relatively low antioxidant defenses when compared with other tissues, high rates of transition metals that may act in redox cycles, and high concentration of poly-unsaturated fatty acids [12,13]. All these factors make the brain highly susceptible to oxidative stress damage during aging. Moreover, some targets of oxidative damage are common in aging and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) [14–17].

Lipid peroxidation is an important source of secondary ROS-mediated injury. Poly-unsaturated fatty acids present in cell membranes are extremely susceptible to peroxidation [18]. Among these, docosahexaenoic acid (DHA; C22:6, ω 3) is particularly abundant in the brain when compared to other ones such as arachidonic acid; DHA is highly concentrated in neuronal membranes and accounts for about one-third of total fatty acids in aminophospholipids of gray matter [19]. Neuroketals (NKT) are γ -ketoaldehyde sub-products of the non-enzymatic oxidation of DHA through the neuroprostane pathway [20]. NKT adducts lysine residues of proteins with remarkable rapidity causing protein lipoxidation and inducing cross-linking and aggregation [21], which are common marks of several age-related neurodegenerative disorders [22].

Soluble intermediates of protein aggregates named soluble oligomers cause cell injury by several mechanisms including mitochondrial damage, increased oxidative stress, and reduced protein clearance [23]. Soluble oligomers display a common conformation-dependent structure that is unique regardless of sequence and, therefore, allows detection with conformation-specific antibodies [24]. This suggests that they share a common mechanism of toxicity despite their derivation from different proteins [25]. A possible relation between oligomer production and NKT-mediated protein damage, and induction of cross-linking and aggregation, is a plausible hypothesis triggering cell damage.

Since the majority of the neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates appear in older individuals it is practical to try to gain understanding about modifications occurring with age before the time of the appearance of these diseases. The reason is not only to gain knowledge about mechanistic aspects but also to identify putative rational windows for specific therapeutic intervention. In the context of aging, redox proteomics is a very useful tool to identify protein targets of lipoxidative damage and to infer possible functional implications [26,27].

The present study analyzes lipoxidation in middle-aged and old-aged individuals with no clinical manifestations of cognitive impairment in three brain regions: parietal cortex, frontal cortex, and cingulate gyrus. Redox proteomics is used to detect target proteins modified by NKT adducts. This is followed by the bioinformatic analysis of factors contributing to vulnerability of NKT-adducted proteins, considering their localization, structure, and functions. Finally, the relation between the presence of soluble oligomeric species and NKT-adduction is explored in each region in the different age groups to learn about possible interactions of soluble oligomers and protein lipoxidation with age.

2. Methods

2.1. Samples

Brain tissue samples were obtained from eighteen cases from the Institute of Neuropathology Brain Bank, a branch of the HUB-ICO-IDIBELL Biobank, following the guidelines of the Spanish legislation and the approval of the local ethics committee. At autopsy, each brain was rapidly removed from the skull. The left

hemisphere was fixed in 4% buffered formalin for neuropathological study and the right hemisphere cut into slices, dissected into selected regions which were separated in individual labeled plastic bags, immediately frozen, and stored at -80°C until use. Three regions were studied: parietal cortex Brodmann area 7 (PC), frontal cortex area 8 (FC), and cingulate gyrus area 23 (CG).

A routine neuropathological study was performed in every case [28]. The neuropathological examination did not reveal lesions excepting moderate small blood vessel disease and status cribosus, and a few neurofibrillary tangles consistent with AD-related pathology stage I of Braak and Braak in older cases. In no cases were diffuse and neuritic β -amyloid plaques present. Therefore, hallmarks of AD-related pathology were not observed in the PC, FC, and CG in any case.

The age of subjects ranged from 40 to 79 years (mean 58.9 ± 13.5 years) and five of them were females (27.8%). The mean post-mortem delay was 6 h 15 min \pm 2 h 48 min (minimum 2 h, maximum 14 h). Markers of protein/nitrosative damage are preserved in post-mortem brains within these post-mortem time points [28]. All samples used were from individuals who did not have neurological or mental diseases, and had not suffered from diabetes, hepatic failure, or renal failure. In all of them there was an absence of prolonged hypoxia, sepsis, and agonal state in the context of artificial respiratory assistance. The causes of death in these cases were variable including carcinoma non-affecting the central nervous system, cardiac infarction, pulmonary thrombosis-embolism, and pneumonia. Summary of cases is shown in Table 1.

2.2. Two-dimensional (2D) gel electrophoresis

Samples of the PC, FC, and CG from ten individuals were analyzed with 2D electrophoresis (Table 1). These cases were representative of two age groups: five were middle-aged cases (mean age 43 ± 2.8 years) and five were old-aged cases (mean age 74 ± 5.5 years). The totality of samples was processed on different days. From each region, 0.1 g of frozen tissue was homogenized in 1 mL of ice-cold lysis buffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 40 mM Tris pH 7.5 and 4% CHAPS) containing phosphatase and protease inhibitors (Roche Molecular Systems). The homogenate was centrifuged at 16,000g for 10 min at 4°C and the pellet was discarded. Proteins from 300 μL of the resulting supernatant were precipitated with methanol/chloroform at room temperature. Protein pellets were then suspended in 300 μL of lysis buffer. Protein concentration was determined with the Bradford assay with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) as standard.

For the first dimension electrophoresis, equal amounts of protein (200 μg) in lysis buffer from each sample were mixed with 0.8% Byo-Lyte 3/10 ampholyte, 5 mM TBP, and 0.0004% bromophenol blue. Next, the sample was applied onto 7 cm pH 3–10 NL ReadyStrip™ IPG strips (Bio-Rad) for isoelectric focusing on a Protean® IEF Cell system (Bio-Rad) at 20°C and current limit of 50 μA per strip. The strips were actively re-hydrated at 50 V for 14 h and focused in sequential steps of 1 h at 200 V, 1 h at 500 V, 1 h at 1000 V, 1 h at 8000 V, and 10 h at 8000 V. After focusing, the strips were stored at -20°C until required.

For the second dimension, the strips were re-equilibrated in equilibration buffer (6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 2% SDS, and 20% glycerol) containing 5 mM TBP, and then alkylated in the same buffer plus 2.5% IAA. Afterwards, the strips were placed on the top of 10% SDS-polyacrylamide gels and electrophoresed at 120 V at 4°C . Two identical gels were run in parallel for each sample. One was silver stained using the PlusOne™ Silver Staining Kit as described by the manufacturer (GE Healthcare). The other one was processed for western blotting.

Table 1
Cases examined in the present series.

Case	Age (years)	Group	Gender	Cause of death	Post-mortem delay	Neuropathology	2D	1D	Slot-Blot
1	40	Middle-aged	Female	CA	8 h 45 min	NL	X	X	–
2	40	Middle-aged	Male	PNEU	5 h 10 min	NL	X	X	X
3	44	Middle-aged	Male	THR-EMB	6 h 40 min	NL	X	X	–
4	45	Middle-aged	Male	C-INF	4 h 5 min	CRIB	X	X	X
5	46	Middle-aged	Female	MYO	7 h 15 min	CRIB	X	X	X
6	48	Middle-aged	Female	CA	4 h 5 min	NL	–	X	X
7	52	Middle-aged	Male	PNEU	9 h 30 min	NL	–	X	X
8	52	Middle-aged	Male	C-INF	4 h 40 min	NL	–	X	X
9	57	Middle-aged	Male	PNEU	5 h 20 min	NL	–	X	X
10	61	Old-aged	Male	CA	4 h 30 min	AD I	–	X	X
11	65	Old-aged	Male	CA	3 h 15 min	AD I	X	X	X
12	66	Old-aged	Male	THR-EMB	6 h 25 min	NL	–	X	X
13	67	Old-aged	Male	CA	14 h 40 min	AD I	–	X	X
14	70	Old-aged	Male	CA	2 h	AD I	–	X	X
15	75	Old-aged	Female	C-INF	6 h 10 min	AD I	X	X	X
16	76	Old-aged	Male	PNEU	6 h 30 min	AD I	X	X	X
17	77	Old-aged	Male	C-INF	6 h 55 min	AD I	X	X	X
18	79	Old-aged	Female	INT-INF	6 h 25 min	AD I	X	X	–

NL: no lesions; CRIB: status cribosus; AD I: Alzheimer disease-related pathology with Braak and Braak stage I of neurofibrillary degeneration; 2D: Two-dimensional electrophoresis; 1D: Mono-dimensional electrophoresis; CA: carcinoma; PNEU: pneumonia; C-INF: cardiac infarction; THR-EMB: pulmonary thrombosis-embolism; MYO: myocardiopathy; INT-INF: intestinal infarction

2.3. NKT-adducted protein identification

The goat anti-NKT antibody (dilution 1:2000, Ab5611, Chemicon International) was used to detect NKT-adducted proteins. According to the indications of the supplier, the antibody, produced using neuroketal-conjugate as immunogen, has been shown to react with neuroketal/neuroprostane-modified proteins by ELISA. By western blotting, the antibody reacts with several major and many minor bands in human brain protein modifications.

This antibody has been previously used and validated in several brain regions and neurological diseases [29–31].

NKT-positive spots in the 2D gels were qualitatively compared by visual inspection between age groups. The selection of NKT-positive spots was based on the presence or increased intensity in old-aged individuals versus absence or reduced intensity in middle-aged individuals.

Selected NKT-adducted protein spots detected by western blot were matched with corresponding silver-stained spots in parallel gels. Selected spots were excised from 2D silver stained gels and subjected to in-gel tryptic digestion using the automatic protein digestion system Investigator™ Progest (Genomic Solutions). Briefly, the SDS-gel spots were cleaned with 25 mM ammonium bicarbonate and acetonitrile. Next, the sample was reduced (10 mM dithiothreitol for 30 min at 56 °C) and alkylated (55 mM iodoacetamide for 30 min at 21 °C in the dark). Afterwards, each sample was digested overnight at 37 °C with 80ng of sequencing grade modified trypsin (Promega). Finally, the resulting peptide mixture was extracted from the gel matrix with 10% formic acid and acetonitrile, and then dried-down.

The dried-down peptide mixture was analyzed in a nanoAcquity liquid chromatographer (Waters) coupled to a LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) mass spectrometer. Tryptic peptides were re-suspended in 1% formic acid and each aliquot was injected into a nanoAcquity Symmetry C18 trap column (5 μm, 180 μm × 20 mm; Waters). Trapped peptides were separated using a C18 nanoAcquity reverse phase capillary column (75 μm × 100 mm, 1.7 μm BEH130, Waters). The gradient used for elution of peptides was 0 to 40% B in 20 min, followed by a gradient from 40% to 60% in 5 min with a 250 nL/min flow rate (mobile phases, A and B, were composed of 0 and 100% acetonitrile, respectively, and each contained 0.1% formic acid). Eluted peptides were subjected to electrospray ionization in an emitter needle PicoTip™ (New

Objective) with an applied voltage of 2000 V. Peptide masses (*m/z* 350–1700) were analyzed in data-dependent mode with a full Scan MS in the Orbitrap with a resolution of 60,000 FWHM at 400 *m/z*. Up to 5 of the most abundant peptides (minimum intensity of 500 counts) were selected from each MS scan. Then, they were fragmented by collision induced dissociation in a linear ion trap using helium as collision gas with 38% normalized collision energy. Generated raw data were collected with Thermo Xcalibur v.2.1.0.1140 (Thermo Scientific).

2.4. Protein identification

Raw data were submitted for database searching with the Mascot search engine using Thermo Proteome Discover v.1.3.0.339 (Thermo Scientific) against Swiss-Prot database. Both target and a decoy database were searched to obtain a false discovery rate (FDR) and thus estimate the number of incorrect peptide-spectrum matches exceeding a given threshold. The following search parameters were applied: trypsin enzyme, 2 missed cleavages, carbamidomethyl of cysteine as fixed modification, oxidation of methionine as variable modification, and peptide tolerance of 10 ppm and 0.6 Da (for MS and MS/MS spectra, respectively).

To improve the sensitivity of the database search, Percolator (semi-supervised learning machine) was used to discriminate correct from incorrect peptide spectrum matches. Percolator assigns a *q*-value to each spectrum, which is defined as the minimal FDR at which the identification is deemed correct. These *q* values are estimated using the distribution of scores from decoy database search (Percolator Target FDR, strict: 0.01; Validation based on: *q*-value). The list of resulting proteins was filtered to accomplish two restrictions: containing *Homo sapiens* in the description and having at least 2 high-confidence peptides (FDR ≤ 0.01).

2.5. Western-blotting

2D gels obtained in a sub-set of samples were used to detect NKT-adducted proteins. Total number of cases (*n*=18) was analyzed by western blotting for total levels of selected proteins in mono-dimensional (1D) gels. Equal amounts of total protein for each sample were loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gels and separated according to their molecular weight. Polyacrylamide gels (1D or 2D) were transferred onto nitrocellulose membranes

using the Trans-Blot® Turbo™ blotting system (Bio-Rad). Transferred membranes were blocked with 5% skimmed milk in TBS-T buffer and incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibody diluted with 3% BSA in TBS-T. Then the membranes were washed in TBS-T and incubated with the corresponding secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (HRP), and washed again in TBS-T. Immunoreactivity was detected with the chemiluminescence method (Amersham ECL Western blotting detection reagents, GE Healthcare).

To validate the LC-MS/MS identification results, selected proteins were tested with the corresponding antibodies on the same 2D membranes after stripping. Strip of membranes consisted of two sequential washes in stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 100 mM β -mercaptoethanol) at 65 °C, three washes in TBS-T at room temperature, and blockage with 5% skimmed milk in TBS-T buffer. A list of the antibodies employed is shown in [Supplementary Table 1](#).

2.6. Slot-blot

The level of soluble oligomeric species was detected with slot blot analysis using the anti-oligomers A11 antibody (AHB0052, Invitrogen) according to the manufacturer's protocol for dot-blotting. A11 antibody detects specific oligomeric structural conformations. Previous to this analysis, A11 antibody was tested (by slot-blot with the same protocol) against monomeric A β_{40-42} ; no signal was detected thus confirming the specificity of the assay. In order to obtain soluble proteins at non-denaturing concentrations of compounds on the original lysis buffer, samples were diluted 1:10 (v/v) in phosphate buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7.4) and allowed proteins to re-nature minimizing aggregation. Then, samples were centrifuged at 16,000g for 5 min at room temperature; the insoluble pellet was discarded and protein concentration determined by Bradford assay.

Equal amounts of total protein of each sample were slot-blotted onto nitrocellulose membranes by vacuum using a SHM-48 slot blotter unit (Scie-Plas). Ponceau staining (AppliChem GmbH) was used to verify equal protein loads after blotting. The membranes were blocked in 10% skimmed milk, incubated overnight with A11 antibody, washed, incubated with the secondary anti-rabbit HRP conjugated antibody, and washed using buffers and dilutions recommended by the supplier. Immunoreactivity detection was performed with chemiluminescence as for western-blot. After oligomer detection, the membranes were stripped and tested against NKT to explore possible quantitative relation in the amount of NKT and oligomeric species in the same protein fraction as well as total NKT levels.

2.7. Densitometry

Densitometry of monodimensional gel protein bands and slots was used to determine expression levels. The quantification analysis was performed with TotalLab software (Nonlinear Dynamics). β -tubulin in monodimensional gels and total protein (from Ponceau staining) in slots were used as internal controls of protein loading prior to statistical analysis.

2.8. Bioinformatics-based protein characterization

Proteins under study were identified by their UniProt database accession numbers (<http://www.uniprot.org/>); particular cellular locations and functions are reported in accord with this database. For analysis of the structural features PredictProtein web-based software (<https://www.predictprotein.org/>) was employed. Functional protein-protein interaction network analysis was performed

using the web-based STRING software (<http://www.string-db.org/>) [32]. Gene Ontology (GO) and pathway analysis was performed using Cytoscape software with the ClueGO and CluePedia plugins including information from KEGG, REACTOME, and STRING databases [33,34].

2.9. Statistical analyses

Descriptive data were expressed as mean \pm standard deviation or as percentages when needed. Kruskal–Wallis test with Lilliefors correction was used to probe the normality assumption for continuous variables. Student's *t* test and Mann–Whitney *U* test, as appropriate, were used to evaluate differences between age groups. Pearson correlations were employed to assess possible relations among variables. In addition, NKT and soluble oligomer levels were subjected to factor analysis using Principal Components Analysis (PCA). For all the tests, *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were carried out using STATISTICA v8.0 software (StatSoft).

3. Results

3.1. 2D gel electrophoresis and NKT adducted-protein identification

PC, FC, and CG samples of the ten cases covering the two groups of age distribution (middle-aged, old-aged) were analyzed with 2D electrophoresis and anti-NKT western blotting. NKT-positive spots were qualitatively compared by visual inspection between age groups. Thirty-nine NKT-positive spots were selected as being of interest based on increased intensity or presence in old-aged individuals ([Fig. 1](#)). The corresponding spots in the silver-stained gels processed in parallel were excised, in-gel digested, and analyzed with LC-MS/MS for protein identification. The full list of spots and the corresponding LC-MS/MS resulting identifiers is shown in [Table 2](#).

3.2. Validation of identified proteins

In order to corroborate that protein gel spots were accurately identified by LC-MS/MS, thirteen top candidate proteins (ATP5A1, BASP1, CKB, CRYAB, ENO1, GAPDH, GFAP, HBA1, HSPD1, NEFL, PARK7, UCHL1 and YWHAG) were analyzed. 2D anti-NKT blotted membranes were stripped and blotted against specific antibodies corresponding to proteins of interest ([Supplementary Fig. 1](#)). The resulting spots were matched with the original ones over the same 2D membrane, and protein identities were corroborated. However, UCHL1 matched a group of NKT-positive spots but displaced to a more basic isoelectric point.

