



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Modificaciones en la herencia epigenética inducidas por la dieta grasa revertidas por el resveratrol en el modelo murino SAMP8

Vanesa Izquierdo Cadenas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación

**Modificaciones en la herencia epigenética
inducidas por la dieta grasa revertidas por el
resveratrol en el modelo murino SAMP8**

Vanesa Izquierdo Cadenas

Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación
Departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica
Doctorado en Biotecnología Biomédica

Modificaciones en la herencia epigenética inducidas por la dieta grasa revertidas por el resveratrol en el modelo murino SAMP8



Vanesa Izquierdo Cadenas

2021



Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación
Departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica
Doctorado en Biotecnología Biomédica

Modificaciones en la herencia epigenética inducidas por la dieta grasa revertidas por el resveratrol en el modelo murino SAMP8

Memoria presentada por Vanesa Izquierdo Cadenas para optar al título de doctora por la Universidad de Barcelona

Directora

Mercè Pallàs Lliberia

Director

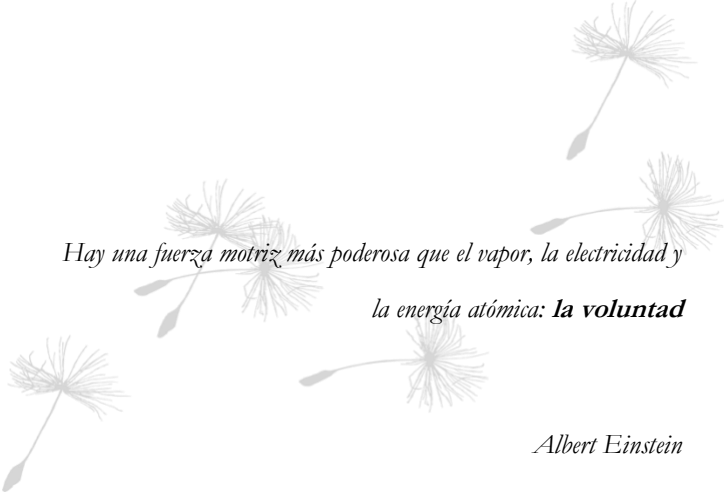
Christian Griñán Ferré

Doctoranda

Vanesa Izquierdo Cadenas

Vanesa Izquierdo Cadenas

2021

The image features several stylized, light gray dandelion seed heads scattered across the lower half of the page. Each seed head consists of a central stem with numerous fine, radiating lines representing the seeds. The stems are thin and slightly curved. The overall aesthetic is minimalist and elegant.

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y
la energía atómica: **la voluntad***

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

El doctorado es una etapa intensa en la que he crecido como persona y como científica y que, sin duda, ha sido posible gracias al apoyo de muchas personas que han formado parte de este proceso.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Mercè Pallàs y al Dr. Christian Griñán por dirigir esta tesis y por haber formado parte de su grupo de investigación.

También al resto de miembros del grupo, Júlia, Dolors y Foteini con las que he compartido esta etapa. Gracias por todos los momentos que hemos vivido en el laboratorio.

De las mejores cosas que me llevo de esta experiencia, sin duda es la amistad de increíbles personas que formarán parte de mi vida más allá del doctorado:

Quiero agradecer especialmente a Verónica Palomera por enseñarme tantas cosas y pasar de ser mi profesora de prácticas de máster a ser una de mis mejores amigas. Tú fuiste mi inspiración para realizar el doctorado y te agradezco todos los momentos vividos dentro y fuera del laboratorio.

A Dolors Puigoriol que ha sido una gran compañera de trabajo y, sobre todo una gran amiga. Gracias por siempre estar ahí, escucharme, apoyarme cuando más lo he necesitado y por aportarme esa esperanza y buen rollo.

Gracias a Leticia Duart. Eres una de las personas más importantes para mí. Gracias por haber compartido tantos momentos y por ser una gran amiga. Pocas personas son verdaderas y están ahí en los peores momentos. Te adoro.

A my best friend, Sergi Vizcaíno por compartir tantos momentos, por nuestras charlas filosóficas y tu apoyo incondicional. Y por que sigamos compartiendo y creciendo juntos como personas. Encontraremos nuestro lugar.

A Gaia Botteri te quiero agradecer el gran apoyo que siempre me has dado y creer en mí. Te admiro muchísimo como persona y científica.

También agradecer enormemente a Ana Velázquez por ser tan buena amiga y compañera. Por tu positividad y por tener siempre una sonrisa. Por compartir este arduo camino y tu apoyo incondicional. Nosotras podemos con todo.

Al grupo naranja (Javier Pizarro, Lucia Peña y David Aguilar) por ser los mejores compañeros de laboratorio y amigos, por tantos momentos de risa y por vuestra ayuda incondicional. Sois los mejores.

Al resto de amigos con los que he compartido tantos momentos, tanto en el laboratorio como fuera de él, Mario, Paty y Brigitte. Gracias a todos por hacer que el trabajo fuera más ameno y por todos los momentos vividos.

Al resto de personas del departamento, Raúl, Miren, Oriol, Emma, Javi, Marina, Triana, Roger, Mar, Quim y Silvia. Gracias a todos por hacer que se trabaje tan a gusto y que haya tan buen ambiente de trabajo. También agradecer al personal de estabulario, Marta, David y Teresa por su trabajo y siempre mantener la sonrisa.

Otra gran experiencia del doctorado fue haber compartido grandes momentos con mis alumnos Sergio y Vicky. Gracias por vuestro gran esfuerzo y vuestra ayuda. Sin duda, la relación profesor-alumno te hace crecer y ser mejor científico, ya que el alumno también enseña al maestro. Gracias a Sergio por tu amistad y por hacer de los momentos más duros del doctorado un recuerdo feliz.

Otro momento muy importante del doctorado fue cuando realicé la estancia de investigación en Guadalajara (México). Muchísimas gracias por el apoyo y la hospitalidad que recibí, en todo momento me sentí como en casa y gracias a las personas que estuvieron dándome tanto cariño pasé momentos muy felices a pesar de la pandemia. Gracias al Dr. Daniel Ortuño por recibirme con los brazos abiertos y hacerme sentir como un miembro más de su grupo y darme su apoyo incondicional en los momentos más duros que viví por la pandemia. Agradecer enormemente a la Dra. Celia González por entenderme, por su apoyo y esfuerzo por hacerme sentir bien durante el tiempo de que pudimos trabajar juntas.

Esta etapa en Guadalajara no habría sido tan increíble si no hubiera conocido a Sarahí Robledo que se ha convertido en una gran amiga y hermana de confinamiento. Te agradezco tanto que me hayas recibido en tu casa como si fuera de tu familia. Mil gracias por darme tanto cariño y por siempre tenerme presente. También agradecer a la familia Robledo por adoptarme como una más de su familia y por tantos momentos juntos. Además, agradecer enormemente la amabilidad y el recibimiento por parte del resto de miembros del Tecnológico de Monterrey.

También agradecer a Laila, Sandra, Anastasia y María que han sido compañeras de piso y amigas. Fuisteis un gran apoyo durante el doctorado estando ahí en los momentos más duros y también por los buenos momentos.

Darle las gracias a mi familia, por estar apoyándome siempre y creer en mí. Vosotros creasteis las bases de la persona que soy hoy, con la perseverancia y fuerza que también os

caracteriza. Gracias por enseñarme que soy capaz de cualquier cosa y que pase lo que pase estaréis ahí para apoyarme. Os quiero.

Finalmente, agradecerle a mi pareja Alex por todo su apoyo. No puedo ser más afortunada de haberte conocido. Gracias por estar en los malos y buenos momentos. Por tu infinita positividad (que a mi a veces me falta) y por siempre aportarme esperanza e iluminarme cuando no veo el final del túnel. Te quiero.

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

Ministerio de Economía, Industria y Competitividad

Gobierno de España

(Proyecto SAF2016-77703, PCIN-2015-229)



Generalitat de Catalunya

(AGAUR, 2017SGR106)



Centros de investigación Biomédicas en la Red de Enfermedades Neurodegenerativas.

(CIBERNED)



Universitat de Barcelona

(APIF 2017-2021)



Institut de Neurociències de la Universitat de Barcelona

(UBNeuro)



ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	XIII
DESARROLLO DE LA TESIS.....	XVII
1. Introducción.....	1
1.1. Envejecimiento	3
1.1.1. Características del envejecimiento	4
1.2. Deterioro cognitivo y enfermedades neurodegenerativas.....	9
1.2.1. Epidemiología y comorbilidad de las enfermedades neurodegenerativas	9
1.2.2. El proceso de deterioro cognitivo.....	11
1.2.3. Factores de riesgo y protectores del deterioro cognitivo	13
1.2.4. Enfermedades neurodegenerativas.....	16
1.2.5. Enfermedad de Alzheimer	20
1.3. Mecanismos epigenéticos y envejecimiento.....	23
1.3.1. Generalidades.....	23
1.3.2. Metilación e hidroximetilación del ADN	26
1.3.3. Modificación de histonas	28
1.3.4. ARNs no codificantes.....	31
1.3.5. m ⁶ A.....	33
1.4. Epigenética y cognición	35
1.4.1. Principales mecanismos epigenéticos implicados en la formación de memoria.	37
1.5. Herencia epigenética y neurodegeneración.....	38
1.5.1. Generalidades.....	38
1.5.2. Principales modificaciones epigenéticas que se mantienen a través de las generaciones	42
1.5.3. Herencia epigenética intergeneracional y transgeneracional... ..	44
1.5.4. Herencia epigenética y enfermedades en la edad adulta	46
1.5.5. Nutrición y mecanismos epigenéticos	51
1.6. Dieta y envejecimiento	54
1.6.1. Resveratrol.....	54
1.6.2. Dieta grasa y resveratrol.....	60