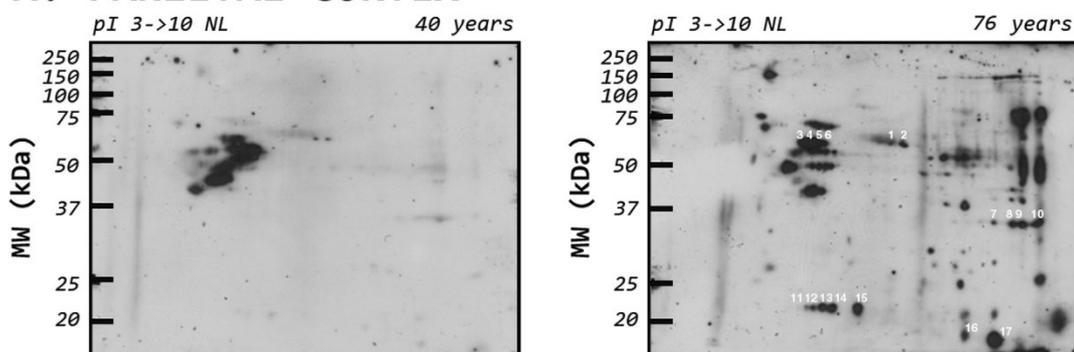
3.3. NKT adducted proteins with respect to age in each region

A final list of twenty-five protein targets of lipoxidation by NKT adduction is shown in [Table 3](#) which includes their locations and functions. The number of cases per age group and region in which proteins were oxidized is presented in [Fig. 2](#).

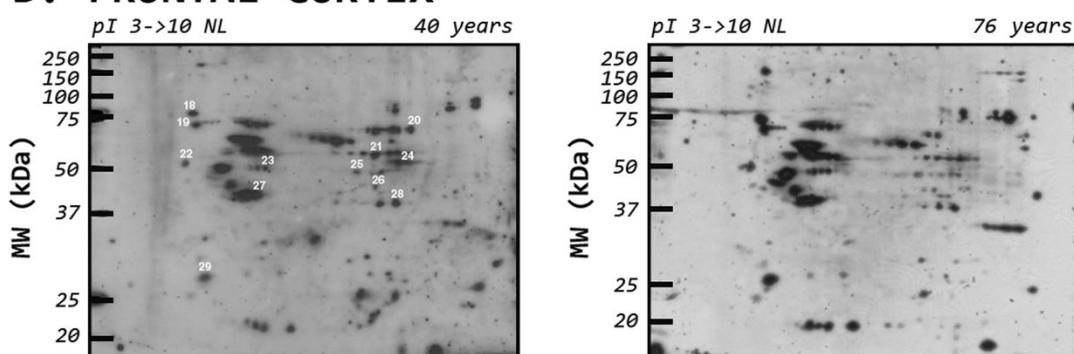
In the PC ([Fig. 2A](#)), 8 proteins (32%) showed the same levels of lipoxidation in both age groups (ATP5A1, DLD, GFAP, NEFL, NEFM, HSPD1, BASP1, and SYN1) while 17 (68%) manifested increased lipoxidation with age (CKB, GAPDH, PGAM1, ENO1, PKM2, ACO2, TPPP, PARK7, CRYAB, GOT1, DPYSL2, YWHAG, HBA1, CA1, BLVRB, PEBP1, and UCHL1). Four of them (PKM2, ACO2, CRYAB, and HBA1) were oxidized only in old-aged cases.

In the FC ([Fig. 2B](#)), 6 proteins (24%) showed no differences in the presence of NKT adduction between middle-aged and old-aged individuals (CKB, GAPDH, GFAP, NEFL, NEFM, and HSPD1) whereas

A. PARIETAL CORTEX



B. FRONTAL CORTEX



C. CINGULATE GYRUS

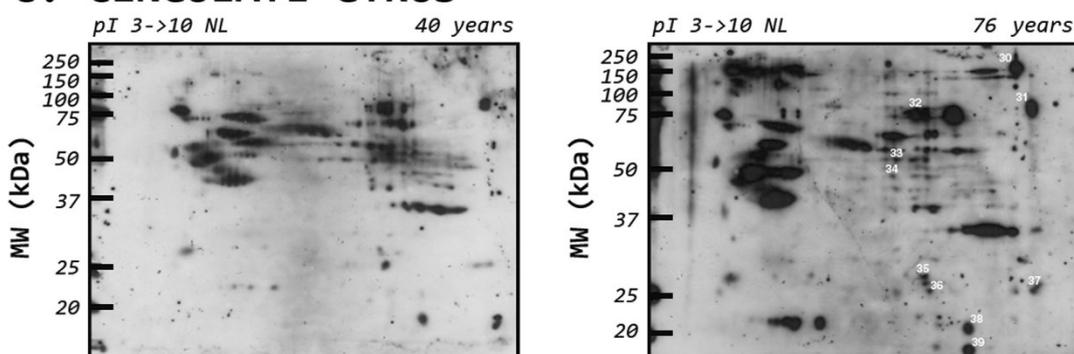


Fig. 1. Bi-dimensional (2D) gel electrophoresis and western blotting to neuroketal (NKT) of the parietal cortex (A), frontal cortex (B) and cingulate gyrus of two representative samples of middle-aged (40 years, left column) and old-aged (76 years, right column) individuals (corresponding to cases 1 and 16 in Table 1). Thirty nine spots (labeled in white numbers) were selected considering NKT adduction differences in all the cases analyzed for further identification by mass spectrometry.

19 proteins (76%) presented increase in the NKT adducted forms in old-aged individuals (PGAM1, ENO1, PKM2, ACO2, ATP5A1, DLD, TPPP, PARK7, CRYAB, GOT1, DPYSL2, BASP1, YWHAG, HBA1, CA1, BLVRB, PEBP1, SYN1, and UCHL1). One protein, HBA1, was lipoxidized only in old-aged individuals.

In the CG (Fig. 2C), 7 proteins (28%) showed no differences between groups (PKM2, GFAP, NEFL, NEFM, HSPD1, DPYSL2, and YWHAG) whereas increased lipoxidation occurred in the 18

remaining proteins (72%) in older cases (CKB, GAPDH, PGAM1, ENO1, ACO2, ATP5A1, DLD, TPPP, PARK7, CRYAB, GOT1, BASP1, HBA1, CA1, BLVRB, PEBP1, SYN1, and UCHL1).

The most frequently lipoxidized proteins, accounting for at least 70% of cases, were GFAP (100%), HSPD1 (100%), CKB (93.33%), GAPDH (93.33%), NEFL (93.33%), NEFM (80%), DPYSL2 (80%), DLD (73.33%), PEBP1 (70%), and SYN1 (70%). Considering the cumulative presence of lipoxidized proteins by age group (Fig. 2D),

Table 2
Identification of lipoxidized proteins with mass spectrometry.

Spot	Protein	Swiss-prot Accession no.	Mascot score	Coverage (%)	MW (kDa)	pI
1	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYSL2)	Q16555	724.28	48.43	62.25	6.38
2	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYSL2)	Q16555	1085.17	62.76	62.25	6.38
3	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	P10809	4087.37	83.60	61.02	5.87
4	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	P10809	2275.19	77.49	61.02	5.87
5	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	P10809	4285.96	89.35	61.02	5.87
6	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	P10809	2412.60	72.25	61.02	5.87
7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406	1937.82	88.06	36.03	8.46
8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406	1711.18	70.45	36.03	8.46
9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406	2334.34	79.10	36.03	8.46
10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406	842.06	43.28	36.03	8.46
11	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1)	P09936	1082.92	78.03	24.81	5.48
12	Protein DJ-1 (PARK7)	Q99497	625.43	89.42	19.88	6.79
13	Protein DJ-1 (PARK7)	Q99497	1262.00	89.42	19.88	6.79
14	Protein DJ-1 (PARK7)	Q99497	1065.72	85.71	19.88	6.79
15	Protein DJ-1 (PARK7)	Q99497	808.75	89.42	19.88	6.79
16	Alpha-crystallin B chain (CRYAB)	P02511	2069.68	97.14	20.15	7.53
17	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1)	P30086	2255.23	81.28	21.04	7.53
18	Neurofilament medium polypeptide (NEFM)	P07197	479.13	12.77	102.41	4.91
19	Neurofilament light polypeptide (NEFL)	P07196	902.93	41.25	61.47	4.65
20	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (PKM2)	P14618	860.77	42.94	57.90	7.84
21	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYSL2)	P09622	337.68	25.34	54.14	7.85
22	Brain acid soluble protein 1 (BASP1)	P80723	800.65	81.50	22.68	4.63
23	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	P14136	1830.71	64.35	49.85	5.52
24	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP5A1)	P25705	1447.00	46.65	59.71	9.13
25	Alpha-enolase (ENO1)	P06733	709.67	33.87	47.14	7.39
26	Alpha-enolase (ENO1)	P06733	728.28	41.71	47.14	7.39
27	Creatine kinase B-type (CKB)	P12277	724.17	56.96	42.62	5.59
28	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (GOT1)	P17174	1116.53	68.28	46.22	7.01
29	14-3-3 protein gamma (YWHAQ)	P61981	1494.57	80.97	28.28	4.89
30	Hemoglobin subunit alpha (HBA1)	P69905	1400.82	85.21	15.25	8.68
31	Synapsin-1 (SYN1)	P17600	315.53	32.06	74.07	9.83
32	Aconitate hydratase, mitochondrial (ACO2)	Q99798	606.55	34.36	85.37	7.61
33	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYSL2)	P09622	504.52	28.29	54.14	7.85
34	Alpha-enolase (ENO1)	P06733	2341.02	55.53	47.14	7.39
35	Carbonic anhydrase 1 (CA1)	P00915	481.65	52.49	28.85	7.12
36	Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1)	P18669	261.15	65.75	28.79	7.18
37	Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP)	O94811	528.08	36.07	23.68	9.44
38	NADPH-Flavin reductase (BLVRB)	P30043	323.79	42.23	22.11	7.65
39	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1)	P30086	466.32	48.13	21.04	7.53

lipoxidation of specific proteins in all the regions increased in old-aged individuals. In the PC, values of cumulative count varied from 48 in middle-aged to 67 in old-aged cases. In FC, values varied from 79 in middle-aged to 107 in old-aged; whereas in the CG, there were 76 in middle-aged and 104 in old-aged individuals.

3.4. Quantification of selected lipoxidized protein levels

To determine whether increased lipoxidation of certain proteins might not be merely the result of the increased expression levels of that particular protein, selected protein levels were quantified. Proteins with no differences in any region (GFAP, NEFL, NEFM and HSPD1) were excluded. Proteins for which no commercial antibodies were available (PKM2, DPYSL2, DLD, PEBP1, SYN1, GOT1, PGAM1, ACO2, TPPP, CA1 and BLVRB) were not analyzed. Finally, six lipoxidized proteins with increased cumulative levels of lipoxidation in old aged cases at least in two regions were assessed using 1D SDS-PAGE electrophoresis and western blotting with specific available antibodies: ATP5A1, CKB, ENO1, GAPDH, YWHAQ and UCHL1. Quantification of the bands was carried out by densitometry (Supplementary Fig. 2). Protein levels were compared between age in each region after checking normality of variables (non-normal data: ATP5A1 in PC; ENO1 and HBA1 in FC; and UCHL1 in CG). Statistical results of these comparisons are summarized in Supplementary Table 2, and graphically represented in Supplementary Fig. 3. There were no significant differences in the total expression levels of assessed proteins in any region when comparing middle-aged and old-aged groups,

excepting significant decreased levels of YWHAQ ($p < 0.02$) in the FC in the old-aged group, thus indicating that increased lipoxidation levels of defined proteins were not the result of increased expression of the corresponding total protein.

3.5. Characterization of lipoxidized proteins

To learn about the commonalities of proteins vulnerable to lipoxidation, their structures were analyzed using PredictProtein web-based software. The structural characteristics are represented in Fig. 3.

Excluding BASP1, in which 100% is loop or disorganized, α -helix motive represents between 5.14% and 83.10%, β -strand represents between 1.2% and 31.43% (absent in NEFL and HBA1), and loops represent between 16.9 and 75.46% (Fig. 3A). Proteins with secondary structures forming α -helix plus loops represent between 68.5% and 98.8%. Interestingly, exposure to the medium varied between 42.6% and 100%, and it was superior to 50% in 16 proteins (Fig. 3B).

Regarding amino acid composition, the most common amino acids represented are alanine (mean frequency in the group: 9.71%), leucine (mean frequency in the group: 8.74%), and glycine (mean frequency in the group: 8.02%) as reported for the total pull of proteins present in Swiss-Prot database. However, the most frequent amino acids encountered in the exposed regions of lipoxidized proteins are lysine (mean frequency: 12.16%), glutamic acid (mean frequency: 11.44%), and aspartic acid (mean frequency: 8.53%) (Fig. 3C).

Table 3
Lipopoxidized proteins: localization and functions.

Protein	Main localization	Functions
Creatine kinase B-type (CKB)	Cytosol, EVE	Energy metabolism Energy transduction
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Cytosol, cytoskeleton, nucleus, EVE	Glycolysis (step 6); nuclear functions; organization of cytoskeleton
Phosphoglyceratemutase 1 (PGAM1)	Cytosol, EVE	Glycolysis (step 8); regulates anabolic biosynthesis
Alpha-enolase (ENO1)	Cytosol, membrane, nucleus, EVE	Glycolysis (step 9); growth control; hypoxia tolerance; immune responses
Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (PKM2)	Cytosol, nucleus, EVE	Glycolysis (last step); linked to caspase-independent programmed cell death
Aconitate hydratase (ACO2)	Mitochondrion, nucleus	Catalyzes the isomerization of citrate to isocitrate within the tricarboxylic acid cycle
ATP synthase subunit alpha (ATP5A1)	Mitochondrion, EVE	Component of the ATP synthase complex which produces ATP during the oxidative phosphorylation
Dihydrolipoyl dehydrogenase (DLD)	Mitochondrion	Component of the pyruvate, α -ketoglutarate and branched-chain amino acid dehydrogenase complexes, and of the glycine cleavage system
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Glial cytoskeleton - intermediate filament	Cytoskeleton Structural constituent of cytoskeleton; cell-specific marker that distinguishes astrocytes
Neurofilament light polypeptide (NEFL)	Cytoskeleton - neurofilament	Neuronal cytoskeleton; maintenance of neuronal caliber; axon cargo transport
Neurofilament medium polypeptide (NEFM)	Cytoskeleton - neurofilament	Neuronal cytoskeleton; maintenance of neuronal caliber; axon cargo transport
Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP)	Cytoskeleton, nucleus, EVE	Integrity of microtubule network; mitotic spindle assembly and nuclear envelope breakdown
60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	Mitochondrion, cytosol, EVE	Proteostasis Mitochondrial protein import and macromolecular assembly; folding of proteins; apoptotic process
Protein DJ-1 (PARK7)	Cytosol, nucleus, mitochondrion, EVE	Protects against oxidative stress and cell death; chaperone activity; pleiotropic regulatory activities
Alpha-crystallin B chain (CRYAB)	Cytosol, nucleus, EVE	Chaperone-like activity; prevents aggregation of proteins under stress conditions
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1)	Cytosol, membrane, ER, EVE	Processing of ubiquitin precursors and ubiquitinated proteins
Aspartate aminotransferase (GOT1)	Cytosol, nucleus, EVE	Neurotransmission Biosynthesis of α -glutamate; regulator of glutamate levels; scavenger of glutamate in neuroprotection
Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYSL2)	Cytosol, cytoskeleton, membrane, EVE	Neuronal development and polarity including axon growth and guidance, growth cone collapse and cell migration; synaptic vesicle trafficking
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1)	Cytosol nucleus, EVE	Binds ATP, opioids and phosphatidylethanolamine; inhibitor of serine proteases and RAF1 kinase activity
Synapsin-1 (SYN1)	Golgi apparatus, synaptic vesicle	Coats synaptic vesicles and regulates neurotransmitter release; pre-synaptic nitric oxid functions
Brain acid soluble protein 1 (BASP1)	Cytosol, membrane, nucleus, EVE	Protein and DNA binding; transcription regulatory activity; development regulation
14-3-3 protein gamma (YWHAG)	Cytosol, EVE	Regulation of a large spectrum of general and specialized signaling pathways
Hemoglobin subunit alpha (HBA1)	Cytosol, EVE	O₂/CO₂/heme metabolism Oxygen transport
Carbonic anhydrase 1(CA1)	Cytosol, EVE	Reversible hydration of CO ₂ ; hydrates cyanamide to urea
NADPH-Flavin reductase (BLVRB)	Cytosol, membrane, nucleus, EVE	Oxidoreductase: catalyzes NADPH-dependent reduction of a variety of flavins; heme catabolism;

Note: Localization and functions based on the reported in the UniProt database (<http://www.uniprot.org/>). ER, endoplasmic reticulum; EVE, extracellular vesicular exosome. Proteins are separated into the groups: energy metabolism, cytoskeleton, proteostasis, neurotransmission, and O₂/CO₂ and heme metabolism.

With respect to the cellular location, analysis of GO term “cellular component” annotation revealed that the best represented sub-cellular localizations of lipoxidized proteins were cytoplasm, cytoskeleton, mitochondrion, and exosome. For the GO term “molecular function” lipoxidized proteins over-represented terms are binding, catalytic activity, and structural molecule.

Interactions of these proteins were explored using the STRING web-based tool. The network of interactions used for the analysis with a high confidence level of combined score computed and no more than 10 external partners is shown in Fig. 4. Interestingly, the central node of the resulting network is occupied by ubiquitin.

The over-represented functional pathways in which lipoxidized proteins are involved were explored using Cytoscape software. The results from this analysis are presented in Fig. 5 showing a high representation of GO term for processes related with energy metabolism (including glycolysis and gluconeogenesis, citric acid cycle, mitochondrial respiration, and rapid energy production), intermediate filament based process, axon cargo transport, cytoskeleton-dependent intracellular transport, protein stabilization, mitochondrial protein import, and carbon-oxygen lyase activity. Roughly 32% of lipoxidized proteins are involved in energy

metabolism (CKB, GAPDH, PGAM1, ENO1, PKM2, ACO2, ATP5A1, and DLD), 16% in cytoskeleton-related functions (GFAP, NEFL, NEFM, and TPPP), 16% in proteostasis (HSPD1, PARK7, CRYAB, and UCHL1), 24% in neurotransmission directly or indirectly (PEBP1, SYN1, GOT1, DPYSL2, BASP1, and YWHAG), and the remaining 8% and 4% in O₂/CO₂ (HBA1 and CA1) and heme-group metabolism (BLVRB), respectively.