1.7. El ratón SAMP8 como modelo para el estudio del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento	64
1.7.1. Origen del ratón SAMP8.....	64
1.7.2. Características generales del ratón SAMP8.....	65
1.7.3. Características bioquímicas del ratón SAMP8.....	66
2. Objetivos.....	73
3. Resultados.....	79
3.1. <i>Publicación 1</i>.....	81
Introduction	87
Material and Methods.....	89
Results.....	96
Discussion	105
References.....	110
3.2. <i>Publicación 2</i>.....	119
Introduction	125
Materials and Methods.....	128
Results.....	134
Discussion	144
Abbreviations	150
References.....	152
4. Discusión	163
4.1. El efecto de la dieta materna en la descendencia: herencia epigenética.....	165
5. Conclusiones	189
6. Bibliografía	195

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcadores del envejecimiento.....	5
Figura 2. Factores del estilo de vida que modulan el proceso de envejecimiento.....	14
Figura 3. Principales mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica.....	25
Figura 4. Estructura de la cromatina..	29
Figura 5. Alteraciones asociadas al envejecimiento y los miRNAs implicados.....	32
Figura 6. Regulación del proceso de m6A.....	34
Figura 7. Los diferentes tipos de herencia que conforman a los individuos y su interacción.....	40
Figura 8. Niveles de 5-mC durante los periodos de reprogramación del epigenoma durante el desarrollo.	43
Figura 9. Exposición a un factor ambiental que produce cambios epigenéticos a través de la línea germinal.....	46
Figura 10. Ejemplo de exposición temprana a un factor ambiental durante el periodo de gestación.....	48
Figura 11. Efecto intergeneracional de la hambruna holandesa	51
Figura 12. Dieta y epigenética.....	53
Figura 13. Estructura química del RSV y sus dos isoformas bajo la influencia de factores externos.....	54
Figura 14. Principales beneficios del consumo de RSV.....	58
Figura 15. Factores que pueden influenciar el balance energético positivo crónico causando la obesidad.....	62
Figura 16. Diferencias fenotípicas entre el ratón SAMP8 y el ratón SAMR1.....	66
Figura 17. Esquema general sobre los mecanismos implicados en la heredabilidad del RSV y su efecto antienvjecimiento en la descendencia...	185

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades neurodegenerativas que cursan con deterioro cognitivo y sus características clínicas, moleculares y neuroanatómicas.....	20
Tabla 2. Genes asociados a la EA.....	22
Tabla 3. Modificaciones de histonas.....	30
Tabla 4. Concentración de RSV en algunos alimentos.....	55
Tabla 5. Dosis recomendadas de RSV.....	57

ABREVIATURAS

α-Syn	α -Sinucleína
βA	β -amiloide
βAPP	Precursor de la proteína β A
3'UTR	Región 3' no traductora (<i>3' untranslated region</i>)
5-hmC	Hidroximetilación del ADN (<i>5-hydroxymethylcytosine</i>)
5-mC	Metilación del ADN (<i>5-methylcytosine</i>)
ABCA7	<i>ATP binding cassette subfamily a member 7</i>
ADAM10	<i>ADAM Metallopeptidase Domain 10</i>
ADCS-ADL	<i>Alzheimer's Diseases Cooperative Study Activities of Daily Living</i>
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
AGO	Proteína argonaute (<i>Argonaute RISC component 1</i>)
AKT	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
ALKBH5	<i>AlkB homolog 5, ARN demethylase</i>
AMP/ATP	Adenosín monofosfato/adenosín trifosfato
AMPK	<i>Protein Kinase AMP-Activated Catalytic Subunit Alpha 1</i>
ApoE ϵ4	Apolipoproteína E isoforma ϵ 4
APP	Proteína precursora de amiloide (<i>Amyloid beta precursor protein</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNin	ARN interferente
ARNm	ARN mensajero
ARNnc	ARNs no codificantes
ARNncl	ARN no codificante largo
ASH	<i>Growht factor receptor bound protein 2</i>
ATF-6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adhenosine triphosphate</i>)
BACE1	β -secretasa 1
BCL7C	<i>B-cell CLL/lymphoma 7C</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain derived neurotrophic factor</i>)
BIN1	<i>Bridging Integrator 1</i>

BPSD	Síntomas psicológicos y del comportamiento asociados a la demencia (<i>Behavioral and psychological symptoms of dementia</i>)
C. elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C9orf72	<i>C9orf72-SMCR8 complex subunit</i>
CA1, CA2	<i>Cornu Ammonis 1 y 2</i>
CaMKII	<i>Calcium/calmodulin dependent protein kinase ii gamma</i>
CARM1	<i>Coactivator associated arginine methyltransferase 1</i>
CB2	Receptor cannabinoide 2
CBLL1	<i>Cbl proto-oncogene like 1</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CD2AP	<i>CD associated protein</i>
CD33	<i>CD33 Molecule</i>
CDKs	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CGPs	Células germinales primordiales
CLU	<i>Clusterin</i>
COX	<i>Ciclooxigenase</i>
CpG	Islas citosina-guanina (<i>5'-C-phosphate-G-3'</i>)
CR1	<i>Complement Receptor Type 1</i>
CREB	<i>CAMP responsive element binding protein</i>
CT	Control
Cxcl-10	<i>C-X-C Motif chemokine ligand 10</i>
DCL	Deterioro cognitivo leve
DCM	Deterioro cognitivo mayor
DJ1	<i>Parkinsonism associated deglycase</i>
DM	Diabetes mellitus
DNMTs	ADN metiltransferasas (<i>DNA methyltransferases</i>)
DOT1L	<i>DOT1 like histone lysine methyltransferase</i>
DSM-5	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DT2	Diabetes tipo 2
EA	Enfermedad de Alzheimer
EED	<i>Embryonic ectoderm development</i>
EH	Enfermedad de Huntington
EHMT	<i>Euchromatic histone lysine methyltransferase 1</i>
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELP3	<i>Elongator acetyltransferase complex subunit 3</i>
EO	Estrés oxidativo
EP	Enfermedad de Parkinson
ERE	Estrés del retículo endoplasmático
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EZH	<i>Enhancer of zeste 1 polycomb repressive complex 2 subunit</i>

F0	Progenitores
F1	Primera generación
F2	Segunda generación
F3	Tercera generación
FOXO	<i>Forkhead Box</i>
FTO	<i>FTO alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase</i>
FUS	<i>FUS ARN binding protein</i>
GABRB3	<i>Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta 3</i>
GBA	<i>Glucosylceramidase beta</i>
Gcn5	<i>Lysine acetyltransferase 2A</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GLP	<i>Euchromatic histone lysine methyltransferase 1</i>
GNAT	<i>Glycine-N-acyltransferase like 1</i>
GRN	<i>Granulin precursor</i>
GWAS	Estudios de asociación de todo el genoma (<i>Genome-wide association studies</i>)
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
H3K4	Acetilación de la histona H3 lisina 4
H4K16	Acetilación de la histona H4 lisina 16
HAT1	<i>Histone Acetyltransferase 1</i>
HATs	Histona acetiltransferasa (<i>Histone acethyltransferase</i>)
HBO1	<i>Lysine Acetyltransferase 7</i>
HC	Hormona del crecimiento
HDACs	Histona deacetilasa (<i>histone deacetylases</i>)
HDMs	Desmetilasas de histonas (<i>Histone desmethylases</i>)
HEI	Herencia epigenética intergeneracional
HET	Herencia epigenética transgeneracional
HFD	Dieta alta en grasas (<i>High fat diet</i>)
HMOF	<i>Lysine Acetyltransferase 8</i>
Hmox1	<i>Heme oxygenase 1</i>
HMTs	Metiltransferasa de histonas (<i>Histone methyltransferases</i>)
HP1	<i>Chromobox 5</i>
HTT	<i>Huntingtin</i>
ID	Índice de discriminación
IGF-1	<i>Insulin-like growht factor</i>
IGFBP-3	<i>Insulin like growht factor binding protein 3</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1β