3.6. Soluble oligomers and NKT levels

The levels of soluble oligomers as revealed with the A11 antibody (Fig. 6A) and NKT (Fig. 6B) were detected with slot-blot densitometric analysis comparing middle-aged versus old-aged cases in every region using Student's *t*-test. Soluble oligomer levels were significantly increased in the older group with respect to middle-aged cases in the PC ($t = -2.83$, $p < 0.01$) and FC ($t = -3.98$, $p < 0.001$), whereas, no significant differences were found between age groups in the CG. With respect to NKT, only significantly increased levels ($t = -3.32$, $p < 0.005$) were found in the old-aged group when compared with middle-aged cases in the FC.

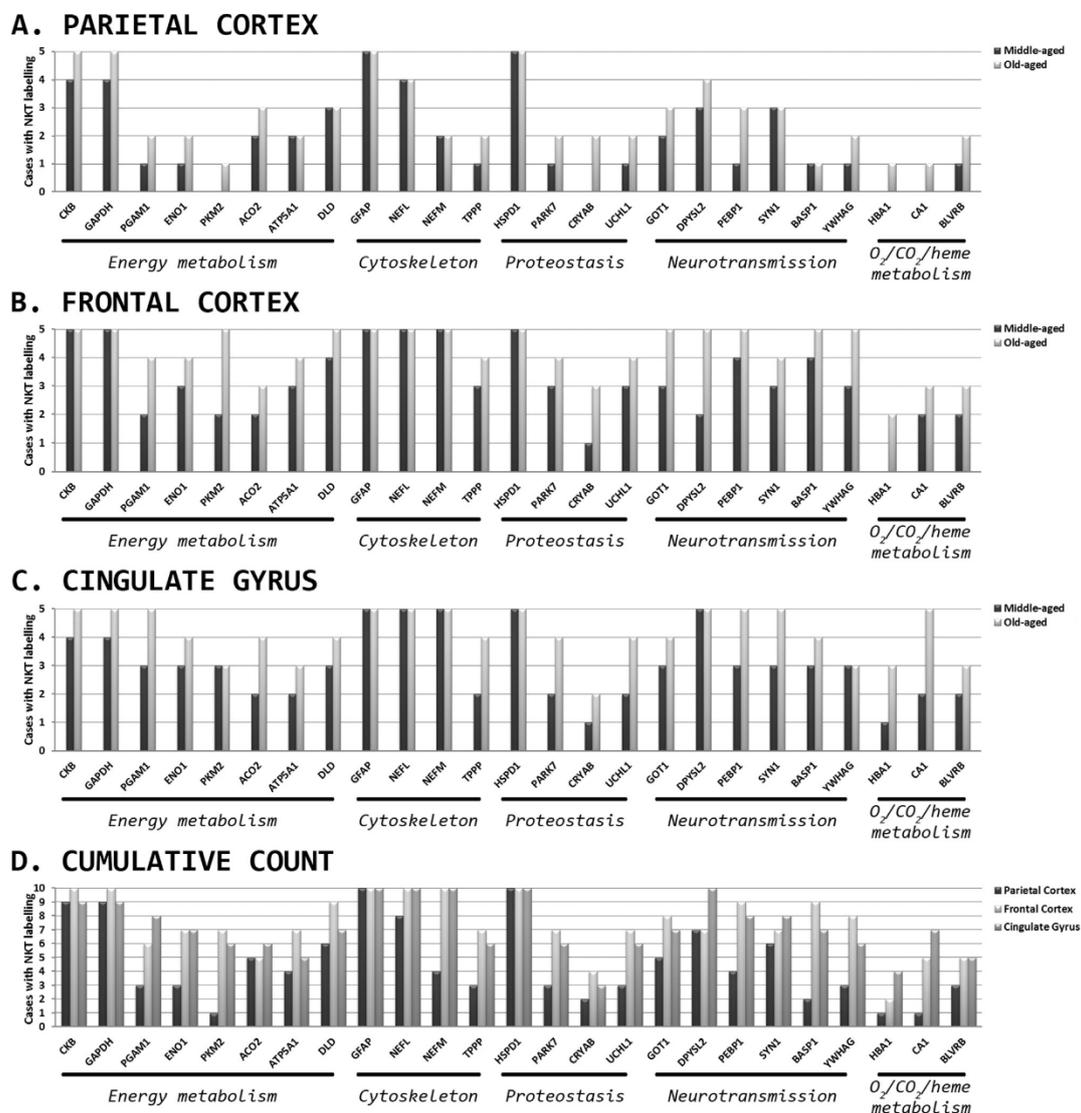


Fig. 2. Number of cases by age group with presence of neuroketal adducted forms of the twenty five selected proteins identified by redox proteomics in the parietal cortex (A), frontal cortex (B), cingulate gyrus (C) and cumulative counts of the three regions (D). Proteins are discriminated into clusters corresponding to energy metabolism, cytoskeleton, proteostasis, neurotransmission, and O₂/CO₂/heme metabolism. Number of cases with protein neuroketal adducts are higher in old-aged when compared with middle-aged individuals, but most oxidized proteins are already present in middle-aged individuals. Note that the cytoskeletal proteins GFAP, NEFL and NEFM, and the chaperone HSPD1 show the same level of oxidative modifications in middle-aged and old-aged individuals.

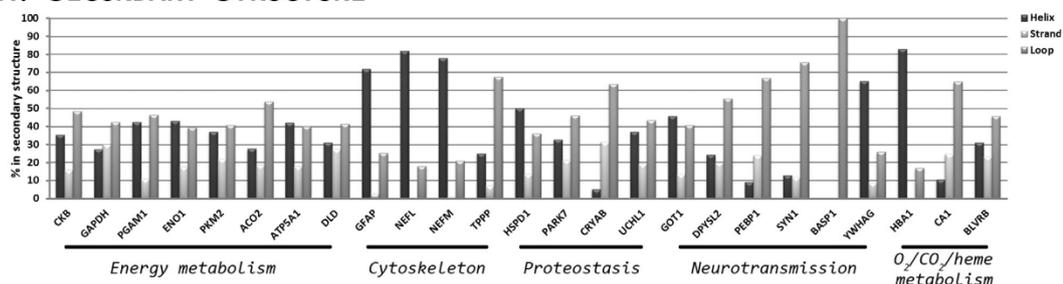
The same pattern was found when results were analyzed for significant continuous relations with age (Pearson's correlation). Positive significant correlations with age for oligomers in PC ($r=0.52$, $p < 0.045$), for oligomers ($r=0.65$, $p < 0.008$), and for NKT ($r=0.57$, $p < 0.025$) in FC (Fig. 6C). No correlation was found with age in the CG.

Significant positive correlations were seen between oligomers and NKT levels present in each one of the explored regions (PC: $r=0.70$, $p < 0.004$; FC: $r=0.89$, $p < 0.000$; CG: $r=0.86$, $p < 0.000$), which are represented in Fig. 7A.

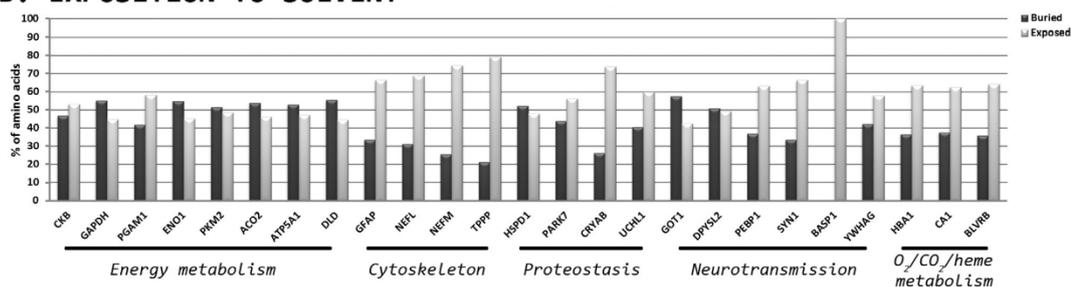
To reduce dimensionality while preserving the maximum amount of information to infer significant associations between

variables, Principal Components Analysis was used including oligomers and NKT levels for each region as active variables and age as supplementary variable (Fig. 7B). Two principal components explained 83.18% of the variance in the data, the first component (Factor 1: 52.49% of the variance) with a high information contribution from oligomer and NKT levels in PC and FC, and the second component (Factor 2: 30.69% of the variance) with information from oligomer and NKT levels in CG. Both factors were negatively correlated to age, but factor 1 showed a closer relation than factor 2. The projection of variables in the factor-plane graph summarizes this information, showing the closer positive relation of soluble oligomers and NKT levels in PC and FC among them and

A. SECONDARY STRUCTURE



B. EXPOSITION TO SOLVENT



C. MOST FREQUENT AMINO ACIDS IN EXPOSED STRUCTURE

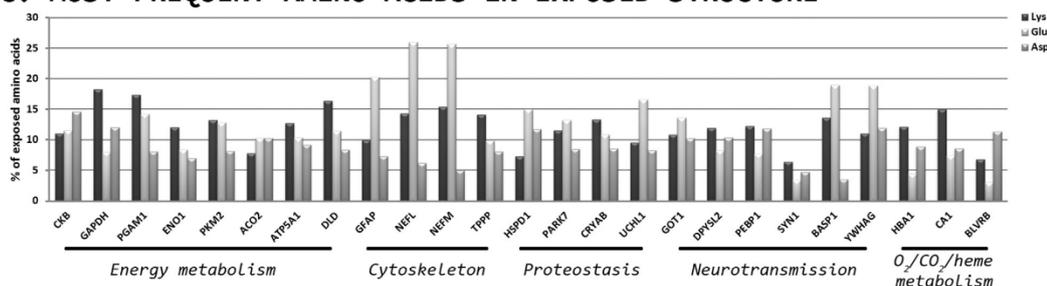


Fig. 3. Structural characterization of the group of neuroketal-adducted proteins as revealed with the PredictProtein software analysis. Predominant structures of oxidized proteins are helix and loops (A). Most proteins have structures exposed to solvents (B). The most frequent amino acids exposed are lysine, glutamic acid and aspartic acid (C).

with age, and the more distant pattern of oligomers and NKT levels in CG.

4. Discussion

4.1. Protein lipoxidation in human cerebral cortex occurs at middle age and increases with physiological senescence

Cases analyzed were considered normal individuals with no neurological or mental diseases and with no neuropathological alterations excepting stage I of Braak and Braak and moderate status cribrus in some older cases. About 80% of individuals aged 65 years have neurofibrillary tangles in the entorhinal and transentorhinal cortices [35]. Factors other than age that might have interfered with the analysis of oxidized proteins, such as metabolic diseases and hypoxia were ruled out. Causes of death were similar in the two groups of cases. Post-mortem delay was within the range of feasibility [28]. Finally, the NKT antibody has been used and validated in previous studies [29–31].

Twenty-five NKT-adducted proteins were identified in the cerebral cortex of normal middle-aged and old-aged individuals.

Four proteins, GFAP, NEFL, NEFM, and HSPD1, showed the same cumulative presence of NKT-adducted forms in the three regions and in both age groups. Some proteins having the same cumulative levels of NKT adducted forms in both age groups were identified in distinct regions: ATP5A1, DLD, BASP1, and SYN1 in PC; GAPDH and CKB in the FC; and PKM2, DPYSL2, and YWHAG in the CG. However, adducted forms of all these proteins in a particular region increased in the other two regions in old-aged individuals.

The degree of lipoxidation of the vast majority of remaining proteins identified by the accumulation of NKT adducts was higher in old-aged individuals when compared to middle-aged cases in spite of regional variations. These proteins are PGAM1, ENO1, ACO2, TPPP, PARK7, CRYAB, GOT1, HBA1, CA, BLVRB, PEBP1, and UCHL1. However, certain proteins were lipoxidized only in old-aged individuals in certain regions such as PKM2, HBA1, and CA in the PC, and HBA1 in the FC.

Together, these observations show, on the one hand, that the cerebral cortex in individuals aged between 40 and 48 years contains lipoxidized proteins the levels of which vary from one region to another, and, on the other hand, that cumulative presence of NKT adducted forms increases in individuals aged between 70 and 79 years.

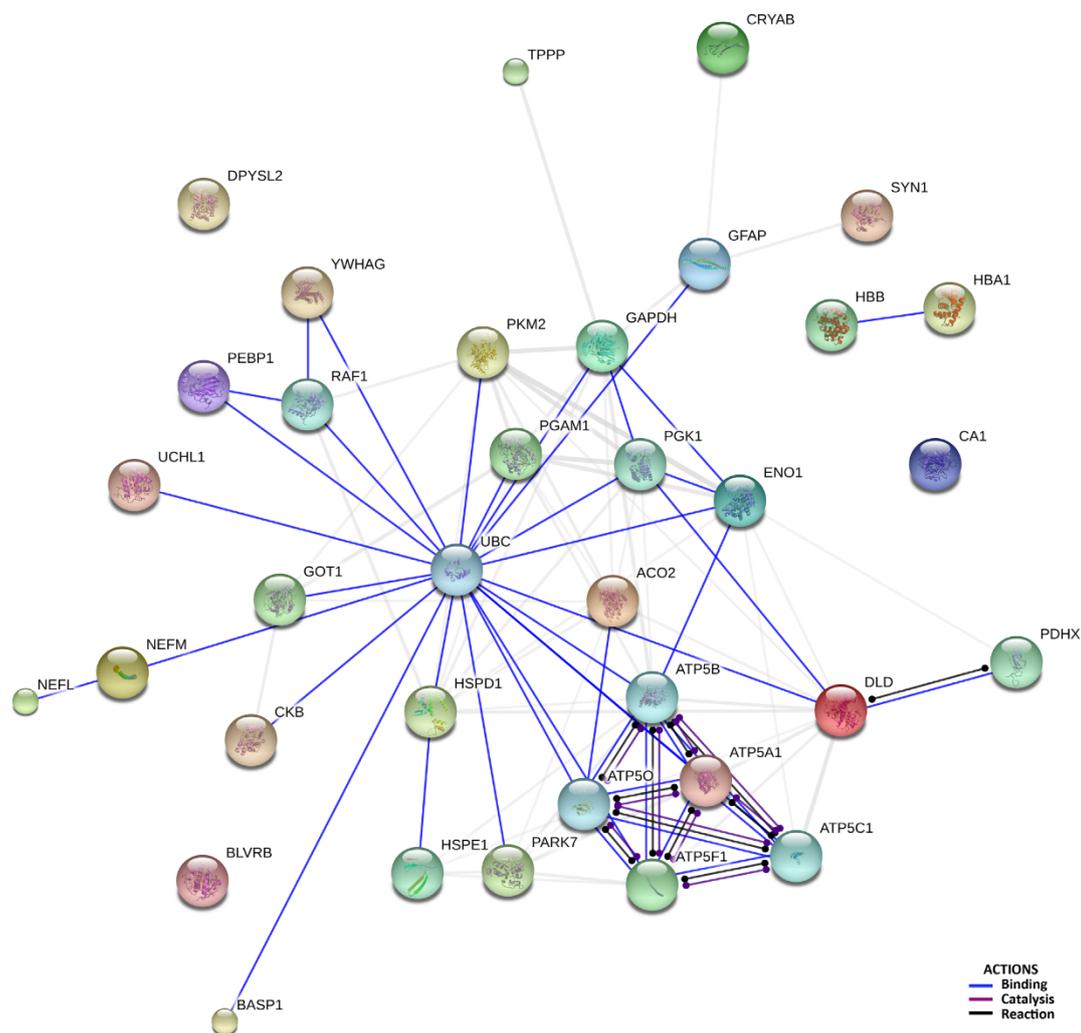


Fig. 4. Protein–protein interactions networks derived from the STRING software analysis of the identified neuroketal-adducted proteins. Several robust interactions are encountered in the diagram; interestingly, ubiquitin is a center interacting molecule for several lipoxidized proteins.

Importantly, increased lipoxidation is not related to increased levels of the corresponding protein but rather to increased vulnerability to lipoxidation with age as revealed by the higher values of oxidation compared with preserved total levels of the same protein.

4.2. Selective protein lipoxidation in human cerebral cortex

Susceptibility to lipoxidation is not uniform in all proteins [15,36]. Assuming that ROS act stochastically, several factors can influence this specificity beyond abundance including structure, location, and functional characteristics. Localization of proteins, a particular cell type or subcellular compartment, may make them more vulnerable as a result of their environmental conditions [37]. An example of cell type-related vulnerability is GFAP localized in astrocytes which are the main brain producers of DHA [38] and its peroxidation derivatives. Regarding subcellular localization, HSPD1 and DLD are located in the mitochondria, the principal

source of ROS [39]. NEFL and NEFM are proteins of the cytoskeleton, as well as DPYSL2 which is also located in the growth cones; PEBP1 is involved in neurotransmission and SYN1 is present in synaptic vesicles. It is worth stressing that axons and synaptic terminals have high energy demands achieved by continuous mitochondrial activity and recruitment, and rapid energy transduction mediated by CKB. In addition, axons are radial structures with a small diameter in comparison with the cell body which increases the probability of stochastic interactions between ROS and membrane lipids, thus propitiating lipid peroxidation.

The present findings also show that certain structural traits, mainly the presence of alpha helices and loops, render proteins susceptible to oxidative damage. Excepting cytoskeletal proteins, the rest of the proteins identified as targets of lipoxidation (excluding BASP1 which is completely disordered) are globular and form soluble coiled-shaped molecules with hydrophobic groups at the core and exposed hydrophilic groups. Moreover, proteins with the revealed amino acids lysine, glutamic acid, and aspartic acid

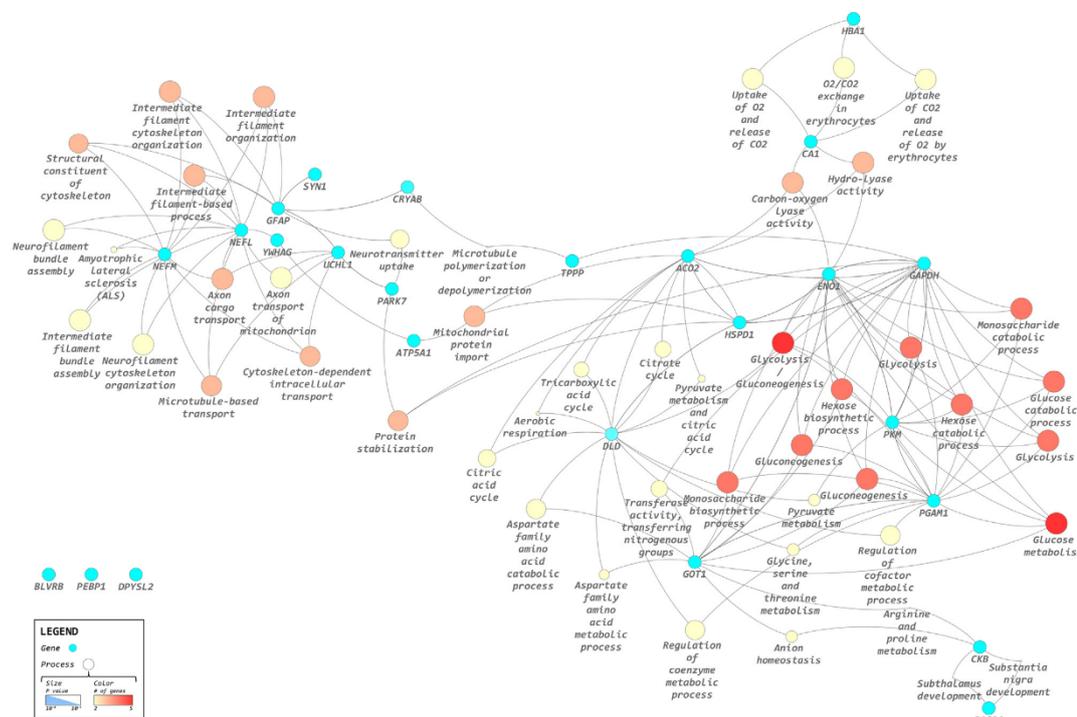


Fig. 5. Overrepresented pathways and connections of genes encoding neuroketal-adducted proteins resulting from the analysis of enriched Gene Ontology (GO) terms using Cytoscape software, and including information from GO pathway and functions, KEGG, REACTOME and STRING databases.

are also particularly vulnerable; the average level of exposure is greater than 50% in sixteen proteins.

4.3. Functional clustering of oxidatively-damaged proteins

Principal systems affected by protein lipoxidation, considering the number of identified damaged proteins, are energy metabolism, cytoskeleton, proteostasis, neurotransmission, and O_2/CO_2 and heme metabolism.

There is strong evidence that energy metabolism is particularly affected during aging and neurodegeneration [9,12,18]. The present observations give some clues about the molecular substrates of energy failure with aging after the identification of key proteins as targets of lipoxidative damage, including proteins of the glycolysis GAPDH, PGAM1, ENO1, and PKM2; proteins of the citric acid cycle ACO2 and DLD; and ATP5A1 subunit of the respiratory mitochondrial complex V. All of them are components of coupled processes necessary to fulfill ATP requirements of cells. Neuronal activity is highly dependent on these processes since, under normal conditions, glucose is the exclusive energy substrate for the brain [40]. In addition, CKB is in charge of rapid ATP production from phosphocreatine reservoirs in response to acute increased energy demands in neurons, but CKB is also a key player in the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis [41]. Thus CKB provides neurons with a reservoir and also an alternative source of ATP from glycolysis, citric acid cycle, and respiration.

Cytoskeletal GFAP, NEFL, and NEFM are filamentous proteins composed of long parallel chains, linked by disulfide cross bridges, making the proteins very stable and prone to long half-lives. The present results are in line with previous observations showing that neurofilaments are major targets of 4-hydroxynonenal adduction

(another marker of lipid peroxidation that covalently links lysine) in mice nervous system [42,43]. They also support the concept that oxidation of certain cytoskeletal proteins is under a tightly regulated mechanism of redox control during life-span [42]. Whether these changes do occur in the same direction in other brain regions is not known; nor is the functional implication of the high constant levels of oxidation of GFAP, NEFL, and NEFM in the three regions examined of the cerebral cortex understood. Moreover, a certain degree of lipoxidation in selected cytoskeletal proteins turns out perhaps to be useful for the normal functioning of the cytoskeleton. Whether possible disturbances of tubulin polymerization result from increased NKT adducts with aging in TPPP remains speculative.

Oxidation of chaperones involves mitochondrial (HSPD1) and cytosolic (CRYAB) molecules. HSPD1 modulates protein import and folding into the mitochondria [44]; CRYAB exhibits chaperone-like activity, and is able to prevent protein aggregation during stress situations while also increasing the resistance of cells to oxidative injuries [45]. PARK7 is a redox-dependent chaperone that reduces intracellular ROS through oxidation of itself [46], maintains mitochondrial homeostasis [47], and regulates gene transcription [48].

Regarding oxidized proteins linked to neurotransmission, PEBP1 modulates choline acetyltransferase during acetylcholine synthesis [49]. Phosphoprotein SYN1 coats synaptic vesicles, modulating synaptic vesicle release, synaptic transmission, and plasticity [50]. GOT1 participates in the synthesis and regulation of the levels of glutamate [51], the neurotransmitter responsible for around 90% of the excitatory synapses on the brain. BASP1 is found in nerve terminals, enriched in synaptic vesicles and in the lipid raft fraction of synaptic plasma membranes [52]; BASP1 regulates

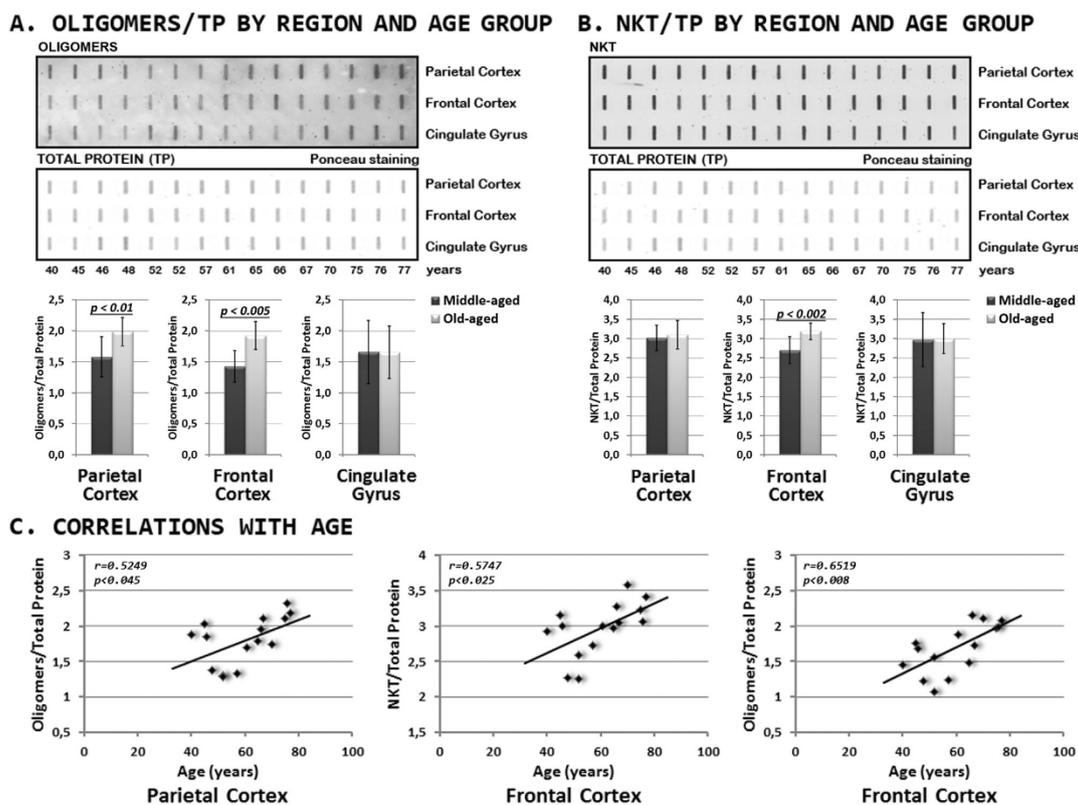


Fig. 6. Slot-blot quantification of soluble oligomers (antibody A11) (A) and total neuroketal (NKT) (B) levels in the parietal cortex, frontal cortex and cingulate gyrus in middle-aged and old-aged individuals; significant differences between age groups are analyzed with the Student's *t* test. Correlation of oligomers with age is found in the parietal and frontal cortices; correlations of NKT and age in the frontal cortex (C).

the transport of glutamic acid decarboxylases to the presynaptic terminals and their anchoring to the synaptic vesicles [53]. DPYSL2 has relevant functions in axon guidance and neurite outgrowth, as well as in synaptic vesicle and N-methyl-D-aspartate glutamate receptor trafficking [54]. YWHAG is a member of the 14-3-3 group of proteins which display a plethora of functions, among them the ability to activate tryptophan and tyrosine hydroxylases, the rate-limiting enzymes in the synthesis of serotonin and catecholamines, respectively [55]. These modifications together with those linked to the high energy demands make synapses especially vulnerable to oxidative stress damage.

Three proteins related to heme metabolism and O_2 and CO_2 regulation, BLVRB, CA and HB1A, are also oxidatively damaged. CA participates in the conversion of CO_2 into bicarbonate and participates in the transport of CO_2 out of the tissues. BLVDR regulates the final step in heme metabolism, but it also regulates glucose metabolism and has neuroprotective effects [56]. HBA1 is a component of hemoglobin whose role in the nervous system is still poorly understood. Hemoglobin has been found in neurons where it probably plays a role in O_2 transport or as a regulator of cytosolic neuronal O_2 [57]. Interestingly, hemoglobin levels are reduced in neurons in AD [58]. Oxidative damage of, at least, those three proteins tags cell O_2 and CO_2 regulation as a target of putative cellular respiratory dysfunction in the elderly.

Finally, molecular interactions of lipoxidized proteins in the human cerebral cortex were explored to identify systems that may be indirectly impaired as a result of primary protein lipoxidation

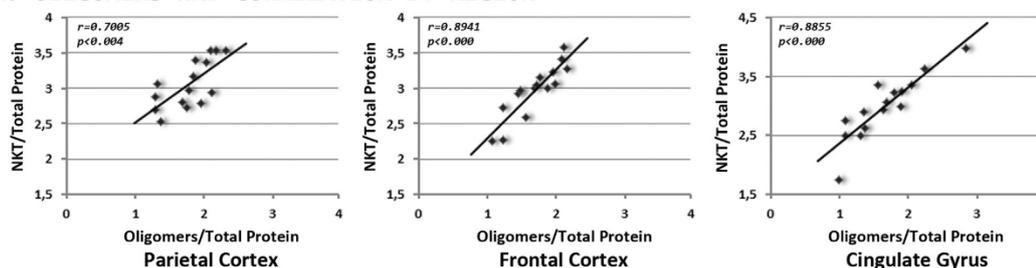
and presumable loss of function. Ubiquitin C has been identified as the central node of the network of interactions. Ubiquitin conjugation to proteins plays a cardinal role in the ubiquitin-proteasome system and protein turnover which has been identified as being affected in neurodegenerative diseases associated with aging [59]. Since ubiquitin conjugation to target proteins occurs through the ϵ -amino group of lysine, NKT adduction of this group can restrain protein-ubiquitin interactions and then hamper the degradation of altered proteins. In addition, 50% of the ubiquitin binding sites are not involved in protein degradation by the ubiquitin-proteasome system [60], suggesting that ubiquitin serves other molecular pathways. If true, several pathways can be deregulated as a result of altered ubiquitin conjugation with oxidized proteins.

4.4. NKT adduction and soluble oligomers

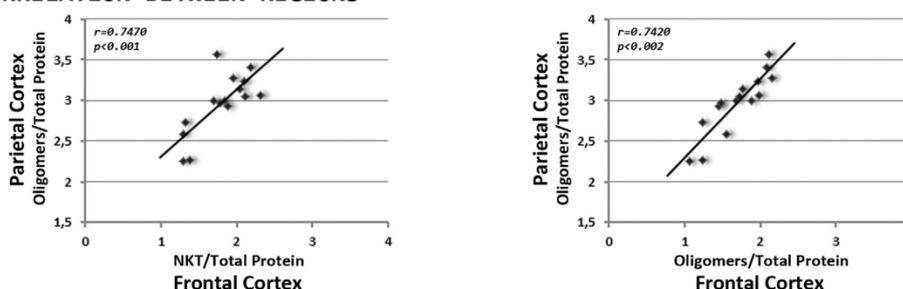
Aberrant protein structures are able to generate soluble oligomers; such molecular species are increasingly recognized for their high cytotoxic potential [23,61]. Soluble oligomers have been detected by using the structure-specific amino acid sequence independent antibody A11 [24]. Therefore, although initially generated to recognize β -amyloid soluble oligomers, undefined oligomeric species can be detected as well.

NKT adduction of proteins generates aberrant structures like crosslinking and aggregation [20]. For this reason, global levels of protein NKT adduction and the presence of oligomers have been

A. OLIGOMERS-NKT CORRELATION BY REGION



B. CORRELATION BETWEEN REGIONS



C. PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS

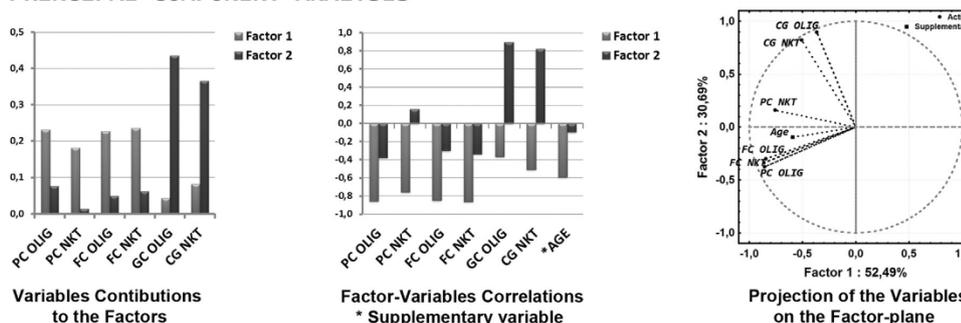


Fig. 7. Significant positive correlations are found between soluble oligomers and neuroketal (NKT) levels in all regions (A). Relationships are summarized using principal component analysis (B).

analyzed in every sample. A positive significant relation is found between protein NKT and soluble oligomer levels in the three cortical regions assessed, suggesting that modifications of proteins resulting from NKT adduction parallel soluble oligomer formation. Levels of oligomers increase with age in the PC and FC, and NKT levels significantly increase with age just in FC, whereas at CG total NKT and oligomer levels showed no differences between age groups.

The present findings also complement previous observations showing increased levels of soluble oligomers in the entorhinal and frontal cortices when comparing middle-aged individuals lacking AD related pathology with older cases with AD-related pathology stages I-II. Thus, increased levels of soluble oligomers are indeed a characteristic feature of the aging human brain coincidental with first stages of AD-related pathology [62]. Importantly, increased levels of oligomeric species parallel expression levels of brain cytokines and mediators of the immune response in old age [62]. Whether these coincidences have a cause-effect relationship needs further study using appropriate *in vitro* and *in vivo* models.

4.5. Implications on regional brain functions

The present observations may have implications in brain function. FC area 8, a part of the dorsolateral prefrontal cortex, participates in executive functions in connection with other brain regions including PC [63,64]. PC area 7 is also linked to several high-level processing tasks [65]. Interestingly, the molecular relationship found between PC and FC complements findings from tractography showing an anterior-posterior gradient in age-related white matter degradation of specific long-range white matter tracts connecting FC and PC [65]. In the same study, reduced frontal tract integrity correlated with reduced executive and working memory functions. This accounts, at least in part, for cognitive performance decline in older adults. Interconnection of FC and PC is also important in the elderly as in healthy old-aged subjects PC is compensatorily recruited to perform frontal cortex cognitive tasks [66]. Analysis of the principal components in the present study reveals similar patterns of protein oxidation and oligomer burden in PC and FC, and relative independence of the CG during aging.

CG area 23 has a central role in supporting internally-directed cognition. It is a key component of the default mode network which is involved in self-referential functions and is highly correlated with activity at rest [67]. The posterior CG exhibits a transitional pattern of connectivity coordinating distinct networks for efficient cognitive function [68]. In line, posterior CG presents a striking high rate of metabolism: cerebral blood flow and metabolic rate are around 40% greater than average within the region in human brain [69]. Reduced metabolism in this region is accompanied by reduced CG functional connectivity [70].

5. Conclusions

Together, the present findings provide information about increased protein damage by lipoxidation with aging, which may compromise vital cell functions such as energy metabolism, cytoskeleton, proteostasis, neurotransmission, O_2/CO_2 , and heme homeostasis. Post-translationally modified proteins resulting from oxidative damage, in addition to certain oligomeric species, truncated proteins, lipids, and metabolites, can be considered as putative collaborative factors contributing to neuronal senescence. Protein vulnerability to oxidation is related to the particular sub-cellular localization of certain proteins, the secondary structure of the protein, and the external exposure of certain amino acids which are more vulnerable to lipoxidation. Increased oxidative damage of key proteins in the FC, PC and CG may impact on normal brain function particularly in cognition, integrative connectivity and coordination of activation-rest responses in brain. Importantly, since lipoxidative damage to proteins is already identified in normal middle-aged individuals and it increases physiologically in the elderly, it seems reasonable to act upon the appropriate ROS-producer targets at the befitting middle-age window.

Conflict of interest

No relevant data.

Acknowledgments

This study was funded by the Seventh Framework Programme of the European Commission, grant agreement 278486: DEVEL-AGE, and by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III – Fondos FEDER, a way to build Europe FIS grants PI14/00757 and PI14/00328. We wish to thank T. Yohannan for editorial help.

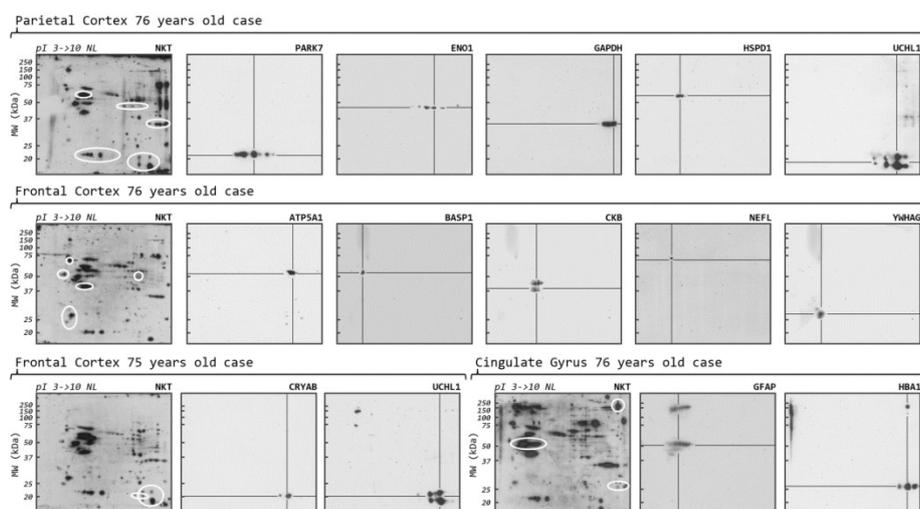
Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.034>.