IL-6	Interleucina 6
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IRE1α	<i>Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1</i>
JARID	<i>Lysine demethylase 5C</i>
JHDM	<i>Lysine demethylase 2B</i>
JMJD	<i>Lysine demethylase 6B</i>
KAT6B	<i>Lysine acetyltransferase 6B</i>
KDM	<i>Lysine demethylase</i>
Keap1	<i>Kelch like ECH associated protein 1</i>
KMT	<i>Lysine methyltransferase</i>
LSD1	<i>Lysine demethylase</i>
m⁶A	Metilación del ARN (<i>N6-methyladenosine</i>)
MAP3K3	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPT	<i>Microtubule associated protein tau</i>
Mcp-1	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
METTL3	Metiltransferasa 3 (<i>Methyltransferase like 3</i>)
miRNAs	microRNAs
MLL	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia</i>
MORF	<i>Lysine acetyltransferase</i>
MOZ	<i>Lysine acetyltransferase</i>
MS4A	<i>Membrane spanning 4-domains A4A</i>
MTF2	<i>Metal response element binding transcription factor 2</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of rapamycin kinase</i>
MWM	Laberinto acuático de Morris (<i>Morris water maze</i>)
MYST	<i>Lysine acetyltransferase 7</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NO66	<i>Histone lysine demethylase NO66</i>
NORT	Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (<i>Novel object recognition test</i>)
NPC1	<i>NPC Intracellular cholesterol transporter 1</i>
NRF2	<i>Factor nuclear de eritroide 2</i>
NSD	<i>Nuclear receptor binding SET domain protein</i>
NT3	<i>Neurotrophin 3</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVN	Ovillos neurofibrilares
p-AMPK	<i>Phosphorylated protein kinase amp-activated catalytic subunit a</i> 1

p-mTOR	<i>Phosphorylated mechanistic target of rapamycin kinase</i>
p-tau	<i>Tau fosforilada (Phosphorilated tau)</i>
P300	<i>E1A Binding Protein P300</i>
PARK2	<i>Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>
PCAF	<i>Lysine acetyltransferase 2B</i>
PERK	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 Alpha Kinase 3</i>
PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-a</i>
PHF	<i>Microtubule associated protein tau</i>
PICALM	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
PINK	<i>PTEN induced kinase 1</i>
PolyQ	<i>Polyglutamine</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
PRDM	<i>PR/SET Domain 14</i>
Pre-ARNm	<i>Precursor de ARN mensajero</i>
pre-miRNAs	<i>miRNAs precursores</i>
Pri-miRNAs	<i>miRNAs primarios</i>
PRMT	<i>Protein arginine methyltransferase 1</i>
PS	<i>Placas seniles</i>
PSEN 1 y 2	<i>Presenilina 1 y 2</i>
RBM15	<i>ARN Binding Motif Protein 15</i>
RDE-1	<i>Defective ARN proteins 1</i>
RE	<i>Retículo endoplasmático</i>
RIN3	<i>Ras and Rab interactor 3</i>
RSV	<i>Resveratrol</i>
SAM	<i>s-adenosil metionina</i>
SAMP	<i>Senescence-accelerated mouse prone</i>
SAMP8	<i>Senescence accelerated mouse prone 8</i>
SAMR	<i>Senescence accelerated mouse resistance</i>
SCN2B	<i>Sodium voltage-gated channel beta subunit 2</i>
SET	<i>SET domain containing 1A, histone lysine methyltransferase</i>
SETD	<i>SET Domain Containing 2, histone lysine methyltransferase</i>
SETMAR	<i>SET Domain and mariner transposase fusion Gene</i>
SIRT1	<i>Sirtuina 1</i>
SIRTs	<i>Sirtuinas</i>
SM	<i>Síndrome metabólico</i>
SMYD1	<i>SET and MYND domain containing 1</i>
SN	<i>Sistema nervioso</i>

SNC	Sistema nervioso central
SNPs	Polimorfismos de un único nucleótido (<i>Single-nucleotide polymorphism</i>)
SOD	Superóxido dimutasa
SORL1	<i>Sortilin related receptor 1</i>
SUV39H1	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>
SUV420H1	<i>Lysine Methyltransferase 5B</i>
SUZ12	<i>SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
TBK1	<i>TANK binding kinase 1</i>
TDP-43	<i>Transactivation response ADN binding protein 43</i>
TET	<i>Ten-eleven translocation</i>
TG	Triglicéridos
TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
Tip60	<i>Lysine acetyltransferase 5</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TREM	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2</i>
TrkA	<i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1</i>
TrkB	<i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2</i>
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded protein response</i>)
UTX	<i>Lysine demethylase 5A</i>
UTY	<i>Histone demethylase UTY</i>
VIRMA	<i>Vir Like M6A methyltransferase associated</i>
WAGO	<i>Worm-specific AGO proteins</i>
WTAP	<i>WT1 associated protein</i>
YTHDC	<i>YTH domain containing 1</i>
YTHDF	<i>YTH N6-methyladenosine ARN binding protein</i>
ZC3H13	<i>Zinc Finger CCCH-type containing 13</i>

RESUMEN

Factores ambientales como el ejercicio, el estrés o la dieta contribuyen a la patogénesis de enfermedades asociadas al deterioro cognitivo y al envejecimiento, modulando mecanismos de expresión génica que son susceptibles de modificarse y de ser heredados a la descendencia. Este proceso se conoce como herencia epigenética y juega un papel importante en la etiología del envejecimiento patológico. Por un lado, en las últimas décadas se ha producido un aumento de esperanza de vida en la población mundial, pero, por otro lado, se ha visto incrementada la prevalencia de enfermedades asociadas con la edad que cursan con deterioro de las funciones cognitivas como, la memoria, el aprendizaje, que impiden la autonomía de la persona y, finalmente, la muerte. Debido a esto ha aumentado el interés por el estudio de la etiología de las enfermedades neurodegenerativas y las posibles dianas terapéuticas.

Los factores ambientales a los que un individuo ha estado expuesto a lo largo de su vida, como por ejemplo una dieta alta en grasas (HFD) predispone, junto a los factores genéticos y su interacción, a un envejecimiento prematuro y a enfermedades como la obesidad o síndrome metabólico (SM) que, a su vez, son factor de riesgo de las enfermedades neurodegenerativas, es más, predisponiendo a la descendencia a procesos de neurodegeneración. Los cambios epigenéticos producidos por un factor ambiental al cual ha sido expuesto de manera directa y que tienen un efecto en el fenotipo se le conoce como herencia epigenética intergeneracional (HEI), mientras que, si los cambios epigenéticos se mantienen en las siguientes generaciones, las cuales han sido expuestas indirectamente al factor causal se le denomina herencia epigenética transgeneracional (HET).

Una dieta rica en polifenoles, como el resveratrol (RSV) contribuye a un envejecimiento sano, regulando mecanismos moleculares y cognitivos implicados en la neurodegeneración. El RSV es un fitoalexina de la familia de los estilbenos

presente en una gran variedad de plantas y alimentos como las uvas, cacahuetes, frutos rojos, el chocolate, el té o el vino tinto. Se caracteriza por tener un efecto pleiotrópico, es decir, de tener múltiples beneficios como su efecto antienvjecimiento, antioxidante, antiinflamatorio, antidiabético, antiobesidad y neuroprotectora gracias a su acción en diferentes vías moleculares implicadas en el proceso de envejecimiento como el estrés oxidativo (EO), la inflamación, disfunción sináptica, que conjuntamente, provocan muerte neuronal y deterioro cognitivo.

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto neuroprotector de una dieta materna rica en RSV en la descendencia adulta del modelo de ratón con senescencia acelerada (SAMP8) en relación con los mecanismos moleculares y cognitivos que subyacen a el proceso de envejecimiento. Además, estudiar los cambios epigenéticos producidos por el RSV y su efecto sobre mecanismos de senescencia en la primera y segunda generación (F1 y F2, respectivamente). También, demostrar que el RSV protege ante la exposición a una HFD materna y que es capaz de revertir el daño producido por la misma en ambas generaciones.

Los resultados de esta investigación demuestran que el consumo de una dieta materna rica en RSV antes del embarazo produce cambios en la maquinaria epigenética en genes implicados en el deterioro cognitivo y envejecimiento como; el EO, la neuroinflamación, la biogénesis mitocondrial, la autofagia y el estrés del retículo endoplasmático (ERE), promoviendo un efecto neuroprotector a través de las generaciones F1 y F2 del modelo murino SAMP8. Por tanto, el RSV mostró un efecto neuroprotector a través de la HET. Además, se demostró que el RSV es capaz de proteger del daño producido por el consumo de una HFD materna en las siguientes generaciones destacando el efecto intergeneracional en la F1 sobre marcadores asociados a la neuroinflamación, SM, metabolismo energético y plasticidad sináptica a través de cambios producidos en la maquinaria epigenética, previniendo el deterioro cognitivo en la descendencia del modelo murino SAMP8.

En conclusión, en este estudio se demostró el efecto neuroprotector de una dieta materna rica en RSV en la prevención del deterioro cognitivo asociado a la edad en la descendencia, además del riesgo de una HFD en la manifestación del SM, que promueve un envejecimiento prematuro en la descendencia adulta del ratón SAMP8. Finalmente, se ha demostrado la importancia de los mecanismos epigenéticos y la dieta a través de la herencia transgeneracional como dianas terapéuticas ante el envejecimiento patológico.

ABSTRACT

Multiple environmental factors, such as exercise, stress or diet contribute to the pathogenesis of diseases associated with cognitive deterioration and aging by modulating gene expression mechanisms that are susceptible to modification and to be inherited to the offspring. This process is known as epigenetic inheritance and plays an important role in the etiology of the pathological aging process. On the one hand, in recent decades there has been an increase in life expectancy in the world population. On the other hand, the prevalence of diseases associated with age and cognitive decline has increased. Specifically, memory and learning impairment, which impede the autonomy of the person and, finally, causing death. Due to this, interest in the study of the etiology of neurodegenerative diseases (NDs) and possible therapeutic targets has increased.

The environmental factors to which an individual has been exposed throughout his life, such as a high fat diet (HFD) predisposes, together with genetic factors and their interaction, to a premature aging and diseases. For example, obesity or metabolic syndrome (MS) which, in turn, are a risk factor for NDs. Moreover, predisposing the offspring to pathological aging. Epigenetic changes produced by an environmental factor to which it has been indirectly exposed, and which influence the phenotype is known as intergenerational epigenetic inheritance (IEI), while, if epigenetic changes are maintained in subsequent generations, the which are not exposed to the causal factor is called transgenerational epigenetic inheritance (TEI).

A diet rich in polyphenols, such as resveratrol (RSV) contributes to healthy aging, regulating molecular and cognitive mechanisms that trigger EN. RSV is a phytoalexin from the stilbene family present in a wide variety of plants and foods (grapes, peanuts, red fruits, chocolate, tea or red wine). It is characterized by having a pleiotropic effect, that is, with beneficial effects, such as its anti-aging, antioxidant,

anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-obesity, and neuroprotective effect. This is due to its action on multiple molecular pathways involved in the aging process, for example, oxidative stress (OS), inflammation, synaptic dysfunction, triggering neuronal death and ultimately cognitive decline.

The objective of this study was to investigate the neuroprotective effect of a maternal diet rich in RSV in the adult offspring of the mouse model named senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) in relation to the molecular and cognitive mechanisms that underlie the process of aging. Also, the epigenetic changes produced by RSV preventing cognitive deterioration and senescence mechanisms in the first and second generation (F1 and F2, respectively). In addition, to showing the protective effect of RSV against exposure to a maternal HFD and that it can reverse the damage produced by it in both generations.

The results of this research show that the consumption of a maternal diet rich in RSV before pregnancy produces changes in the epigenetic machinery in genes involved in cognitive decline and aging; EO, neuroinflammation, mitochondrial biogenesis, autophagy and ERS, promoting a neuroprotective effect through the F1 and F2 generations of the SAMP8 mouse. Therefore, RSV shows a neuroprotective effect through TEI. In addition, it was shown that RSV can protect against the damage produced by the consumption of a maternal HFD in the following generations, highlighting the intergenerational effect in F1 on markers associated with neuroinflammation, MS, energy imbalance, synaptic plasticity. These changes produced in the epigenetic machinery preventing cognitive decline in the offspring of SAMP8 mice.

In conclusion, this study demonstrated the neuroprotective effect of a maternal diet rich in RSV in the prevention of cognitive deterioration associated with age in the offspring, in addition, to the risk of an HFD in the manifestation of MS, which promotes premature aging in the adult offspring of the SAMP8 mouse.

Finally, the importance of epigenetic mechanisms and diet through IET have been demonstrated as therapeutic targets in the face of pathological aging.

DESARROLLO DE LA TESIS

Esta tesis comienza con una **introducción** general en la que se tratarán los conceptos más importantes para llegar a comprender y contextualizar los estudios que forman esta tesis doctoral, destacando los conceptos de envejecimiento, herencia epigenética y dieta. Posteriormente, se presentan los **objetivos** planteados en esta tesis antes de iniciar la investigación. Seguidamente, se han incluido los dos artículos publicados durante el periodo de doctorado, los cuales se presentan en el apartado de **métodos y resultados**, ambos publicados en revistas científicas. El **primer estudio** se centra en investigar el efecto de una dieta materna rica en RSV a lo largo de dos generaciones en un modelo de ratón con senescencia acelerada. El **segundo estudio** trata de demostrar el efecto de una dieta materna rica en RSV y si esta es capaz de revertir el daño que ocasiona una HFD en dos generaciones posteriores en un modelo de ratón con senescencia acelerada. Tras presentar los resultados de la tesis, encontramos la **discusión** en la que se relacionan todos los hallazgos al mismo tiempo que se contextualizan con otros estudios publicados en bases de datos científicas. Por último, las **conclusiones** extraídas de esta tesis y que contestan a los objetivos planteados al inicio y la **bibliografía** consultada para el desarrollo de la tesis.

Las publicaciones que forman esta tesis doctoral son:

Publicación 1

• **Izquierdo, V.**, Palomera-Ávalos, V., López-Ruiz, S., Canudas, A. M., Pallàs, M., & Griñán-Ferré, C. (2019). Maternal resveratrol supplementation prevents

cognitive decline in senescent mice offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1134.

Publicación 2

• **Izquierdo, V.**, Palomera-Ávalos, V., Pallàs, M., & Griñán-ferré, C. (2021). Resveratrol supplementation attenuates cognitive and molecular alterations under maternal high-fat diet intake: multigenerational epigenetic inheritance. *International Journal of Molecular Science*, 22(1453).

Por un lado, durante el periodo de tesis doctoral se realizó una **estancia internacional** en la Universidad de Guadalajara (México) en la que pude ampliar mis conocimientos en relación con otra enfermedad neurodegenerativa denominada Niemann Pick y ayudar en el bioanálisis informático de diferentes miRNAs asociadas con esta patología. A raíz de esta colaboración, actualmente se está trabajando en la publicación de una revisión sobre el tema.

Por otro lado, junto con las dos principales publicaciones que conforman esta tesis doctoral, también se publicaron otros trabajos científicos relacionados con el RSV y el envejecimiento con otros miembros del grupo de investigación de la Dra. Mercè Pallàs y el Dr. Christian Griñán Ferré. El contenido de estas publicaciones no esta incluido en esta tesis, pero han sido una referencia importante para su desarrollo.

• Griñán-Ferré, C., **Izquierdo, V.**, Otero, E., Puigoriol-Illamola, D., Corpas, R., Sanfeliu, C., Ortuño-Sahagún, D., & Pallàs, M. (2018). Environmental enrichment

improves cognitive deficits, AD hallmarks and epigenetic alterations presented in 5xFAD mouse model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 224.

- Griñán-Ferré, C., Bellver-Sanchis, A., **Izquierdo, V.**, Corpas, R., Roig-Soriano, J., Chillón, M., Andres-lacueva, C., Somogyvári, M., Söti, C., Sanfeliu, C., & Pallàs Lliberia, M. (2021). The pleiotropic neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: from antioxidant to epigenetic therapy. *Aging Research Reviews*, 67(101271).

- Palomera-Ávalos, V., Griñán-Ferré, C., **Izquierdo, V.**, Camins, A., Sanfeliu, C., Canudas, A. M., & Pallàs, M. (2018). Resveratrol modulates response against acute inflammatory stimuli in aged mouse brain. *Experimental Gerontology*, 102, 3–11.

- Palomera-Avalos, V., Griñán-Ferré, C., **Izquierdo, V.**, Camins, A., Sanfeliu, C., & Pallàs, M. (2017). Metabolic stress induces cognitive disturbances and inflammation in aged mice: protective role of resveratrol. *Rejuvenation Research*, 20(3), 202–217.

Además de una colaboración con los dos directores de esta tesis en un capítulo de libro sobre el RSV:

- Griñán-Ferré, C., **Izquierdo, V.**, & Pallàs, M. (2020). Dietary antioxidants, epigenetics, and brain aging: A focus on resveratrol. In *Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases* (pp. 343–357).

A lo largo del doctorado se han presentado los resultados en diferentes congresos en formato poster con el objetivo de comunicar e intercambiar conocimiento con la comunidad científica a nivel nacional:

• Palomera-Ávalos, V; Griñán-Ferré, C; **Izquierdo, V**; Sanfeliu, C and Pallàs, M. High Fat dietary cognitive disturbances in aged mice are mediated by inflammation and Wnt pathway alteration: neuroprotective mechanisms of resveratrol. X symposium of Neurobiology of the Catalan Society of Biology. 6-7 October 2016. Institute of Catalan Studies. Barcelona (Spain).

• Palomera-Ávalos, V; Griñán-Ferré, C; **Izquierdo, V**; Caballero-Román, A and Pallàs, M. Inter- and transgenerational epigenetic effects induced by resveratrol on, neuroinflammation and memory in SAMP8. 17th Congress of the Spanish Society of Neuroscience. 27-30 September 2017. Alicante (Spain).

• **Izquierdo, V**; Palomera-Ávalos, V; Griñán-Ferré, C and Pallàs, M. Maternal dietary supplementation with resveratrol prevents cognitive impairment in offspring of SAMP8 mice model: role for epigenetic changes and oxidative stress. Symposium Nutrition for the aging brain: moving towards clinical applications by ILSI Europe International Life Science Institute. 30-31 September 2018. Madrid (Spain).

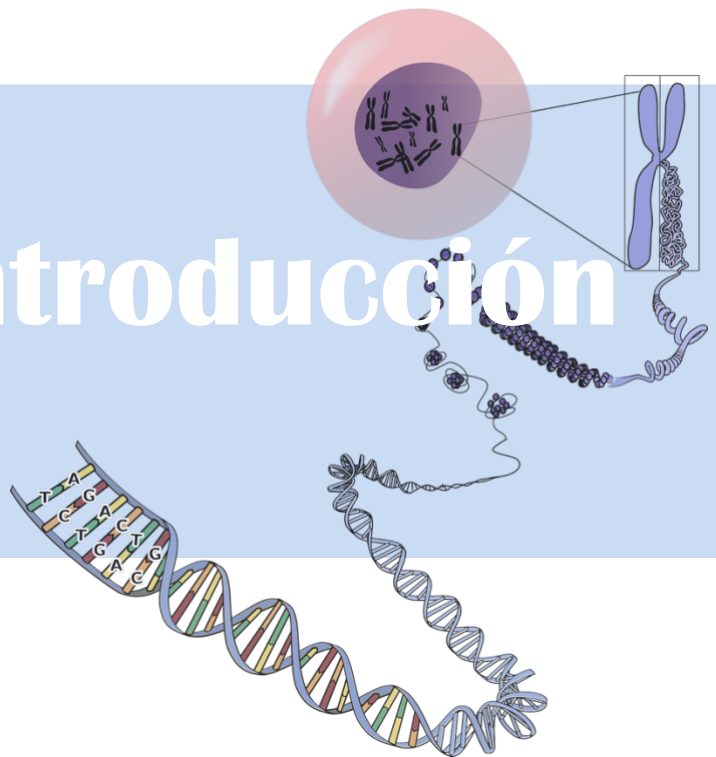
• **Izquierdo, V**; López-Ruiz, S; Palomera-Ávalos, V; Griñán-Ferré, C and Pallàs, M. Transgenerational epigenetic inheritance of resveratrol diet prevents cognitive impairment through epigenetic changes and oxidative stress in offspring of SAMP8 mice model. At the Symposium of Neurobiology. 12-13 November 2018. Institute of Catalan Studies. Barcelona (Spain).