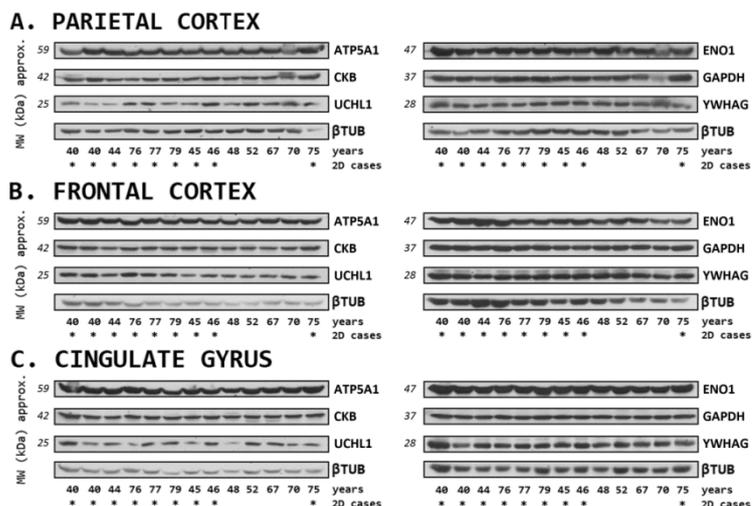
References

- [1] E.L. Muller, M.S. Lustgarten, Y. Jang, A. Richardson, H. Van Remmen, Trends in oxidative aging theories, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 477–503.
- [2] T.B.L. Kirkwood, Understanding the odd science of aging, *Cell* 120 (2005) 437–447.
- [3] T.C. Goldsmith, *An Introduction to Biological Aging Theory*, Azinet Press, Crownsville, 2011.
- [4] M.J. West, Age-related neuronal loss in the cerebral cortex, in: A. Peters, J. H. Morrison (Eds.), *Cerebral Cortex vol 14 Neurodegenerative and Age-Related Changes in Structure and Function of Cerebral Cortex*, Kluwer Academic/Plenum Press, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 1999, pp. 81–88.
- [5] D.L. Rosene, T.J. Nicholson, Neurotransmitter receptor changes in the hippocampus and cerebral cortex in normal aging, in: A. Peters, J.H. Morrison (Eds.), *Cerebral Cortex vol 14 Neurodegenerative and Age-Related Changes in Structure and Function of Cerebral Cortex*, Kluwer Academic/Plenum Press, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 1999, pp. 111–128.
- [6] P.R. Hof, J.H. Morrison, The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits, *Trends Neurosci.* 27 (2004) 607–613.
- [7] M.M. Esiri, Ageing and the brain, *J. Pathol.* 211 (2007) 181–187.
- [8] M.P. Mattson, T. Magnus, Ageing and neuronal vulnerability, *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (2006) 278–294.
- [9] D. Harman, Ageing: overview, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928 (2001) 1–21.
- [10] S.K. Kim, Common aging pathways in worms, flies, mice and humans, *J. Exp. Biol.* 210 (2007) 1607–1612.
- [11] T.M. Hagen, Oxidative stress, redox imbalance, and the aging process, *Antioxid. Redox Signal.* 5 (2003) 503–506.
- [12] M. Jové, M. Portero-Otín, A. Naudí, I. Ferrer, R. Pamplona, Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases, *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.* 73 (2014) 640–657.
- [13] A. Naudí, R. Cabré, M. Jové, V. Ayala, H. Gonzalo, M. Portero-Otín, et al., Lipidomics of human brain aging and Alzheimer's disease pathology, *Int. Rev. Neurobiol.* 122 (2015) 133–189.
- [14] R. Pamplona, E. Dalfo, V. Ayala, M.J. Bellmunt, J. Prat, I. Ferrer, et al., Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycoxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21522–21530.
- [15] A. Martínez, M. Portero-Otín, R. Pamplona, I. Ferrer, Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates, *Brain Pathol.* 20 (2010) 281–297.
- [16] A. Nunomura, P.I. Moreira, R.J. Castellani, H.G. Lee, X. Zhu, M.A. Smith, et al., Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders, *Neurotox. Res.* 22 (2012) 231–248.
- [17] R.X. Santos, S.C. Correia, X. Zhu, M.A. Smith, P.I. Moreira, R.J. Castellani, et al., Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer's disease, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 2444–2457.
- [18] R. Pamplona, G. Barja, Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757 (2006) 496–508.
- [19] J.S. O'Brien, E.L. Sampson, Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin, *J. Lipid Res.* 6 (1965) 537–544.
- [20] N. Bernoud-Hubac, S.S. Davies, O. Boutaud, T.J. Montine, L.J. Roberts, Formation of highly reactive γ -ketoaldehydes (neuroketal) as products of the neuroprostane pathway, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 30964–30970.
- [21] N. Bernoud-Hubac, L.J. Roberts, Identification of oxidized derivatives of neuroketals, *Biochemistry* 41 (2002) 11466–11471.
- [22] D.A. Butterfield, J. Kanski, Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins, *Mech. Ageing Dev.* 122 (2001) 945–962.
- [23] M.J. Guerrero-Muñoz, D.L. Castillo-Carranza, R. Kaye, Therapeutic approaches against common structural features of toxic oligomers shared by multiple amyloidogenic proteins, *Biochem. Pharmacol.* 88 (2014) 468–478.
- [24] C.G. Glabe, Conformation-dependent antibodies target diseases of protein misfolding, *Trends Biochem. Sci.* 29 (2004) 542–547.
- [25] R. Kaye, E. Head, J.L. Thompson, T.M. McIntire, S.C. Milton, C.W. Cotman, et al., Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis, *Science* 300 (2003) 486–489.
- [26] I. Dalle-Donne, A. Scaloni, D.A. Butterfield, *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases*, Wiley Interscience, New Jersey, 2006.
- [27] M. Perluigi, A.M. Swomley, D.A. Butterfield, Redox proteomics and the dynamic molecular landscape of the aging brain, *Ageing Res. Rev.* 13 (2014) 75–89.
- [28] I. Ferrer, A. Martínez, S. Boluda, P. Pardi, M. Barrachina, Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies, *Cell Tissue Bank* 9 (2008) 181–194.
- [29] E.V. Ilieva, V. Ayala, M. Jové, E. Dalfo, D. Cacabelos, M. Povedano, M.J. Bellmunt, I. Ferrer, R. Pamplona, M. Portero-Otín, M. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Brain* 130 (2007) 3111–3123.
- [30] A. Kichev, E.V. Ilieva, G. Piñol-Ripoll, P. Podlesniy, I. Ferrer, M. Portero-Otín, R. Pamplona, C. Espinet, C. Cell death and learning impairment in mice caused by in vitro modified pro-NGF can be related to its increased oxidative modifications in Alzheimer disease, *Am. J. Pathol.* 175 (2009) 2574–2585.
- [31] H. Gonzalo, L. Brieva, F. Tatzber, M. Jové, D. Cacabelos, A. Cassanyé, et al., Lipidome analysis in multiple sclerosis reveals protein lipoxidative damage as a potential pathogenic mechanism, *J. Neurochem.* 123 (2012) 622–634.
- [32] A. Franceschini, D. Szklarczyk, S. Frankild, M. Kuhn, M. Simonovic, A. Roth, et al., STRING v9.1: protein–protein interaction networks, with increased coverage and integration, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) D808–D815.
- [33] G. Bindea, B. Mlecnik, H. Hackl, P. Charoentong, M. Tosolini, A. Kirilovsky, et al., ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks, *Bioinformatics* 25 (2009) 1091–1093.
- [34] G. Bindea, J. Galon, B. Mlecnik, CluePedia cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data, *Bioinformatics* 29 (2013)

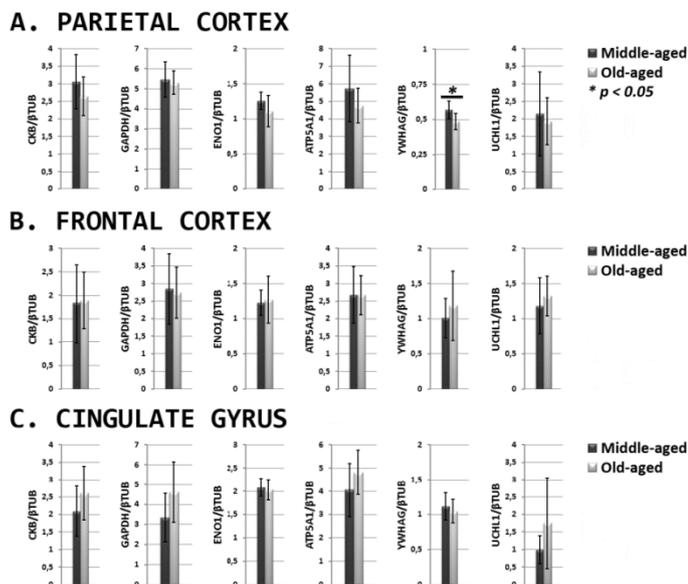
- 661–663.
- [35] I. Ferrer, Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia, *Prog. Neurobiol.* 97 (2012) 38–51.
- [36] J. Petrak, R. Ivanek, O. Toman, R. Cmejla, J. Cmejlova, D. Vyoral, et al., Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins, *Proteomics* 8 (2008) 1744–1749.
- [37] M. Eisenstein, Location, location, location, *Nat. Methods* 6 (2009) 630–631.
- [38] W.J. Lukiw, N.G. Bazan, Docosahexaenoic acid and the aging brain, *J. Nutr.* 138 (2008) 2510–2514.
- [39] A.A. Starkov, Measurement of mitochondrial ROS production, *Methods Mol. Biol.* 648 (2010) 245–255.
- [40] P.J. Magistretti, Cellular bases of functional brain imaging: insights from neuron-glia metabolic coupling, *Brain Res.* 886 (2000) 108–112.
- [41] T. Wallimann, M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay, H.M. Eppenberger, Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis, *Biochem. J.* 281 (Pt 1) (1992) 21–40.
- [42] T. Wataya, A. Nunomura, M.A. Smith, S.L. Siedlak, P.L.R. Harris, S. Shimohama, et al., High molecular weight neurofilament proteins are physiological substrates of adduction by the lipid peroxidation product hydroxynonenal, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4644–4648.
- [43] E.A. Perry, R.J. Castellani, P.I. Moreira, A. Nunomura, Q. Lui, P.L.R. Harris, et al., Neurofilaments are the major neuronal target of hydroxynonenal-mediated protein cross-links, *Free Radic. Res.* 47 (2013) 507–510.
- [44] S.A. Broadley, F.U. Hartl, The role of molecular chaperones in human misfolding diseases, *Febs Lett.* 583 (2009) 2647–2653.
- [45] S. Simon, P. Arrigó, *Small Stress Proteins and Human Diseases*, Nova Biomedical Inc, New York, 2010.
- [46] S. Shendelman, A. Jonason, C. Martinat, T. Leete, A. Abeliovich, DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation, *PLoS Biol.* 2 (2004) e362.
- [47] C. Chang, G. Wu, P. Gao, L. Yang, W. Liu, J. Zuo, Upregulated Parkin expression protects mitochondrial homeostasis in DJ-1 knockdown cells and cells overexpressing the DJ-1 L166P mutation, *Mol. Cell. Biochem.* 387 (2014) 187–195.
- [48] C.M. Clements, R.S. McNally, B.J. Conti, T.W. Mak, J.P.Y. Ting, DJ-1, a cancer and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 15091–15096.
- [49] K. Ojika, Y. Tsugu, S. Mitake, Y. Otsuka, E. Katada, NMDA receptor activation enhances the release of a cholinergic differentiation peptide (HCNP) from hippocampal neurons in vitro, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 106 (1998) 173–180.
- [50] P. Farisello, D. Boido, T. Nieuws, L. Medrihan, F. Cesca, F. Valtorta, et al., Synaptic and extrasynaptic origin of the excitation/inhibition imbalance in the hippocampus of synapsin I/II/III knockout mice, *Cereb. Cortex* 23 (2013) 581–593.
- [51] C. Rink, S. Gnyawali, L. Peterson, S. Khanna, Oxygen-inducible glutamate oxaloacetate transaminase as protective switch transforming neurotoxic glutamate to metabolic fuel during acute ischemic stroke, *Antioxid. Redox Signal.* 14 (2011) 1777–1785.
- [52] M.I. Mosevitsky, Nerve ending “signal” proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1, *Int. Rev. Cytol.* 245 (2005) 245–325.
- [53] S. Maekawa, Y. Kobayashi, S.I. Odagaki, M. Makino, H. Kumanogoh, S. Nakamura, et al., Interaction of NAP-22 with brain glutamic acid decarboxylase (GAD), *Neurosci. Lett.* 537 (2013) 50–54.
- [54] D. Martins-de-Souza, J.S. Cassoli, J.M. Nascimento, K. Hensley, P.C. Guest, A. M. Pinzon-Velasco, et al., The protein interactome of collapsin response mediator protein-2 (CRMP2/DPYSL2) reveals novel partner proteins in brain tissue, *Proteomics. Clin. Appl.* 9 (2015) 817–831.
- [55] P. Steinacker, A. Aitken, M. Otto, 14-3-3 proteins in neurodegeneration, *Semin. Cell Dev. Biol.* 22 (2011) 696–704.
- [56] D.E. Baranano, M. Rao, C.D. Ferris, S.H. Snyder, Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 16093–16098.
- [57] M. Biagioli, M. Pinto, D. Cesselli, M. Zaninello, D. Lazarevic, P. Roncaglia, et al., Unexpected expression of alpha- and beta-globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 15454–15459.
- [58] I. Ferrer, A. Gómez, M. Carmona, G. Huesa, S. Porta, M. Riera-Codina, et al., Neuronal hemoglobin is reduced in Alzheimer's disease, argyrophilic grain disease, Parkinson's disease, and dementia with Lewy bodies, *J. Alzheimers Dis.* 23 (2011) 537–550.
- [59] T. Hoppe, Life and destruction: ubiquitin-mediated proteolysis in aging and longevity, *F1000 Biol. Rep.* 2 (2010) 79.
- [60] S.A. Wagner, P. Beli, B.T. Weinert, M.L. Nielsen, J. Cox, M. Mann, et al., A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles, *Mol. Cell. Proteom.* 10 (2011), M111.013284.
- [61] C.G. Glabe, Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease, *Neurobiol. Aging* 27 (2006) 570–575.
- [62] I. López-González, A. Schlüter, E. Aso, P. Garcia-Esparcia, B. Ansoleaga, F. Llorens, et al., Neuroinflammatory signals in Alzheimer disease and APP/PS1 transgenic mice: correlations with plaques, tangles, and oligomeric species, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74 (2015) 319–344.
- [63] A.K. Barbey, R. Colom, J. Grafman, Dorsolateral prefrontal contributions to human intelligence, *Neuropsychologia* 51 (2013) 1361–1369.
- [64] A.E. Cavanna, M.R. Trimble, The precuneus: a review of its functional anatomy and behavioural correlates, *Brain* 129 (2006) 564–583.
- [65] S.W. Davis, N.A. Dennis, N.G. Buchler, L.E. White, D.J. Madden, R. Cabeza, Assessing the effects of age on long white matter tracts using diffusion tensor tractography, *Neuroimage* 46 (2009) 530–541.
- [66] C.M. Huang, T.A. Polk, J.O. Goh, D.C. Park, Both left and right posterior parietal activations contribute to compensatory processes in normal aging, *Neuropsychologia* 50 (2012) 55–66.
- [67] R. Leech, D.J. Sharp, The role of the posterior cingulate cortex in cognition and disease, *Brain* 137 (2014) 12–32.
- [68] R. Leech, S. Kamourieh, C.F. Beckmann, D.J. Sharp, Fractionating the default mode network: distinct contributions of the ventral and dorsal posterior cingulate cortex to cognitive control, *J. Neurosci.* 31 (2011) 3217–3224.
- [69] M.E. Raichle, A.M. MacLeod, A.Z. Snyder, W.J. Powers, D.A. Gusnard, C. L. Shulman, A default mode of brain function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 676–682.
- [70] T. Hedden, K.R.A. Van Dijk, J.A. Becker, A. Mehta, R.A. Sperling, K.A. Johnson, et al., Disruption of functional connectivity in clinically normal older adults harboring amyloid burden, *J. Neurosci.* 29 (2009) 12686–12694.



Supplementary Figure 1. Validation of the protein identified by MS/MS of NKT-adducted protein spots. Membranes transferred following bi-dimensional gel electrophoresis and blotted with anti-NKT antibodies were stripped and blotted with specific antibodies. Resulting specific spots match with the spots identified with anti-NKT.



Supplementary Figure 2. Validation of the protein identified by MS/MS of NKT-adducted protein spots. Membranes transferred following bi-dimensional gel electrophoresis and blotted with anti-NKT antibodies were stripped and blotted with specific antibodies. Resulting specific spots match with the spots identified with anti-NKT.



Supplementary Figure 3. Validation of the protein identified by MS/MS of NKT-adducted protein spots. Membranes transferred following bi-dimensional gel electrophoresis and blotted with anti-NKT antibodies were stripped and blotted with specific antibodies. Resulting specific spots match with the spots identified with anti-NKT.

Supplementary Table 1

Antigen	Host specie	Reference	Supplier	Dilution
14-3-3	Rabbit	18649	IBL	1:1,000
ALDOA	Goat	NB 600-915	Novus Biologicals	1:2,000
ATP5A1	Mouse	612516	Biosciences	1:2,000
ACTB	Mouse	A5316	Sigma-Aldrich	1:30,000
BASP1	Rabbit	ab25732	Abcam	1:1,000
CKB	Rabbit	HPA001254	Sigma	1:2,000
DJ-1	Mouse	ab11251	Abcam	1:3,000
ENO1	Mouse	H00002023-M01	Abnova	1:2,000
GAPDH	Rabbit	21612	Signalway	1:5,000
GFAP	Rabbit	Z0334	Dako	1:10,000
HBA1	Rabbit	SC-21005	Santa Cruz	1:1,000
HSP60	Mouse	H4149	Sigma-Aldrich	1:3,000
HSPB5	Mouse	ab13496	Abcam	1:2,000
NEFL	Mouse	814326	Boehringer	1:5,000
NKT	Goat	ab5611	Merck Millipore	1:1,500
Oligomers (A11)	Rabbit	AHB0052	Invitrogen	1:1,000
SOD2	Rabbit	SOD-110	Stressgen	1:2,000
UCHL1	Goat	ab5937	Merck Millipore	1:1,000
TUBB	Rabbit-HRP	ab21058	Abcam	1:20,000
UB	Rabbit	Z0458	Dako	1:1,000
goat IG	Rabbit-HRP	P0449	Dako	1:1,000
mouse IG	Goat-HRP	P0447	Dako	1:1,000
rabbit IG	Swine-HRP	P0217	Dako	1:1,000

14-3-3: 14-3-3 proteins (β , γ , ϵ , ζ , η , τ); ALDOA: Aldolase A; ATP5A1: ATP synthase subunit α ; ACTB: β -actin; BASP1: Brain acid soluble protein 1; CKB: Creatine kinase B-type; DJ-1: Protein DJ-1; ENO1: α -enolase; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; HBA1: hemoglobin subunit α ; HSP60: Heat shock 60 kDa protein, mitochondrial; HSPB5: α -crystallin β -chain; NEFL: Neurofilament light polypeptide; NKT: Neuroketals; SOD2: Superoxide dismutase [Mn] mitochondrial; UCHL1: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1; TUBB: β -tubulin; UB: ubiquitin; HRP: horseradish peroxidase; IG: Immunoglobulins.

Supplementary table 2: Statistical comparisons of selected oxidized protein levels between age groups

Proteins	Middle-aged Group			Old-aged Group			Statistical Test	
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Value	p
PARIETAL CORTEX								
CKB/ β TUB	3.0610	0.7668	8	2.6456	0.5563	7	t: 1.1841	0.2576
GAPDH/ β TUB	5.4622	1.8804	8	5.3099	0.5788	7	t: 0.2051	0.8406
ENO1/ β TUB	1.2567	0.1249	9	1.1109	0.2250	8	t: 1.6789	0.1139
ATP5A1/ β TUB	5.7432	2.0951	9	4.6534	0.7905	7	Z: 1.7465	0.0807
YWHAG/ β TUB	0.5679	0.0631	9	0.4859	0.0578	7	t: 2.6701	0.0183
UCHL1/ β TUB	2.1450	1.1888	9	1.9357	0.6756	7	t: 0.4147	0.6846
FRONTAL CORTEX								
CKB/ β TUB	1.8461	0.8027	9	1.8904	0.6050	9	t: -0.1322	0.8965
GAPDH/ β TUB	2.8447	1.0029	9	2.7436	0.7211	9	t: 0.2456	0.8091
ENO1/ β TUB	1.2294	0.1782	9	1.2707	0.3917	9	Z: 0.3973	0.6911
ATP5A1/ β TUB	2.6711	0.8457	9	2.6699	0.5524	9	t: 0.0033	0.9974
YWHAG/ β TUB	1.0085	0.2769	9	1.1848	0.4936	9	t: -0.9345	0.3640
UCHL1/ β TUB	1.1826	0.3968	9	1.3231	0.2838	9	t: -0.8639	0.4004
CINGULATE GYRUS								
CKB/ β TUB	2.0944	0.7105	9	2.6149	0.7679	9	t: -1.4926	0.1550
GAPDH/ β TUB	3.3388	1.2114	9	4.6327	1.5278	9	t: -1.9908	0.0639
ENO1/ β TUB	2.0849	0.1956	9	2.0321	0.2196	9	t: 0.5391	0.5972
ATP5A1/ β TUB	4.0559	1.1502	8	4.8232	0.9599	9	t: -1.4996	0.1545
YWHAG/ β TUB	1.1192	0.1950	9	1.0455	0.1680	9	t: 0.8597	0.4027
UCHL1/ β TUB	0.9922	0.3971	9	1.7535	1.3052	9	Z: -1.2803	0.2004

SD: standard deviation; N: number of cases; Statistical test, value t: Student's t-test, value Z: Mann-Whitney U test

Anexo 2. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de NKT en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.921	0.173	9	1.091	0.162	9	t:-2.164	0.046
CP	0.988	0.118	9	1.010	0.102	9	t:-0.429	0.674
GC	0.938	0.099	9	1.062	0.201	9	t:-1.661	0.116
CT	1.096	0.156	9	0.893	0.261	8	t:1.973	0.067
CE	1.089	0.169	7	0.921	0.204	8	t:1.722	0.109
H	0.906	0.514	9	0.945	0.481	9	t:-0.166	0.870
TI	1.223	0.194	9	0.775	0.225	9	t:4.522	0.0003
Cd	0.757	0.968	9	1.243	0.451	9	t:-1.365	0.191
Pt	1.158	0.325	9	0.840	0.319	9	t:2.092	0.053
CV	0.751	0.305	9	1.251	0.527	9	t:-2.465	0.025
SN	0.845	0.168	8	1.206	0.308	6	t:-2.827	0.015
Vr	1.131	0.595	9	0.869	0.434	9	t:1.068	0.301

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 3. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de MDA en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.835	0.082	9	1.165	0.165	9	t:-5.385	0.0001
CP	0.900	0.176	9	1.099	0.167	9	t:-2.463	0.026
GC	0.992	0.243	9	1.008	0.164	9	t:-0.160	0.875
CT	1.157	0.348	9	0.822	0.220	8	t:2.334	0.034
CE	1.381	0.345	7	0.667	0.091	8	Z:3.125	0.002
H	0.925	0.138	9	1.075	0.135	9	t:-2.327	0.033
TI	0.761	0.315	9	1.239	0.392	9	t:-2.851	0.012
Cd	0.886	0.096	9	1.114	0.427	9	t:-1.557	0.139
Pt	0.890	0.218	9	1.109	0.145	9	t:-2.505	0.023
CV	0.982	0.534	9	1.018	0.508	9	t:-0.148	0.885
SN	1.080	0.486	8	0.894	0.103	6	Z:0.387	0.699
Vr	0.920	0.291	9	1.080	0.434	9	t:-0.919	0.372

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 4. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de COX-2 en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.618	0.271	9	1.398	0.592	9	t:-3.594	0.002
CP	0.656	0.175	9	1.343	0.204	9	t:-7.678	0.000001
GC	1.062	0.301	9	0.932	0.348	9	t:0.847	0.410
CT	0.657	0.182	9	1.360	0.373	8	t:-5.036	0.0001
CE	0.927	0.397	7	0.819	0.193	8	t:0.689	0.503
H	0.749	0.426	9	1.240	0.529	9	t:-2.170	0.045
TI	0.980	0.234	9	1.015	0.448	9	t:-0.208	0.838
Cd	0.959	0.104	9	1.035	0.132	9	t:-1.353	0.195
Pt	1.024	0.417	9	0.969	0.435	9	t:0.272	0.789
CV	1.060	0.221	9	0.937	0.308	9	t:0.975	0.344
SN	0.917	0.126	8	1.116	0.113	6	t:-3.050	0.010
Vr	1.088	0.074	9	0.906	0.392	9	Z:1.369	0.171

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 5. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de CYP2J2 en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	1.188	0.300	9	0.808	0.166	9	t:3.323	0.004
CP	1.027	0.231	9	0.978	0.204	9	t:0.479	0.639
GC	1.062	0.412	9	0.915	0.366	9	t:0.799	0.436
CT	1.226	0.446	9	0.750	0.232	8	t:2.700	0.016
CE	1.034	0.262	7	0.969	0.478	8	t:0.318	0.755
H	1.153	0.241	9	0.856	0.235	9	t:2.653	0.017
TI	1.336	0.687	9	0.662	0.155	9	Z:2.605	0.009
Cd	0.700	0.387	9	1.310	0.437	9	t:-3.136	0.006
Pt	0.988	0.128	9	0.992	0.156	9	t:-0.064	0.950
CV	1.055	0.248	9	0.960	0.168	9	t:0.951	0.356
SN	1.072	0.269	8	0.902	0.166	6	t:0.904	0.366
Vr	0.999	0.418	9	1.007	0.259	9	t:-0.051	0.960

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 6. Estadísticos del análisis de regresión múltiple para los niveles de COX-2 en función del de los productos de peroxidación lipídica y la edad.

COX-2 / NKT + Edad				
	R²	F (p-valor)	β_{NKT} (p-valor)	β_{Edad} (p-valor)
Corteza frontal	0.71	F _(2,15) = 22.21 (0.00003)	- 0.15 (0.29)	0.91 (0.00001)
Corteza parietal	0.86	F _(2,15) = 51.24 (0.00000)	- 0.11 (0.25)	0.94 (0.00000)
Giro cingulado	0.18	F _(2,15) = 2.93 (0.08)	0.54 (0.04)	- 0.44 (0.08)
Corteza temporal	0.81	F _(2,14) = 34.84 (0.00000)	- 0.17 (0.23)	0.80 (0.00004)
Corteza entorrinal	0.00	F _(2,12) = 0.56 (0.59)	0.20 (0.53)	- 0.13 (0.68)
Hipocampo	0.30	F _(2,15) = 4.58 (0.02)	- 0.44 (0.06)	0.62 (0.01)
Tálamo	0.00	F _(2,15) = 0.28 (0.75)	- 0.10 (0.77)	0.10 (0.77)
Caudado	0.09	F _(2,15) = 1.86 (0.19)	0.27 (0.26)	0.28 (0.25)
Putamen	0.00	F _(2,15) = 0.89 (0.43)	0.37 (0.20)	0.19 (0.49)
Corteza visual	0.10	F _(2,15) = 1.98 (0.17)	- 0.08 (0.78)	- 0.41 (0.17)
Sustancia nigra	0.43	F _(2,11) = 5.84 (0.01)	- 0.13 (0.62)	0.79 (0.01)
Vermis	0.00	F _(2,15) = 0.70 (0.51)	0.28 (0.29)	- 0.04 (0.89)
COX-2 / MDA + Edad				
	R²	F (p-valor)	B_{MDA} (p-valor)	β_{Edad} (p-valor)
Corteza frontal	0.72	F _(2,15) = 22.74 (0.00003)	- 0.26 (0.24)	1.06 (0.0002)
Corteza parietal	0.84	F _(2,15) = 46.24 (0.00000)	0.01 (0.92)	0.92 (0.00000)
Giro cingulado	0.01	F _(2,15) = 0.36 (0.70)	0.01 (0.97)	- 0.21 (0.42)
Corteza temporal	0.83	F _(2,14) = 39.57 (0.00000)	0.24 (0.08)	1.05 (0.00000)
Corteza entorrinal	0.00	F _(2,12) = 0.64 (0.54)	- 0.58 (0.47)	- 0.77 (0.33)
Hipocampo	0.40	F _(2,15) = 6.67 (0.008)	0.55 (0.01)	0.24 (0.25)
Tálamo	0.00	F _(2,15) = 0.49 (0.62)	- 0.26 (0.49)	0.36 (0.33)
Caudado	0.25	F _(2,15) = 3.43 (0.06)	- 0.46 (0.06)	0.40 (0.07)
Putamen	0.00	F _(2,15) = 0.65 (0.53)	- 0.33 (0.27)	0.18 (0.55)
Corteza visual	0.12	F _(2,15) = 2.13 (0.15)	0.13 (0.58)	- 0.44 (0.07)
Sustancia nigra	0.41	F _(2,11) = 5.58 (0.02)	0.00 (0.99)	0.71 (0.01)
Vermis	0.03	F _(2,15) = 1.24 (0.31)	0.38 (0.15)	- 0.21 (0.41)

Anexo 7. Estadísticos del análisis de regresión múltiple para los niveles de CYP2J2 en función del de los productos de peroxidación lipídica y la edad.

CYP2J2 / NKT + Edad				
	R²	F (p-valor)	β_{NKT} (p-valor)	β_{Edad} (p-valor)
Corteza frontal	0.34	F _(2,15) = 5.34 (0.01)	- 0.25 (0.27)	- 0.51 (0.03)
Corteza parietal	0.02	F _(2,15) = 0.16 (0.85)	- 0.09 (0.71)	- 0.10 (0.69)
Giro cingulado	0.00	F _(2,15) = 0.22 (0.80)	0.00 (0.99)	- 0.17 (0.56)
Corteza temporal	0.25	F _(2,14) = 3.66 (0.05)	- 0.19 (0.47)	- 0.68 (0.02)
Corteza entorrinal	0.00	F _(2,12) = 0.52 (0.61)	0.12 (0.69)	- 0.19 (0.55)
Hipocampo	0.35	F _(2,15) = 5.72 (0.01)	- 0.01 (0.96)	- 0.65 (0.007)
Tálamo	0.37	F _(2,15) = 6.09 (0.01)	- 0.14 (0.59)	- 0.76 (0.01)
Caudado	0.70	F _(2,15) = 20.68 (0.00005)	- 0.15(0.28)	0.88 (0.00001)
Putamen	0.00	F _(2,15) = 0.99 (0.39)	- 0.39 (0.26)	0.03 (0.92)
Corteza visual	0.08	F _(2,15) = 1.75 (0.21)	0.01 (0.96)	- 0.44 (0.14)
Sustancia nigra	0.15	F _(2,11) = 2.13 (0.16)	- 0.06 (0.85)	- 0.49 (0.16)
Vermis	0.03	F _(2,15) = 1.27 (0.31)	0.24 (0.34)	- 0.24 (0.34)
CYP2J2 / MDA + Edad				
	R²	F (p-valor)	B_{MDA} (p-valor)	β_{Edad} (p-valor)
Corteza frontal	0.34	F _(2,15) = 5.46 (0.02)	- 0.39 (0.24)	- 0.29 (0.39)
Corteza parietal	0.01	F _(2,15) = 0.09 (0.91)	- 0.01 (0.99)	- 0.11 (0.69)
Giro cingulado	0.00	F _(2,15) = 0.29 (0.75)	- 0.09 (0.72)	- 0.18 (0.48)
Corteza temporal	0.29	F _(2,14) = 4.37 (0.03)	0.33 (0.23)	- 0.35 (0.21)
Corteza entorrinal	0.01	F _(2,12) = 1.07 (0.37)	- 0.81 (0.29)	- 1.01 (0.19)
Hipocampo	0.36	F _(2,15) = 5.76 (0.01)	- 0.04 (0.84)	- 0.64 (0.008)
Tálamo	0.36	F _(2,15) = 5.83 (0.01)	0.02 (0.94)	- 0.68 (0.03)
Caudado	0.78	F _(2,15) = 31.57 (0.00000)	- 0.31 (0.01)	0.87 (0.00001)
Putamen	0.08	F _(2,15) = 1.71 (0.21)	0.45 (0.12)	- 0.03 (0.90)
Corteza visual	0.25	F _(2,15) = 3.83 (0.04)	0.39 (0.08)	- 0.38 (0.08)
Sustancia nigra	0.25	F _(2,11) = 3.12 (0.08)	0.32 (0.25)	- 0.39 (0.16)
Vermis	0.00	F _(2,15) = 0.83 (0.45)	0.10 (0.69)	- 0.33 (0.22)

Anexo 8. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de CEL en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.758	0.261	9	1.245	0.303	9	t:-3.656	0.002
CP	1.040	0.382	9	0.958	0.204	9	t:-0.044	0.965
GC	1.012	0.247	9	0.988	0.276	9	t:0.194	0.848
CT	0.750	0.252	9	1.279	0.527	8	t:-2.693	0.017
CE	1.067	0.405	7	0.944	0.306	8	t:-0.116	0.908
H	0.801	0.363	9	0.849	0.426	9	t:-0.259	0.799
TI	1.730	3.667	9	0.270	0.063	9	Z:1.722	0.085
Cd	0.632	0.316	9	1.036	0.281	9	t:-2.872	0.011
Pt	0.960	0.348	9	1.042	0.240	9	t:-0.578	0.571
CV	1.026	0.304	9	0.975	0.564	9	t:0.242	0.812
SN	0.906	0.357	8	1.126	0.613	6	t:-0.845	0.415
Vr	0.742	0.147	9	1.257	0.352	9	t:-4.048	0.001

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 9. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de CML en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.844	0.120	9	1.154	0.297	9	t:-2.897	0.011
CP	0.893	0.120	9	1.107	0.131	9	t:-3.622	0.002
GC	0.519	0.122	9	1.204	0.596	9	t:-3.378	0.004
CT	1.245	0.634	9	0.680	0.301	8	Z:1.732	0.083
CE	0.963	0.105	7	1.032	0.065	8	t:-1.532	0.149
H	0.801	0.363	9	0.849	0.426	9	t:-0.259	0.799
TI	1.077	0.338	9	0.925	0.543	9	t:1.722	0.085
Cd	0.837	0.305	9	0.719	0.592	9	t:1.280	0.200
Pt	0.966	0.192	9	1.011	0.401	9	t:0.132	0.895
CV	0.406	0.216	9	0.927	0.501	9	t:-2.428	0.015
SN	1.027	0.228	8	0.966	0.082	6	t:0.620	0.547
Vr	1.018	0.417	9	0.871	0.468	9	t:0.701	0.494

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 10. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de SOD1 en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.957	0.284	9	1.036	0.240	9	t:-0.635	0.534
CP	1.019	0.177	9	0.980	0.112	9	t:0.551	0.589
GC	0.950	0.151	9	1.060	0.296	9	t:-0.997	0.334
CT	1.021	0.651	9	0.793	0.636	8	t:0.729	0.477
CE	1.019	0.321	7	0.979	0.183	8	t:0.308	0.763
H	0.818	0.389	9	1.173	0.183	9	t:-2.480	0.025
TI	0.382	0.169	9	1.287	0.763	9	Z:-2.782	0.005
Cd	0.369	0.164	9	1.233	0.457	9	t:-5.337	0.0001
Pt	0.608	0.217	9	1.386	0.384	9	t:-5.285	0.0001
CV	0.512	0.205	9	0.929	0.566	9	t:-2.076	0.049
SN	0.802	0.280	8	1.265	0.398	6	t:-2.563	0.025
Vr	0.926	0.319	9	1.082	0.571	9	t:-0.714	0.486