• **Izquierdo, V**; Palomera-Ávalos, V; Pallàs, M and Griñán-Ferré, C. Differential microRNAs expression profile in the hippocampus of senescent mice offspring induced by maternal resveratrol supplementation. IX Symposium of Chromatin and Epigenetic of Catalan Society of Biology, 22 March 2019. Institute of Catalan Studies. Barcelona (Spain).

E internacional:

• **Izquierdo, V**; Pallàs, M; Palomera-Ávalos, V and Griñán-Ferré, C. Epigenetic changes elicited by maternal high fat diet in offspring and the protective effect of resveratrol enriched diet. LXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. 13-15 November 2020. Guadalajara (México).

1. Introducción



1.1. Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso biológico irreversible asociado con el deterioro fisiológico, tanto físico como cognitivo, dependiente del paso del tiempo y que afecta a todos los organismos vivos a diferentes niveles tanto molecular, celular, tisular y a nivel de organismo. Dicho deterioro provoca que los organismos envejecidos sean frágiles y susceptibles de padecer enfermedades e incluso a la muerte (Booth & Brunet, 2016; Lemoine, 2020). El declive cognitivo es una condición característica del proceso de envejecimiento (Jessen et al., 2020). Sin embargo, según su intensidad dará lugar a un envejecimiento normal o patológico.

En primer lugar, el envejecimiento normal es un proceso inherente a los seres humanos que conlleva a una serie de cambios que se manifiestan de manera progresiva y desigual entre los individuos (Binotti et al., 2009). Esto es debido a que es un proceso complejo y dependiente de múltiples factores, ya sean fisiológicos, psicológicos, historia de vida o el contexto socioeconómico (Foster et al., 2018). Uno de los principales cambios se produce en las funciones cognoscitivas, es decir, se produce un enlentecimiento en el procesamiento de la información, disminución de la capacidad atencional, declive en algunos aspectos de la memoria y de las funciones ejecutivas (Isaev et al., 2018; Toepper, 2017). Sin embargo, este deterioro no es global ya que, existen funciones que se van deteriorando a lo largo del tiempo, otras quedan igual y otras incluso mejoran con la edad (Binotti et al., 2009)

En segundo lugar, el envejecimiento patológico se caracteriza por una mayor alteración de las funciones cognitivas y fisiológicas desencadenando finalmente en patologías. A nivel cognitivo podemos distinguir dos niveles de gravedad: alteración leve de las funciones cognitivas básicas que no impiden el desarrollo de las actividades de la vida diaria ni comprometen la autonomía del individuo (deterioro cognitivo leve, DCL), y alteración de mayor intensidad de las funciones

cognitivas que impiden la realización de las actividades básicas de la vida diaria además de la autonomía (deterioro cognitivo mayor, DCM) (Asociación Americana de psiquiatría, 2014).

El desarrollo de un tipo u otro de envejecimiento depende de múltiples factores que hacen que en cada individuo sea un proceso único debido a la variabilidad presente en su resiliencia y reserva cognitiva (Binotti et al., 2009). Factores como la educación, la inteligencia, la estimulación cognitiva, el ejercicio físico y la dieta ayudan a que el cerebro se adapte al daño fisiológico, activando mecanismos compensatorios y de plasticidad para poder retardar el proceso de neurodegeneración (Law et al., 2020; Fleck et al., 2019; Bettio et al., 2017; Clare et al., 2017).

1.1.1. Características del envejecimiento

Como ya se ha mencionado antes, en las últimas décadas, un gran número de estudios se han enfocado en investigar el desgaste o deterioro celular y molecular resultado del envejecimiento (Dodig et al., 2019; Janssens & Veenhoff, 2016). Se han descrito nueve marcadores que determinan el fenotipo envejecido (Figura 1) (López-Otín et al., 2013a). Este se describe como un proceso dependiente del tiempo cuyo mecanismo principal es la acumulación del daño celular a lo largo del tiempo y que dicha acumulación conformaría la causa general del envejecimiento (Guerville et al., 2020; López-Otín et al., 2016). Cada marcador debe seguir tres criterios imprescindibles (López-Otín et al., 2013a):

- I. Debe manifestarse durante el envejecimiento normal.
- II. Su agravamiento experimental debe acelerar el proceso normal de envejecimiento.
- III. Y su mejora experimental debe retardar el proceso normal de envejecimiento y, por consiguiente, incrementar saludablemente la esperanza de vida.

Los nueve marcadores del envejecimiento se pueden reagrupar en 3 categorías: primarios, antagónicos e integrativos.



Figura 1. Marcadores del envejecimiento. Los nueve marcadores moleculares que actúan conjuntamente a lo largo de la vida desencadenando los procesos de envejecimiento (López-Otín et al., 2013).

1) Marcadores primarios: son mecanismos que producen consecuencias negativas.

Inestabilidad genómica

El daño en el genoma se va acumulando con la edad ante la exposición a factores intrínsecos y extrínsecos que promueven la inestabilidad genómica. Ésta es debida a un desajuste entre el daño del material genómico y su capacidad de reparación de dos maneras: 1) a través de la acumulación del daño del ácido desoxiribonucleico (ADN) nuclear y mitocondrial (ADNmt); y 2) la desregulación del ácido ribonucleico (ARN) y el transcriptoma (Guerville et al., 2020; López-Otín et al., 2016).

Desgaste de los telómeros

Existen regiones cromosómicas más susceptibles que otras de presentar daños en la estructura del ADN a lo largo del tiempo como, por ejemplo, los telómeros (región terminal de los cromosomas). Las telomerasa son polimerasas de ADN que se encargan de que el proceso de replicación del ADN se lleve a cabo correctamente en la región terminal cromosómica (Zhu et al., 2019). No obstante, se llegan a producir errores que provocan una pérdida de los telómeros, o incapacidad de reparar el daño, acelerando la senescencia celular (Guerville et al., 2020; López-Otín et al., 2016).

Alteraciones epigenéticas

A lo largo de la vida se van produciendo una serie de alteraciones en los patrones de metilación del ADN (5-mC), modificaciones postraduccionales de las histonas y la remodelación de la cromatina, además de sus enzimas (Guerville et al., 2020). Existe evidencia sobre la asociación entre algunas modificaciones epigenéticas y el envejecimiento como: el incremento de la acetilación de la histona H4 lisina 16 (H4K16), la trimetilación de la H4K20 o la trimetilación de la histona H3 lisina 4 (H3K4) (López-Otín et al., 2013).

Pérdida de proteostasis

El envejecimiento y las enfermedades asociadas están relacionadas con una alteración de la homeostasis proteica o proteostasis (López-Otín et al., 2016). Estos mecanismos implican el mantenimiento, recuperación de las estructuras proteicas y la degradación de proteínas dañadas a través de los sistemas ubiquitina-proteosoma y las vías lisosomales (autofagia) (Guerville et al., 2020). Ambos sistemas trabajan coordinadamente para prevenir la acumulación de proteínas dañadas que impidan el correcto funcionamiento celular. La alteración de ambos

sistemas se asocia con el proceso de envejecimiento y patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Guerville et al., 2020).

2) Marcadores antagónicos: tienen efectos opuestos dependiendo de su intensidad. A bajos niveles son beneficiosos, pero a altos niveles y prolongados en el tiempo llegan a ser muy perjudiciales.

Desregulación de la detección de nutrientes

El eje somatotrófico en mamíferos está formado por la hormona del crecimiento (HC) producida por la glándula pituitaria anterior y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), la cual es liberada en respuesta a la HC en diversos tipos celulares (Guerville et al., 2020). Este eje informa a las células de la presencia de glucosa y juntos conforman la vía de señalización de insulina e IGF-1. Esta vía de detección de energía y nutrientes está asociada al proceso de envejecimiento. Marcadores como la HC, la proteína AKT, mTOR, FOXO, la proteína quinasa AMPK y Sirtuina 1 (SIRT1) están asociados a la longevidad del organismo, estableciendo un enlace entre los mecanismos bioenergéticos y el proceso de envejecimiento (Falcón et al., 2019; Stallone et al., 2019).

Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

En células y organismos envejecidos, la eficiencia de la cadena respiratoria va disminuyendo por el incremento de la fuga de electrones y la reducción en la generación de adenosina trifosfato (ATP) (López-Otín et al., 2013). Al mismo tiempo, se produce el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) como consecuencia del daño mitocondrial, lo que finalmente comportaría la muerte celular (Liguori et al., 2018; Guillaumet-Adkins et al., 2017). Otros mecanismos implicados son: el incremento de la permeabilidad mitocondrial en respuesta al estrés oxidativo (EO), la activación de sistema inflamatorio favoreciendo la permeabilidad mediante la activación del inflamasoma (Srivastava, 2017) y la alteración de la señalización celular entre estructuras como la mitocondria y el retículo endoplasmático (RE) (López-Otín et al., 2013).

Senescencia celular

La senescencia celular es la detención estable del ciclo celular junto con cambios fenotípicos estereotipados. En otras palabras, las células dejan de dividirse cuando han acumulado demasiados daños para evitar que éstos se propaguen (Faragher et al., 2017). Este proceso es causado por el desgaste de telómeros a través del tiempo, por daños no teloméricos en el ADN. Finalmente, en organismos envejecidos se produce un aumento de la acumulación de células con senescencia lo cual llevaría a un aumento del daño celular, incapacidad de regenerar y producir células progenitoras (López-Otín et al., 2013).