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 11. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de SOD2 en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	1.046	0.341	9	0.952	0.386	9	t:0.548	0.591
CP	0.716	0.291	9	1.282	0.490	9	t:-2.979	0.009
GC	0.875	0.327	9	1.075	0.511	9	t:-0.987	0.338
CT	1.181	0.502	9	0.746	0.236	8	t:2.232	0.041
CE	0.794	0.269	7	1.172	0.284	8	t:-2.637	0.021
H	0.830	0.260	9	1.174	0.469	9	t:-1.923	0.072
TI	0.870	0.247	9	1.132	0.532	9	t:-1.338	0.200
Cd	1.006	0.167	9	0.991	0.412	9	t:0.100	0.922
Pt	0.734	0.162	9	1.254	0.359	9	t:-3.956	0.001
CV	0.701	0.176	9	1.302	0.367	9	t:-4.431	0.0004
SN	1.079	0.424	8	0.568	0.229	6	t:2.657	0.021
Vr	0.922	0.438	9	1.081	0.353	9	t:-0.845	0.411

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 12. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de catalasa en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.924	0.210	9	1.075	0.324	9	t:-1.177	0.256
CP	0.978	0.279	9	1.015	0.161	9	t:-0.341	0.737
GC	0.893	0.229	9	1.100	0.303	9	t:-1.636	0.121
CT	0.703	0.242	9	1.084	0.434	8	t:-2.272	0.038
CE	1.136	0.427	7	0.872	0.200	8	t:1.568	0.141
H	1.054	0.559	9	0.920	0.371	9	t:0.602	0.555
TI	1.256	0.402	9	0.747	0.189	9	t:3.443	0.003
Cd	1.248	0.467	9	0.753	0.236	9	t:2.836	0.012
Pt	0.994	0.440	9	0.997	0.468	9	t:-0.014	0.989
CV	0.736	0.202	9	1.254	0.300	9	t:-4.296	0.001
SN	1.138	0.450	8	0.707	0.077	6	Z:2.066	0.039
Vr	0.882	0.501	9	0.539	0.265	9	Z:1.457	0.145

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 13. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de GPX4 en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.798	0.239	9	1.201	0.345	9	t:-2.879	0.011
CP	0.954	0.278	9	1.045	0.114	9	t:-0.910	0.376
GC	0.942	0.195	9	1.057	0.232	9	t:-1.139	0.271
CT	0.855	0.405	9	1.149	0.421	8	t:-1.468	0.163
CE	1.136	0.427	7	0.872	0.200	8	t:1.568	0.141
H	0.462	0.146	9	1.080	0.739	9	Z:-2.163	0.031
TI	0.661	0.256	9	1.232	0.667	9	Z:-2.517	0.012
Cd	1.043	0.392	9	0.966	0.555	9	t:0.338	0.740
Pt	0.899	0.222	9	1.102	0.306	9	t:-1.610	0.127
CV	0.853	0.137	9	1.156	0.293	9	Z:-2.163	0.031
SN	0.863	0.288	8	1.177	0.288	6	t:-2.021	0.066
Vr	0.731	0.270	9	1.264	0.408	9	t:-3.268	0.005

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 14. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de TRX1 en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	1.505	0.650	9	0.488	0.075	9	t:4.667	0.0003
CP	1.235	0.388	9	0.752	0.224	9	t:3.236	0.005
GC	1.128	0.272	9	0.888	0.315	9	t:1.729	0.103
CT	1.216	0.526	9	0.423	0.322	8	t:3.684	0.002
CE	1.238	0.357	7	0.786	0.275	8	t:2.768	0.016
H	0.891	0.228	9	1.115	0.374	9	t:-1.534	0.145
TI	0.864	0.595	9	0.811	0.620	9	t:0.185	0.856
Cd	1.010	0.082	9	0.989	0.225	9	t:0.260	0.799
Pt	1.036	0.386	9	0.860	0.249	9	t:1.151	0.267
CV	1.062	0.158	9	0.939	0.273	9	Z:1.015	0.310
SN	0.657	0.310	8	1.452	0.836	6	t:-2.501	0.028
Vr	0.690	0.211	9	1.074	0.536	9	t:-2.005	0.062

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 15. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de Nrf2 en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico		
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p	
CF	100 kDa	1.166	0.791	9	0.839	0.401	9	t:1.107	0.285
	65 kDa	1.122	0.602	9	0.882	0.415	9	t:0.982	0.341
	30 kDa	1.233	0.447	9	0.767	0.353	9	t:2.458	0.026
CP	100 kDa	1.082	0.406	9	0.866	0.404	9	t:1.128	0.276
	65 kDa	0.848	0.276	9	1.164	0.428	9	t:-1.865	0.081
	30 kDa	1.081	0.090	9	0.925	0.145	9	t:2.751	0.014
GC	100 kDa	0.943	0.297	9	1.059	0.552	9	t:-0.557	0.585
	65 kDa	0.945	0.179	9	1.055	0.259	9	t:-1.045	0.311
	30 kDa	1.084	0.144	9	0.917	0.207	9	t:1.993	0.064
CT	100 kDa	0.915	0.469	9	1.094	0.325	8	Z:-0.385	0.700
	65 kDa	0.943	0.135	9	1.062	0.243	8	t:-1.263	0.226
	30 kDa	0.849	0.322	9	1.175	0.282	8	t:-2.206	0.043
CE	100 kDa	0.859	0.408	7	1.110	0.112	8	Z:-1.504	0.132
	65 kDa	0.933	0.322	7	1.055	0.128	8	Z:-0.347	0.728
	30 kDa	0.694	0.451	7	1.248	0.327	8	t:-2.746	0.017
H	100 kDa	1.107	0.236	9	0.896	0.139	9	t:2.299	0.035

65 kDa	1.104	0.102	9	0.901	0.181	9	t:2.917	0.010
30 kDa	1.071	0.293	9	0.926	0.276	9	t:1.076	0.298
Tl 100 kDa	0.928	0.115	9	1.088	0.108	9	t:-3.046	0.008
65 kDa	1.083	0.227	9	0.923	0.149	9	t:1.764	0.097
30 kDa	0.986	0.203	9	1.015	0.097	9	t:-0.389	0.702
Cd 100 kDa	0.840	0.178	9	1.156	0.658	9	t:-0.927	0.354
65 kDa	0.927	0.159	9	1.080	0.485	9	Z:0.044	0.965
30 kDa	0.848	0.081	9	1.148	0.596	9	Z:-0.839	0.402
Pt 100 kDa	1.037	0.486	9	0.953	0.255	9	t:0.459	0.652
65 kDa	1.074	0.463	9	0.921	0.254	9	Z:0.044	0.965
30 kDa	1.051	0.218	9	0.948	0.198	9	Z:1.545	0.122
CV 100 kDa	1.303	0.433	9	0.664	0.263	9	t:3.785	0.002
65 kDa	0.890	0.157	9	1.180	0.661	9	Z:-0.662	0.508
30 kDa	1.049	0.199	9	0.938	0.319	9	t:0.884	0.390
SN 100 kDa	1.060	0.416	8	0.925	0.502	6	t:0.552	0.591
65 kDa	1.020	0.326	8	0.970	0.189	6	t:0.336	0.743
30 kDa	1.050	0.346	8	0.930	0.264	6	t:0.704	0.495
Vr 100 kDa	0.924	0.328	9	1.081	0.203	9	t:-1.224	0.239
65 kDa	1.003	0.257	9	0.997	0.137	9	Z:-0.574	0.566
30 kDa	0.958	0.279	9	1.043	0.214	9	t:-1.192	0.233

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; Tl, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 16. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de VDAC en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	1.317	0.373	9	0.690	0.096	9	Z:2.870	0.004
CP	0.809	0.243	9	1.188	0.454	9	t:-2.206	0.042
GC	0.898	0.357	9	1.081	0.693	9	t:-0.704	0.492
CT	0.976	0.206	9	1.023	0.167	8	Z:-0.866	0.386
CE	1.304	0.398	7	0.728	0.138	8	t:3.855	0.002
H	1.092	0.113	9	0.911	0.260	9	t:1.913	0.074
Tl	1.156	0.409	9	0.845	0.350	9	t:1.731	0.103
Cd	1.126	0.317	9	0.830	0.476	9	t:1.554	0.140
Pt	1.008	0.295	9	0.981	0.193	9	t:0.234	0.818
CV	0.828	0.742	9	1.207	0.410	9	t:-1.339	0.199
SN	1.099	0.179	8	0.864	0.216	6	t:2.227	0.046
Vr	1.028	0.454	9	0.832	0.153	9	Z:1.104	0.270

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; Tl, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 17. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de CI en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	1.017	0.482	9	0.765	0.172	9	Z:1.192	0.233
CP	1.145	0.355	9	0.828	0.205	9	t:2.312	0.034
GC	0.733	0.195	9	1.271	0.238	9	t:-5.245	0.0001
CT	0.847	0.104	9	1.179	0.295	8	t:-3.172	0.006
CE	0.747	0.236	7	1.224	0.294	8	t:-3.425	0.005
H	1.310	0.518	9	0.667	0.191	9	Z:2.428	0.015
TI	0.796	0.288	9	1.197	0.711	9	Z:-1.722	0.085
Cd	0.876	0.463	9	1.125	0.395	9	t:-1.230	0.237
Pt	1.047	0.323	9	0.950	0.298	9	t:0.665	0.515
CV	1.134	0.562	9	0.859	0.256	9	t:1.335	0.201
SN	0.771	0.540	8	1.305	0.990	6	t:-1.301	0.218
Vr	0.814	0.203	9	1.192	0.491	9	t:-1.369	0.171

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 18. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de CII en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.992	0.474	9	0.720	0.142	9	Z:1.369	0.171
CP	1.086	0.259	9	0.763	0.496	9	Z:2.693	0.007
GC	0.626	0.165	9	1.219	0.411	9	Z:-3.576	0.0003
CT	1.032	0.293	9	0.969	0.151	8	t:0.546	0.593
CE	0.861	0.389	7	1.120	0.320	8	t:-1.414	0.181
H	1.315	0.488	9	0.688	0.214	9	t:3.532	0.003
TI	0.641	0.104	9	1.362	0.707	9	Z:-3.400	0.001
Cd	0.810	0.247	9	1.188	0.629	9	Z:-1.015	0.310
Pt	1.007	0.213	9	0.987	0.521	9	t:0.105	0.918
CV	1.175	0.205	9	0.822	0.269	9	t:3.129	0.006
SN	0.829	0.758	8	1.231	1.086	6	t:-1.033	0.302
Vr	1.093	0.195	9	0.901	0.272	9	t:1.721	0.105

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 19. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de CIII en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	1.147	0.414	9	0.812	0.177	9	Z:2.075	0.038
CP	0.960	0.346	9	0.913	0.472	9	Z:0.662	0.508
GC	0.733	0.217	9	1.159	0.444	9	Z:-2.340	0.019
CT	1.027	0.282	9	0.971	0.174	8	t:0.476	0.641
CE	0.873	0.475	7	1.111	0.258	8	t:-1.232	0.240
H	1.381	0.476	9	0.562	0.139	9	Z:3.223	0.001
TI	0.686	0.108	9	1.324	0.642	9	Z:-3.223	0.001
Cd	0.685	0.244	9	1.212	0.486	9	Z:-2.605	0.009
Pt	0.998	0.536	9	1.007	0.460	9	Z:0.132	0.895
CV	1.212	0.511	9	0.778	0.321	9	Z:-3.311	0.001
SN	0.860	0.751	8	1.192	1.120	6	Z:-0.516	0.606
Vr	1.106	0.146	9	0.891	0.253	9	Z:2.215	0.042

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 20. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de CIV en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	1.032	0.452	9	0.975	0.181	9	t:0.349	0.732
CP	1.076	0.421	9	0.908	0.302	9	t:0.976	0.343
GC	0.925	0.406	9	1.078	0.199	9	t:-1.013	0.326
CT	0.874	0.162	9	1.138	0.222	8	t:-2.828	0.013
CE	0.914	0.279	7	1.077	0.253	8	t:-1.183	0.258
H	1.089	0.489	9	0.909	0.238	9	t:0.995	0.334
TI	1.033	0.128	9	0.958	0.298	9	t:0.694	0.498
Cd	0.830	0.175	9	1.179	0.386	9	t:-2.466	0.025
Pt	1.056	0.529	9	0.945	0.349	9	t:0.525	0.607
CV	1.203	0.313	9	0.791	0.354	9	t:2.613	0.019
SN	0.849	0.660	8	1.202	0.618	6	t:-1.017	0.329
Vr	0.815	0.116	9	1.190	0.344	9	Z:-2.340	0.019

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 21. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de CV en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.973	0.144	9	1.020	0.240	9	Z:0.751	0.453
CP	1.216	0.452	9	0.781	0.317	9	t:2.362	0.031
GC	0.819	0.279	9	0.861	0.522	9	t:-0.215	0.833
CT	1.061	0.081	9	0.925	0.117	8	t:2.809	0.013
CE	0.931	0.204	7	1.067	0.214	8	t:-1.254	0.232
H	0.890	0.222	9	1.105	0.315	9	t:-1.673	0.114
TI	1.021	0.171	9	0.984	0.141	9	t:0.496	0.626
Cd	0.882	0.188	9	1.125	0.554	9	Z:-1.015	0.310
Pt	0.807	0.357	9	0.950	0.395	9	Z:-1.104	0.270
CV	1.204	0.551	9	0.797	0.297	9	t:1.949	0.069
SN	1.002	0.198	8	1.000	0.402	6	t:0.011	0.991
Vr	1.040	0.439	9	0.958	0.151	9	t:0.529	0.604

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 22. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de p65 en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	1.052	0.545	9	0.945	0.508	9	t:0.432	0.672
CP	0.848	0.276	9	1.164	0.428	9	t:-1.865	0.081
GC	0.959	0.182	9	1.030	0.255	9	t:-0.684	0.504
CT	1.280	0.437	9	0.682	0.169	8	t:3.625	0.002
CE	1.283	0.517	7	0.677	0.137	8	t:3.206	0.007
H	1.062	0.376	9	0.958	0.261	9	t:0.680	0.506
TI	1.094	0.326	9	0.906	0.173	9	t:1.529	0.146
Cd	1.430	0.375	9	0.570	0.256	9	t:5.691	0.00003
Pt	0.993	0.231	9	1.010	0.162	9	t:-0.180	0.860
CV	1.087	0.214	9	0.907	0.335	9	t:1.356	0.194
SN	0.845	0.400	8	1.200	0.591	6	t:-1.346	0.203
Vr	0.998	0.241	9	1.006	0.475	9	t:-0.045	0.965

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 23. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de p50 en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.865	0.242	9	1.120	0.284	9	t:-2.053	0.057
CP	1.077	0.206	9	0.914	0.195	9	t:1.722	0.104
GC	0.771	0.181	9	1.236	0.353	9	t:-3.518	0.003
CT	0.934	0.638	9	0.624	0.538	8	t:0.962	0.336
CE	1.169	0.589	7	0.830	0.312	8	t:1.421	0.179
H	0.920	0.182	9	1.073	0.449	9	t:-0.947	0.358
TI	1.000	0.576	9	0.992	0.671	9	t:0.026	0.979
Cd	0.977	0.274	9	1.037	0.514	9	t:-0.311	0.760
Pt	0.668	0.342	9	1.343	0.370	9	t:-4.012	0.001
CV	0.879	0.358	9	1.127	0.516	9	t:-1.184	0.254
SN	0.977	0.155	8	1.030	0.186	6	t:-0.582	0.572
Vr	0.997	0.391	9	1.001	0.349	9	t:-0.025	0.980

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 24. Estadísticos y comparaciones entre grupos de edad para los niveles de IκBa en cada región cerebral.

Región	Grupo de mediana edad			Grupo de avanzada edad			Test estadístico	
	Media	Desviación estándar	n	Media	Desviación estándar	n	Valor	p
CF	0.994	0.310	9	1.000	0.414	9	t:-0.031	0.976
CP	1.073	0.586	9	0.831	0.373	9	t:1.047	0.311
GC	1.171	0.233	9	0.831	0.399	9	t:2.205	0.042
CT	1.202	0.448	9	0.778	0.556	8	t:1.744	0.102
CE	0.989	0.339	7	1.013	0.259	8	t:-0.154	0.880
H	1.170	0.355	9	0.831	0.335	9	t:2.083	0.049
TI	1.106	0.322	9	0.890	0.277	9	t:1.520	0.148
Cd	1.151	0.308	9	0.854	0.283	9	t:2.132	0.049
Pt	1.348	0.466	9	0.646	0.231	9	t:4.044	0.001
CV	0.937	0.211	9	1.027	0.356	9	t:-0.647	0.527
SN	0.984	0.223	8	1.010	0.237	6	t:-0.211	0.836
Vr	0.915	0.461	9	1.071	0.709	9	t:-0.555	0.586

Notas: CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TI, tálamo; Cd, caudado; Pt, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; Vr, vermis; t, t de Student; Z, U de Mann-Whitney.

Anexo 25. Ajuste para comparaciones múltiples por FDR mediante el método de Benjamini y Hochberg.