3) Marcadores integrativos: estos afectan directamente a la homeostasis de los tejidos y su funcionamiento.

Agotamiento de las células madre

Una de las características más evidentes asociadas con la edad es la afectación de la capacidad regenerativa de los tejidos. En individuos envejecidos se produce una disminución de la actividad del ciclo celular de las células madre hematopoyéticas (de Haan & Lazare, 2018; Leins et al., 2018; Guidi et al., 2017). Esto correlaciona con la acumulación progresiva del daño en el ADN y el desgaste de telómeros (López-Otín et al., 2013). Además, la reactivación de las células madre puede revertir el proceso de senescencia (Guidi et al., 2017; Mu et al., 2017).

Alteración de la comunicación intracelular

Además de las alteraciones a nivel intracelular durante el envejecimiento, también se muestran a nivel de comunicación intercelular, ya sea de tipo endocrino, neuroendocrino o neuronal. Las alteraciones a nivel de comunicación intercelular tienden a estar afectadas en el envejecimiento, lo que lleva a un aumento de la inflamación y EO. Todo esto, provoca una afectación mecánica y funcional de los tejidos (Guerville et al., 2020; López-Otín et al., 2016).

A su vez, estas tres categorías estarían interrelacionadas. Es decir, los marcadores primarios son los daños que se dan inicialmente y que con el tiempo se van acumulando (López-Otín et al., 2016). Los marcadores antagónicos son los que se iniciarían como respuesta a los primarios para contrarrestar los efectos en un primer momento, pero con la acumulación del daño producido por los primarios estos se vuelven crónicos promoviendo y acelerando el daño de los primarios. Por último, los integrativos aparecen cuando los primarios y los antagónicos están produciendo daño al mismo tiempo y ya no hay forma de regularlos por mecanismos homeostáticos tisulares (López-Otín et al., 2016).

1.2. Deterioro cognitivo y enfermedades neurodegenerativas

1.2.1. Epidemiología y comorbilidad de las enfermedades neurodegenerativas

La esperanza de vida ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, por lo que, la población mundial ha envejecido considerablemente según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Envejecimiento y ciclo de vida, OMS, 2021). Se ha estimado que entre el 2000 y el 2050 la proporción de habitantes del planeta mayores de 60 años se duplicará, llegando a ser de entre el 11% al 22% (Kanasi et al., 2016). Estos datos evidencian un gran logro de la humanidad al aumentar la esperanza de vida gracias a la mejora de la calidad de vida y al avance de la ciencia. No obstante, todos estos cambios también están produciendo el aumento de diferentes enfermedades asociadas al envejecimiento y con ello la necesidad de aumentar los recursos pertinentes para mejorar la asistencia de las personas mayores (Envejecimiento y ciclo de vida, OMS, 2021).

El riesgo de padecer enfermedades, especialmente de enfermedades neurodegenerativas va en aumento. Se ha estimado que el número de personas con demencia a nivel mundial incrementará a 131.5 millones en 2050 (Sengoku, 2020). Las enfermedades neurodegenerativas como la EA aumentarán considerablemente llegando a un 25- 30% de las personas mayores de 85 años (Envejecimiento y ciclo de vida, OMS, 2021).

El envejecimiento y el proceso de neurodegeneración están estrechamente relacionados siendo el principal factor de riesgo para las enfermedades neurodegenerativas (Hou et al., 2019), de hecho, se ha estimado que el 70% de las personas mayores de 75 años presentan alguna enfermedades neurodegenerativas (Hou et al., 2019; Vermunt et al., 2019). Además, el proceso de envejecimiento ha sido descrito como uno de los principales factores de riesgo de diferentes enfermedades como la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, la osteoporosis, el cáncer y el SM, asociadas al mismo tiempo con las enfermedades neurodegenerativas (Booth & Brunet, 2016).

La prevalencia de una enfermedad a nivel mundial depende de múltiples variables como la edad, el sexo, el nivel de educación, los criterios y pruebas diagnósticas, el estilo de vida, la dieta o el ejercicio (Lopez & Kuller, 2019). Todas estas variables explicarían las diferencias existentes en la población mundial (Lopez & Kuller, 2019). Incluso varía mucho entre continentes. Por ejemplo, se ha estimado una prevalencia de personas con enfermedades neurodegenerativas a partir de los 60 años de un 4,7% en Europa central y un 8,5% en América Latina. En cambio, la prevalencia es mucho menor en Nigeria (1.4%) y en la India rural (1,1%) (Lopez & Kuller, 2019). Además, destaca la diferencia en la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas en países más industrializados y menos. Concretamente, en personas mayores de 60 años, un 58% de los individuos con alguna enfermedades neurodegenerativas vive en países con ingresos medios-

bajos y se estima que esta proporción aumentará a un 71% en 2050 (Lopez & Kuller, 2019). No obstante, su prevalencia se duplica cada 5 años en los individuos de entre 65 y 85 años y continua incrementándose a partir de los 90 años (Lopez & Kuller, 2019).

1.2.2. El proceso de deterioro cognitivo

Las enfermedades neurodegenerativas son aquellas que provocan un deterioro y muerte celular acelerada que provoca la degeneración del sistema nervioso (SN). Lo conforman un amplio rango de trastornos que van desde enfermedades que presentan una alteración principalmente motora (esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ataxia de Friedich, o la atrofia muscular espinal) a enfermedades que llevan a un deterioro de las capacidades cognitivas superiores como la EA o la enfermedad de Huntington (EH). Estas últimas se engloban en los denominados trastornos neurocognitivos en el ámbito clínico (Wahl et al., 2019; Asociación Americana de Psiquiatría, 2014).

A lo largo del tiempo ha sido necesario ir acotando cada vez más dentro del espectro clínico de las enfermedades neurodegenerativas. Este va desde el estado cognitivo de normalidad del paciente hasta el estado patológico pasando por un deterioro cognitivo progresivo (Wahl et al., 2019). Se ha dado, por tanto, una mejora en la identificación del progreso del deterioro cognitivo y la definición del estadio en el que se encuentra el paciente (Wahl et al., 2019).

Por lo que, en un estadio previo a la demencia, en el que los déficits cognitivos son sutiles y el paciente es capaz de distinguir de su estado cognitivo normal anterior, pero que dichas alteraciones no llegan a interferir en la vida diaria del paciente se le denomina DCL (Cheng et al., 2017). Este criterio no solo contempla el deterioro de la memoria, sino que también tiene en cuenta el resto de las funciones cognitivas. Se ha clasificado el DCL en tres subtipos (Cheng et al., 2017):

- Amnésico.
- De múltiples dominios.
- Y de afectación de un solo dominio que no sea memoria.

Investigaciones previas han asociado el DCL amnésico con un mayor riesgo de padecer demencia tipo EA y se estima que un 15% de los ancianos presentará DCL (Wahl et al., 2019; Cheng et al., 2017). No obstante, algunas personas pueden presentar un deterioro inicial y no llegar a desarrollar demencia o incluso volver a la normalidad (Wahl et al., 2019).

Por último, tendríamos la etapa final caracterizada por un DCM o demencia en la que se manifiesta una alteración grave de la memoria, además de síntomas psicológicos y del comportamiento asociados a la demencia (BPSD) (Cloak & Al Khalili, 2020). Estos BPSD van desde alteraciones cognitivo/perceptuales (afasia, apraxia, agnosia, funciones ejecutivas, delirios, alucinaciones), emocionales (ansiedad, depresión, apatía, anhedonia, irritabilidad), motoras (alteración del equilibrio, movimientos repetitivos), verbales (gritos o habla repetitiva) hasta sintomatología vegetativa (alteración del sueño y del apetito) (Cloak & Al Khalili, 2020). Además, dichas alteraciones interfieren de manera importante en las actividades de la vida diaria, agravándose en la etapa final hasta la muerte del individuo (Mazzeo et al., 2019). Los BPSD se consideraban como una consecuencia de la pérdida de memoria (Baeta-Corral et al., 2018). No obstante, se ha observado que dicha sintomatología tiene su propia relevancia en el proceso de demencia (Baeta-Corral et al., 2018). Los BPSD son un conjunto heterogéneo de trastornos que aparecen en el 50-80% los casos de enfermedades neurodegenerativas, de etiología multifactorial y empeoran el pronóstico del paciente (Cloak & Al Khalili, 2020). Por tanto, la demencia no es una enfermedad *per se*, sino un conjunto de síntomas comunes en diferentes tipos de demencia (EA, enfermedad de Parkinson,

etc) caracterizados por alteraciones psicológicas y del comportamiento (Cloak & Al Khalili, 2020).

1.2.3. Factores de riesgo y protectores del deterioro cognitivo

El deterioro cognitivo al ser un proceso heterogéneo y único se debe tener en cuenta los factores, tanto de riesgo como protectores, de cada individuo siendo el envejecimiento el principal factor de riesgo para manifestar enfermedades neurodegenerativas (Figura 2) (Berson et al., 2018). Por ejemplo, factores genéticos que aumentan el riesgo de padecer EA incluyen: la presencia del alelo del gen de la *Apolipoproteína E isoforma ε4 (ApoEε4)*, mutaciones en genes como la *proteína precursora de amiloide (APP)*, la *presenilina 1 (PSEN1)* y la *presenilina 2 (PSEN2)*, entre otros. Factores ambientales asociados al estilo de vida como el tabaco, el ejercicio y la dieta o, finalmente, la presencia de otras patologías de riesgo como las enfermedades cardiovasculares, diabetes u obesidad también incrementan el riesgo (Erkkinen et al., 2018).