Molécula	p-valor	Rango (i)	d*i/n (d=0.05)	Significativo FDR = 5%	d*i/n (d=0.1)	Significativo FDR = 10%
COX2 CP	0.000001	1	0.0002	COX2 CP	0.0004	COX2 CP
NFkBp65 CD	0.000033	2	0.0004	NFkBp65 CD	0.0007	NFkBp65 CD
MDA CF	0.0001	3	0.0005	MDA CF	0.0011	MDA CF
SOD1 CD	0.0001	4	0.0007	SOD1 CD	0.0014	SOD1 CD
SOD1 PT	0.0001	5	0.0009	SOD1 PT	0.0018	SOD1 PT
MDA CE	0.0001	6	0.0011	MDA CE	0.0022	MDA CE
CI GC	0.0001	7	0.0013	CI GC	0.0025	CI GC
CIII H	0.0001	8	0.0014	CIII H	0.0029	CIII H
COX2 CT	0.0001	9	0.0016	COX2 CT	0.0033	COX2 CT
VDAC CF	0.0002	10	0.0018	VDAC CF	0.0036	VDAC CF
TRX CF	0.0003	11	0.0020	TRX CF	0.0040	TRX CF
NKT TL	0.0003	12	0.0022	NKT TL	0.0043	NKT TL
SOD2 CV	0.0004	13	0.0024	SOD2 CV	0.0047	SOD2 CV
CAT CV	0.0006	14	0.0025	CAT CV	0.0051	CAT CV
CEL VR	0.0009	15	0.0027	CEL VR	0.0054	CEL VR
IKBa PT	0.0009	16	0.0029	IKBa PT	0.0058	IKBa PT
CII GC	0.0010	17	0.0031	CII GC	0.0062	CII GC
NFkBp50 PT	0.0010	18	0.0033	NFkBp50 PT	0.0065	NFkBp50 PT
SOD2 PT	0.0011	19	0.0034	SOD2 PT	0.0069	SOD2 PT
NRF2 100 CV	0.0016	20	0.0036	NRF2 100 CV	0.0072	NRF2 100 CV
VDAC CE	0.0020	21	0.0038	VDAC CE	0.0076	VDAC CE
GPX4 CE	0.0020	22	0.0040	GPX4 CE	0.0080	GPX4 CE
CEL CF	0.0021	23	0.0042	CEL CF	0.0083	CEL CF
TRX CT	0.0022	24	0.0043	TRX CT	0.0087	TRX CT
CML CP	0.0023	25	0.0045	CML CP	0.0091	CML CP
COX2 CF	0.0024	26	0.0047	COX2 CF	0.0094	COX2 CF
NFkBp65 CT	0.0025	27	0.0049	NFkBp65 CT	0.0098	NFkBp65 CT
CII H	0.0028	28	0.0051	CII H	0.0101	CII H
NFkBp50 GC	0.0029	29	0.0053	NFkBp50 GC	0.0105	NFkBp50 GC
CI H	0.0030	30	0.0054	CI H	0.0109	CI H
SOD1 TL	0.0031	31	0.0056	SOD1 TL	0.0112	SOD1 TL
CAT TL	0.0033	32	0.0058	CAT TL	0.0116	CAT TL
CML GC	0.0038	33	0.0060	CML GC	0.0120	CML GC
CYP2J2 CF	0.0043	34	0.0062	CYP2J2 CF	0.0123	CYP2J2 CF
CI CE	0.0045	35	0.0063	CI CE	0.0127	CI CE
GPX4 VR	0.0048	36	0.0065	GPX4 VR	0.0130	GPX4 VR
TRX CP	0.0052	37	0.0067	TRX CP	0.0134	TRX CP
CI CT	0.0063	38	0.0069	CI CT	0.0138	CI CT
CYP2J2 CD	0.0064	39	0.0071	CYP2J2 CD	0.0141	CYP2J2 CD
CII CV	0.0065	40	0.0072	CII CV	0.0145	CII CV
NFkBp65 CE	0.0069	41	0.0074	NFkBp65 CE	0.0149	NFkBp65 CE
CIV VR	0.0069	42	0.0076	CIV VR	0.0152	CIV VR
NRF2 100 TL	0.0077	43	ki 0.0078	NRF2 100 TL	0.0156	NRF2 100 TL
CII TL	0.0080	44	0.0080	CII TL	0.0159	CII TL
SOD2 CP	0.0089	45	0.0082	SOD2 CP	0.0163	SOD2 CP
CIII TL	0.0096	46	0.0083	CIII TL	0.0167	CIII TL
NRF2 65 H	0.0101	47	0.0085	NRF2 65 H	0.0170	NRF2 65 H
COX2 SN	0.0101	48	0.0087	COX2 SN	0.0174	COX2 SN
CIII CD	0.0103	49	0.0089	CIII CD	0.0178	CIII CD
CML CF	0.0105	50	0.0091	CML CF	0.0181	CML CF
GPX4 CF	0.0109	51	0.0092	GPX4 CF	0.0185	GPX4 CF
CYP2J2 TL	0.0111	52	0.0094	CYP2J2 TL	0.0188	CYP2J2 TL
CEL CD	0.0111	53	0.0096	CEL CD	0.0192	CEL CD
CML CV	0.0112	54	0.0098	CML CV	0.0196	CML CV
MDA TL	0.0116	55	0.0100	MDA TL	0.0199	MDA TL
CAT CD	0.0119	56	0.0101	CAT CD	0.0203	CAT CD
GPX4 CV	0.0126	57	0.0103	GPX4 CV	0.0207	GPX4 CV
CIV CT	0.0127	58	0.0105	CIV CT	0.0210	CIV CT

CV CT	0.0132	59	0.0107	0.0214	CV CT
NRF2 30 CP	0.0142	60	0.0109	0.0217	NRF2 30 CP
NKT SN	0.0153	61	0.0111	0.0221	NKT SN
TRX CE	0.016	62	0.0112	0.0225	TRX CE
CYP2J2 CT	0.0165	63	0.0114	0.0228	CYP2J2 CT
NRF2 30 CE	0.0167	64	0.0116	0.0232	NRF2 30 CE
CEL CT	0.0167	65	0.0118	0.0236	CEL CT
CYP2J2 H	0.0174	66	0.0120	0.0239	CYP2J2 H
CIV CV	0.0188	67	0.0121	0.0243	CIV CV
CIII GC	0.0199	68	0.0123	0.0246	CIII GC
SOD2 CE	0.0205	69	0.0125	0.0250	SOD2 CE
SOD2 SN	0.0209	70	0.0127	0.0254	SOD2 SN
MDA PT	0.0234	71	0.0129	0.0257	MDA PT
SOD1 H	0.0247	72	0.0130	0.0261	SOD1 H
SOD1 SN	0.0249	73	0.0132	0.0264	SOD1 SN
CIV CD	0.0253	74	0.0134	0.0268	CIV CD
NKT CV	0.0254	75	0.0136	0.0272	NKT CV
MDA CP	0.0255	76	0.0138	0.0275	MDA CP
GPX4 H	0.0256	77	0.0139	0.0279	GPX4 H
NRF2 30 CF	0.0258	78	0.0141	0.0283	NRF2 30 CF
CML H	0.0274	79	0.0143	0.0286	CML H
TRX SN	0.0279	80	0.0145	0.0290	TRX SN
GPX4 TL	0.0292	81	0.0147	ki 0.0293	GPX4 TL
CV CP	0.0312	82	0.0149	0.0297	
MDA H	0.0335	83	0.0150	0.0301	
MDA CT	0.0339	84	0.0152	0.0304	
CI CP	0.0344	85	0.0154	0.0308	
NRF2 100 H	0.0353	86	0.0156	0.0312	
CML CT	0.0365	87	0.0158	0.0315	
CAT CT	0.0382	88	0.0159	0.0319	
CIII CF	0.0403	89	0.0161	0.0322	
CAT SN	0.0405	90	0.0163	0.0326	
SOD2 CT	0.0413	91	0.0165	0.0330	
CIII VR	0.0416	92	0.0167	0.0333	
VDAC CP	0.0424	93	0.0168	0.0337	
IKBa GC	0.0424	94	0.0170	0.0341	
NRF2 30 CT	0.0434	95	0.0172	0.0344	
COX2 H	0.0454	96	0.0174	0.0348	
VDAC SN	0.0459	97	0.0176	0.0351	
NKT CF	0.0460	98	0.0178	0.0355	
CIII CV	0.0466	99	0.0179	0.0359	
CI VR	0.0484	100	0.0181	0.0362	
IKBa CD	0.0489	101	0.0183	0.0366	
IKBa H	0.0491	102	0.0185	0.0370	
SOD1 CV	0.0493	103	0.0187	0.0373	
NKT PT	0.0543	104	0.0188	0.0377	
NFkBp50 CF	0.0569	105	0.0190	0.0380	
TRX VR	0.0622	106	0.0192	0.0384	
NRF2 30 GC	0.0636	107	0.0194	0.0388	
GPX4 SN	0.0662	108	0.0196	0.0391	
NKT CT	0.0673	109	0.0197	0.0395	
CV CV	0.0690	110	0.0199	0.0399	
SOD2 H	0.0724	111	0.0201	0.0402	
VDAC H	0.0738	112	0.0203	0.0406	
NFkBp65 CP	0.0807	113	0.0205	0.0409	
CAT VR	0.0885	114	0.0207	0.0413	
NRF2 65 TL	0.0968	115	0.0208	0.0417	
IKBa CT	0.1016	116	0.0210	0.0420	
CII CP	0.1026	117	0.0212	0.0424	
VDAC TL	0.1027	118	0.0214	0.0428	
TRX GC	0.1030	119	0.0216	0.0431	
NFkBp50 CP	0.1044	120	0.0217	0.0435	
CII VR	0.1046	121	0.0219	0.0438	
NKT CE	0.1088	122	0.0221	0.0442	

CII CD	0.1121	123	0.0223	0.0446
CV H	0.1138	124	0.0225	0.0449
NKT GC	0.1161	125	0.0226	0.0453
NRF2 100 CE	0.1173	126	0.0228	0.0457
CII CF	0.1183	127	0.0230	0.0460
CAT GC	0.1214	128	0.0232	0.0464
GPX4 PT	0.1270	129	0.0234	0.0467
CI TL	0.1365	130	0.0236	0.0471
MDA CD	0.1390	131	0.0237	0.0475
VDAC CD	0.1397	132	0.0239	0.0478
CAT CE	0.1408	133	0.0241	0.0482
TRX H	0.1446	134	0.0243	0.0486
NFkBp65 TL	0.1459	135	0.0245	0.0489
IKBa TL	0.1480	136	0.0246	0.0493
CML CE	0.1494	137	0.0248	0.0496
NRF2 30 CD	0.1532	138	0.0250	0.0500
CI CF	0.1587	139	0.0252	0.0504
GPX4 CT	0.1629	140	0.0254	0.0507
NFkBp50 CE	0.1789	141	0.0255	0.0511
CII CE	0.1807	142	0.0257	0.0514
NRF2 100 CD	0.1840	143	0.0259	0.0518
COX2 VR	0.1904	144	0.0261	0.0522
NKT CD	0.1912	145	0.0263	0.0525
NFkBp65 CV	0.1939	146	0.0264	0.0529
COX2 CD	0.1948	147	0.0266	0.0533
VDAC CV	0.1992	148	0.0268	0.0536
SOD2 TL	0.1996	149	0.0270	0.0540
CYP2J2 SN	0.2004	150	0.0272	0.0543
CI CV	0.2005	151	0.0274	0.0547
NFkBp65 SN	0.2033	152	0.0275	0.0551
CI SN	0.2178	153	0.0277	0.0554
NRF2 65 CV	0.2190	154	0.0279	0.0558
NRF2 65 CT	0.2259	155	0.0281	0.0562
CV CD	0.2310	156	0.0283	0.0565
CV CE	0.2321	157	0.0284	0.0569
CI CD	0.2366	158	0.0286	0.0572
VDAC VR	0.2371	159	0.0288	0.0576
NRF2 100 VR	0.2389	160	0.0290	0.0580
CIII CE	0.2396	161	0.0292	0.0583
CEL TL	0.2496	162	0.0293	0.0587
NFkBp50 CV	0.2539	163	0.0295	0.0591
CAT CF	0.2562	164	0.0297	0.0594
CIV CE	0.2579	165	0.0299	0.0598
TRX CV	0.2579	166	0.0301	0.0601
TRX PT	0.2668	167	0.0303	0.0605
GPX4 GC	0.2714	168	0.0304	0.0609
NRF2 100 CP	0.2761	169	0.0306	0.0612
NRF2 100 CF	0.2847	170	0.0308	0.0616
NRF2 30 H	0.2979	171	0.0310	0.0620
NFkBp50 CT	0.2997	172	0.0312	0.0623
NKT VR	0.3012	173	0.0313	0.0627
IKBa CP	0.3108	174	0.0315	0.0630
NRF2 30 PT	0.3108	175	0.0317	0.0634
NRF2 65 GC	0.3115	176	0.0319	0.0638
CIV GC	0.3264	177	0.0321	0.0641
CIV SN	0.3292	178	0.0322	0.0645
SOD1 GC	0.3338	179	0.0324	0.0649
CIV H	0.3344	180	0.0326	0.0652
SOD2 GC	0.3382	181	0.0328	0.0656
NRF2 65 CF	0.3406	182	0.0330	0.0659
NRF2 65 CE	0.3429	183	0.0332	0.0663
CIV CP	0.3434	184	0.0333	0.0667
COX2 CV	0.3443	185	0.0335	0.0670
CYP2J2 CV	0.3559	186	0.0337	0.0674

NFkBp50 H	0.3579	187	0.0339	0.0678
MDA VR	0.3717	188	0.0341	0.0681
GPX4 CP	0.3762	189	0.0342	0.0685
MDA SN	0.3790	190	0.0344	0.0688
NRF2 100 CT	0.3815	191	0.0346	0.0692
NRF2 65 CD	0.3836	192	0.0348	0.0696
NRF2 30 CV	0.3897	193	0.0350	0.0699
NRF2 65 PT	0.3991	194	0.0351	0.0703
COX2 GC	0.4097	195	0.0353	0.0707
SOD2 VR	0.4106	196	0.0355	0.0710
CEL SN	0.4148	197	0.0357	0.0714
CII SN	0.4285	198	0.0359	0.0717
CV PT	0.4338	199	0.0361	0.0721
CYP2J2 GC	0.4359	200	0.0362	0.0725
SOD1 CT	0.4772	201	0.0364	0.0728
NRF2 30 VR	0.4787	202	0.0366	0.0732
CML TL	0.4856	203	0.0368	0.0736
SOD1 VR	0.4857	204	0.0370	0.0739
VDAC GC	0.4916	205	0.0371	0.0743
CML VR	0.4937	206	0.0373	0.0746
NRF2 30 SN	0.4951	207	0.0375	0.0750
CIV TL	0.4979	208	0.0377	0.0754
COX2 CE	0.5029	209	0.0379	0.0757
NFkBp65 GC	0.5039	210	0.0380	0.0761
NFkBp65 H	0.5065	211	0.0382	0.0764
CEL CE	0.5135	212	0.0384	0.0768
CI PT	0.5153	213	0.0386	0.0772
CIII SN	0.5181	214	0.0388	0.0775
IKBa CV	0.5267	215	0.0389	0.0779
SOD1 CF	0.5342	216	0.0391	0.0783
CML SN	0.5471	217	0.0393	0.0786
CAT H	0.5554	218	0.0395	0.0790
CEL PT	0.5712	219	0.0397	0.0793
NFkBp50 SN	0.5716	220	0.0399	0.0797
CEL CP	0.5771	221	0.0400	0.0801
NRF2 100 GC	0.5852	222	0.0402	0.0804
IKBa VR	0.5864	223	0.0404	0.0808
SOD1 CP	0.5894	224	0.0406	0.0812
SOD2 CF	0.5913	225	0.0408	0.0815
NRF2 100 SN	0.5914	226	0.0409	0.0819
CII CT	0.5931	227	0.0411	0.0822
CV VR	0.6041	228	0.0413	0.0826
CML CD	0.6048	229	0.0415	0.0830
CIV PT	0.6070	230	0.0417	0.0833
VDAC CT	0.6095	231	0.0418	0.0837
CV CF	0.6254	232	0.0420	0.0841
CV TL	0.6264	233	0.0422	0.0844
CYP2J2 CP	0.6387	234	0.0424	0.0848
CIII CT	0.6408	235	0.0426	0.0851
NRF2 100 PT	0.6523	236	0.0428	0.0855
NFkBp65 CF	0.6715	237	0.0429	0.0859
NKT CP	0.6736	238	0.0431	0.0862
NRF2 30 TL	0.7021	239	0.0433	0.0866
CIV CF	0.7315	240	0.0435	0.0870
CAT CP	0.7373	241	0.0437	0.0873
GPX4 CD	0.7399	242	0.0438	0.0877
NRF2 65 SN	0.7428	243	0.0440	0.0880
CYP2J2 CE	0.7552	244	0.0442	0.0884
NFkBp50 CD	0.7601	245	0.0444	0.0888
SOD1 CE	0.7628	246	0.0446	0.0891
CML PT	0.7663	247	0.0447	0.0895
COX2 PT	0.7892	248	0.0449	0.0899
TRX CD	0.7985	249	0.0451	0.0902
CEL H	0.7986	250	0.0453	0.0906

CEL CV	0.8117	251	0.0455	0.0909
CIII CP	0.8122	252	0.0457	0.0913
VDAC PT	0.8176	253	0.0458	0.0917
CV GC	0.8327	254	0.0460	0.0920
IKBa SN	0.8361	255	0.0462	0.0924
COX2 TL	0.8380	256	0.0464	0.0928
CEL GC	0.8483	257	0.0466	0.0931
TRX TL	0.8556	258	0.0467	0.0935
NFkBp65 PT	0.8596	259	0.0469	0.0938
NKT H	0.8701	260	0.0471	0.0942
MDA GC	0.8749	261	0.0473	0.0946
IKBa CE	0.8803	262	0.0475	0.0949
MDA CV	0.8845	263	0.0476	0.0953
NRF2 65 CP	0.9163	264	0.0478	0.0957
CII PT	0.9180	265	0.0480	0.0960
SOD2 CD	0.9216	266	0.0482	0.0964
NRF2 65 VR	0.9475	267	0.0484	0.0967
CYP2J2 PT	0.9496	268	0.0486	0.0971
CYP2J2 VR	0.9598	269	0.0487	0.0975
NFkBp65 VR	0.9645	270	0.0489	0.0978
CIII PT	0.9716	271	0.0491	0.0982
IKBa CF	0.9755	272	0.0493	0.0986
NFkBp50 TL	0.9793	273	0.0495	0.0989
NFkBp50 VR	0.9800	274	0.0496	0.0993
CAT PT	0.9891	275	0.0498	0.0996
CV SN	0.9912	276	0.0500	0.1000

Notas: n = 276; FDR, *false discovery rate*; CF, corteza frontal; CP, corteza parietal; GC, giro cingulado; CT, corteza temporal; CE, corteza entorrinal; H, hipocampo; TL, tálamo; CD, caudado; PT, putamen; CV, corteza visual; SN, sustancia nigra; VR, vermis.