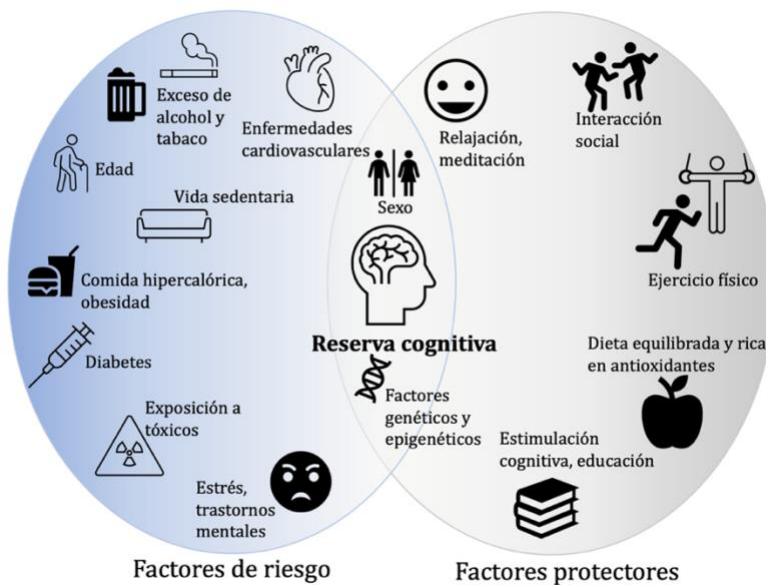


Figura 2. Factores del estilo de vida que modulan el proceso de envejecimiento. A la izquierda se presentan los factores de riesgo que ante su exposición se puede dar un envejecimiento prematuro y predisponer a las enfermedades neurodegenerativas. A la derecha los factores protectores que pueden prevenir un mayor deterioro cognitivo durante el envejecimiento e incluso prevenir las enfermedades neurodegenerativas y en el centro los factores que pueden tener ambos efectos (Vinicius et al., 2019; Wahl et al., 2019).

Otros mecanismos implicados en el origen y progresión de las enfermedades neurodegenerativas son las alteraciones moleculares asociadas con la neuroinflamación, el EO, autofagia y estrés del retículo endoplasmático (ERE). (Tan & Norhaizan, 2019).

El EO juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento como son las enfermedades neurodegenerativas. Las especies reactivas de nitrógeno y las ERO son productos continuos del metabolismo energético y el metabolismo oxidativo (Tan & Norhaizan, 2019). Su acumulación daña diferentes macromoléculas como el ADN, proteínas o lípidos de membrana (Tan & Norhaizan, 2019). A medida que aumentan los niveles de ERO aumentan los mecanismos proinflamatorios. El sistema nervioso central (SNC) es altamente sensible a ambos procesos que, con el tiempo, producen la muerte neuronal (Tan & Norhaizan, 2019). Paralelamente, la cronicidad de éstos se asocia con la acumulación de proteínas aberrantes en el cerebro, lo que agrava aún más la situación. Los mecanismos de proteostasis se encargan de mantener en equilibrio el conjunto de proteínas funcionales (proteoma). Su alteración se asocia al envejecimiento, llevando a la acumulación de proteínas mal plegadas que impiden el correcto funcionamiento de la célula. Este desbalance provoca alteraciones en las conexiones neuronales, reduciendo su funcionamiento. En este punto el RE juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis celular. Dicho orgánulo celular es vital para el mantenimiento de la biosíntesis y transporte proteico. Además, su respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) es crucial para evitar su acumulación, y en consecuencia, el daño y muerte celular (Cheon et al.,

2019; Filfan et al., 2017). Hay tres vías implicadas en la UPR: la proteína PERK, ATF6 y la IRE1 α (Liu et al., 2020). En el caso en el que se encuentre un exceso de proteínas aberrantes, EO e inflamación, se activa el mecanismo de UPR bajo condiciones de ERE, mayormente activado en organismos envejecidos (Wang et al., 2017). En un primer momento, esta respuesta es positiva para la célula, ya que intenta restaurar la normalidad, no obstante, tras su activación continuada produce un aumento de mecanismos de neuroinflamación y EO que impiden restaurar la célula (Wang et al., 2017). Asociado al mecanismo de la UPR están los procesos de autofagia implicados en la degradación, eliminación de orgánulos y proteínas dañadas. Dicho proceso está alterado en pacientes con EA (Wang et al., 2017). Por tanto, todos estos mecanismos moleculares se encuentran alterados provocando el deterioro cognitivo durante el envejecimiento patológico (Wang et al., 2017).

Factores de riesgo asociados al estilo de vida como el consumo de alcohol, el estrés crónico o una dieta alta en grasas (HFD) se asocian con un efecto acelerador del envejecimiento (Vinicius et al., 2019; Wahl et al., 2019). Por ejemplo, la exposición a una HFD materna durante el desarrollo embrionario promueve la acumulación de tejido adiposo y, consecuentemente, aumenta los niveles de leptina, afectando al desarrollo del SNC, acelerando el proceso de envejecimiento de la descendencia (Moody et al., 2017b). Concretamente, la leptina es una hormona liberada principalmente por los adipocitos que regula la ingesta y el peso corporal, uniéndose a los receptores de leptina presentes en el hipotálamo, hipocampo y corteza cerebral (Di Spiezio et al., 2018; Moody et al., 2017b). Además, sus receptores se expresan en el cerebro fetal de forma temprana, promoviendo su desarrollo en el útero (Gustafson et al., 2019). No obstante, los ratones con hiperleptinemia, inducida por una HFD materna, presentan alteraciones en la memoria y transmisión sináptica, por lo que, una HFD materna es un factor de riesgo para la salud de la descendencia (Moody et al., 2017b).

En relación con los factores protectores, un concepto importante es la reserva cognitiva (Mazzeo et al., 2019). Esta hipótesis sugiere que las personas con una alta actividad intelectual y alta inteligencia, que realizan actividades estimulantes cognitivamente, mantienen por más tiempo un funcionamiento cognitivo normal que los que tienen una baja reserva cognitiva (Livingston et al., 2017). También están asociados a un efecto protector, el consumo de una dieta mediterránea y el realizar ejercicio físico regularmente (Erkkinen et al., 2018).

A pesar de la búsqueda de un fármaco que logre revertir el proceso de deterioro cognitivo, no se ha encontrado aún un tratamiento eficaz para este tipo de enfermedades (Cummings et al., 2019; Panza et al., 2019). Estudios epidemiológicos han sugerido que los factores de riesgo y de protección susceptibles de cambio son cruciales para retrasar o evitar la aparición de enfermedades y ser dianas terapéuticas de patologías como la EA (Grande et al., 2020). En esta línea, los factores asociados con el estilo de vida ha tomado una especial relevancia en la investigación, con el fin de llegar a prevenir o atenuar el declive cognitivo asociado al envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas (Grande et al., 2020). Por tanto, los mecanismos que subyacen al envejecimiento ha sido un foco importante en los últimos años para aportar mayor conocimiento de las características de dicho proceso y las enfermedades que se le asocian (Bettio et al., 2017).

1.2.4. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una alteración progresiva a nivel neuronal, sináptica y de las células gliales en la que se produce un impedimento de su correcto funcionamiento y comunicación intracelular debido a la acumulación de depósitos de proteínas aberrantes. Esto provoca la

muerte neuronal y, consecuentemente el deterioro progresivo de las funciones cognitivas (memoria, funciones ejecutivas y aprendizaje), alteraciones psicológicas del comportamiento, llevando a la pérdida de autonomía de la persona (etapa de demencia) y finalmente a la muerte (Sachdev et al., 2014).

Existen diferentes subtipos de enfermedades neurodegenerativas y pueden clasificarse en dos categorías: según el tipo de proteína que se acumula en el cerebro o la clínica de la enfermedad (Tabla 2).

Podemos encontrar 4 categorías de proteínas aberrantes con tendencia a acumularse en las estructuras cerebrales:

- 1) **Amiloidosis:** las proteínas amiloideas son proteínas fibrilares insolubles que presentan una estructura secundaria rica en hojas β . Su alteración está presente en algunas de las enfermedades neurodegenerativas y forman agregados proteicos extracelulares. Un ejemplo sería la proteína β -amiloide (β A) característica de la EA (Soria Lopez et al., 2019; Dugger & Dickson, 2017).
- 2) **Taupatías:** enfermedades en la que se produce una acumulación anormal de la proteína tau en células gliales y neuronas. La proteína tau fosforilada (p-tau) es abundante en los axones neuronales. Cuando se hiperfosforila se produce una acumulación intracelular aberrante que lleva a la muerte celular (Kovacs, 2018; Dugger & Dickson, 2017).
- 3) **Sinucleinopatías:** se produce la agregación de la proteína α -sinucleína (α -syn), una proteína insoluble que se acumula a nivel presináptico en neuronas y células gliales (más frecuentemente oligodendrocitos). Además, juega un papel importante en el tráfico de vesículas sinápticas (Mendoza-Velásquez et al., 2019). Los depósitos de α -syn se acumulan de forma inicial en los nervios periféricos (piel y mucosa entérica), avanzando hasta el cerebro a través del nervio vago y el nervio olfatorio, progresando hasta el

encéfalo. Esta progresión de agregados proteicos se asocia con la aparición de sintomatología temprana no motora en este tipo de patologías (Mendoza-Velásquez et al., 2019).

- 4) **TDP-43 proteinopatías:** esta proteína tiene las funciones de represión transcripcional, regulación de la silenciación génica y metabolismo del ARN. Normalmente es una proteína nuclear, pero en las enfermedades neurodegenerativas, se forman agregados en el citoplasma, en el núcleo y en procesos celulares. Mayormente se agregan en las estructuras límbicas, teniendo cierta afinidad por las neuronas localizadas en la sección CA1 del hipocampo (Greaves & Rohrer, 2019; Sezgin et al., 2019).

Clasificación según la proteína acumulada	Clasificación según la clínica	Características	Mutaciones génicas	Estructuras cerebrales más afectadas	Referencias
Amiloidosis y taupatías	Enfermedad de Alzheimer	Acumulación extracelular de βA (placas seniles, PS) y p-tau intracelular (ovillos neurofibrilares, OVN). Deterioro del sistema colinérgico Deterioro de la memoria y aprendizaje.	<i>APP, PSEN1, PSEN2, ApoE</i> (mayor riesgo con la isoforma <i>ApoE ε4</i>)	Prosencéfalo basal, lóbulos frontal y temporal, estructuras límbicas, <i>Locus coeruleus</i> , bulbo olfatorio	(Andrews et al., 2020; Soria Lopez et al., 2019; Dugger & Dickson, 2017)
	Enfermedad de Pick	Acumulación de tau (cuerpos de Pick). Neuronas hinchadas (células de Pick) Variantes: A, B y C. Alteración motora	Proteína NPC1: la mutación o ausencia provoca la acumulación de colesterol en los endosomas y lisosomas.	Prosencéfalo basal, lóbulos frontal y temporal, estructuras límbicas y estriado	(Wheeler & Silience, 2020; Dugger & Dickson, 2017)
Sinucleinopatías	Enfermedad de cuerpos de Lewy	Acumulación de α-sin: cuerpos de Lewy. Síntomas: motores, cognitivos, de comportamiento y autonómicos. Alucinaciones visuales, depresión, ansiedad, parkinsonismo, rigidez, bradipsiquia y postura encorvada.	<i>GBA, α-sin, MAPT, BCL7C, GABRB3</i>	Amígdala, córtex cerebral, núcleo motor dorsal, hipocampo (CA2), <i>Locus coeruleus</i> , bulbo olfatorio, y sustancia negra	(Sezgin et al., 2019; Dugger & Dickson, 2017)
	Enfermedad de Parkinson	Cuerpos de Lewy Parkinsonismo, akinesia, bradiquinesia, inestabilidad postural, rigidez Alteración de las funciones ejecutivas, función visoespacial, memoria y atención. Alteración del ciclo sueño-vigilia. Apatía, depresión, ansiedad, alucinaciones	<i>α-syn, PARK2, PINK1, DJ1, GBA</i>	Atrofia cortical Ganglios basales (<i>Substancia nigra pars compacta</i> , núcleo pálido) Cerebelo, Tálamo, Hipotálamo, Sistema límbico, <i>Locus Coeruleus</i> , Células gliales	(Sezgin et al., 2019; Lotankar et al., 2017)
TDP-43 proteínopatías	Degeneración frontotemporal	Agregados proteicos de p-tau y TDP-43 Alteraciones en el comportamiento, cambios de personalidad, lenguaje y función motora	<i>GRN, MAPT, C9orf72, TBK1, FUS</i>	Córtex frontal y temporal Ganglios basales <i>Substancia nigra</i>	(Greaves & Rohrer, 2019; Sezgin et al., 2019)
Proteína elongada de poliglutamina (PolyQ)	Enfermedad de Huntington	Enfermedad autosómica dominante Acumulación de PolyQ Síntomas extrapiramidales (corea, distonia, bradipsiquia, rigidez), estado de ánimo y psiquiátricos	Por la expansión del triplete CAG del exón 1 del gen que codifica la proteína de HTT	Núcleo caudado y putamen Globo pálido y núcleo <i>accumbens</i> Tálamo, núcleo subtalámico, sustancia blanca y cerebelo	(Ghosh & Tabrizi, 2018; McColgan & Tabrizi, 2018)
Otras causas	Enfermedad vascular	Tras un accidente cerebrovascular (infartos, hemorragias, lesiones de la materia blanca, alteración de la neuroconectividad) La sintomatología dependiente de la gravedad localización	Ninguno asociado	Puede localizarse en cualquier área cerebral	(Smith, 2017)

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades neurodegenerativas que cursan con deterioro cognitivo y sus características clínicas, moleculares y neuroanatómicas. Abreviaciones: NPC1 (*NPC Intracellular Cholesterol Transporter 1*), GBA (*Glucosylceramidase beta*), MAPT (*Microtubule associated protein tau*), BCL7C (*B-cell CLL/lymphoma 7C*), GABRB3 (*Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta 3*), PARK2 (*Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*), PINK1 (*PTEN induced kinase 1*), DJ1 (*Parkinsonism associated deglycase*), GRN (*Granulin precursor*), C9orf72 (*C9orf72-SMCR8 complex subunit*), TBK1 (*TANK binding kinase 1*), FUS (*FUS RNA binding protein*), HTT (*Huntingtin*).

1.2.5. Enfermedad de Alzheimer

La EA es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente siendo el 60-70% de las causas de demencia y llegando a afectar a más del 35% de las personas mayores de 85 años (Qazi et al., 2018). Se caracteriza por presentar un deterioro progresivo e irreversible de las capacidades cognitivas, tales como la memoria, lenguaje, habilidades visoperceptuales y razonamiento. Además, de alteraciones psicológicas como ansiedad, depresión y desorientación (López Gutiérrez, 2017). Es de inicio insidioso y de progresión gradual en el que se distinguen tres estadios (leve o etapa amnésica, moderada o etapa confusional y grave o etapa demencial) y, finalmente, la muerte (de la Fuente Alonso, 2019).

Es una enfermedad de elevada complejidad, ya que, interactúan factores genéticos y ambientales para su manifestación (Qazi et al., 2018). El principal factor de riesgo asociado es el envejecimiento (Qazi et al., 2018).

En cuanto a sus marcadores neuropatológicos destacan la acumulación la proteína β A y p-tau en el cerebro (Sengoku, 2020). Según la hipótesis de la cascada amiloide (la más aceptada en las últimas décadas), microscópicamente, aparecen primero los agregados proteicos de β A extracelulares formando las denominadas PS (Sengoku, 2020). Posteriormente, se produce la acumulación intracelular de p-tau que forman los OVN que, junto con las PS generan un ambiente neurotóxico, aumentando los niveles de EO e inflamación que desencadena múltiples alteraciones como ERE, disfunción mitocondrial y disfunción sináptica (Zhang et

al., 2020). En segundo lugar, macroscópicamente, se aprecia una disminución del peso cerebral asociado a una atrofia de la corteza cerebral debido a una pérdida neuronal (Sengoku, 2020).

Todas estas características neuropatológicas están presentes en los dos tipos de EA: familiar y esporádica. La primera se refiere al tipo de EA que se manifiesta por una transmisión hereditaria autosómica dominante y es aparición temprana o precoz (antes de los 65 años). Mientras que la segunda se refiere a la que es de etiología multifactorial, no tiene un vínculo familiar evidente y es de aparición tardía (después de los 65 años) (Qazi et al., 2018).

En primer lugar, la EA de aparición temprana se asocia con las mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*. Es decir, la presencia de una o más mutaciones en estos genes es la causa directa de la enfermedad, llegando a una heredabilidad del 92-100% (Van Acker et al., 2019; Qazi et al., 2018). No obstante, es la forma menos frecuente, siendo aproximadamente un 5% del total de casos de EA (Bellenguez et al., 2020; Sengoku, 2020). En segundo lugar, en la EA de aparición tardía, las alteraciones génicas no son determinantes, aunque sí conforman la susceptibilidad de un individuo a manifestar la enfermedad debido a genes de riesgo y su interacción con factores ambientales (de la Fuente Alonso, 2019). Por ejemplo, el gen de riesgo más asociado a la EA tardía es el gen de *ApoE*, específicamente el polimorfismo $\epsilon 4$ (Qazi et al., 2018). Además, la EA de aparición tardía, es la más común (llegando a un 95% de los casos) y su etiología es atribuible a factores de riesgo genéticos y no genéticos (Haines, 2018). Por tanto, el presentar alteraciones genéticas no supone la manifestación directa de la EA, por lo que es necesaria la interacción de factores ambientales de riesgo a lo largo de la vida (de la Fuente Alonso, 2019).

Se han encontrado nuevos genes de riesgo asociados a la EA tardía (no causales) (Tabla 2) (Andrews et al., 2020; Bellenguez et al., 2020). Éstos se

descubrieron a través de los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), en los que se estudian polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) y su asociación con enfermedades. Esto permitió estudiar miles de individuos y millones de variaciones genéticas (Andrews et al., 2020; Bellenguez et al., 2020).

Genes causales	Función
<i>APP</i>	Precursor de amiloide
<i>PSEN1</i>	Procesamiento de APP
<i>PSEN2</i>	Procesamiento de APP
Genes de riesgo	Función
<i>APOE</i>	Metabolismo de lípidos
<i>TREM2</i>	Inmunidad innata: expresado en microglía
<i>BIN1</i>	Proteína adaptadora nuceocitoplasmática
<i>CLU</i>	Metabolismo de lípidos
<i>ABCA7</i>	Homeostasis lipídica en células del Sistema inmune
<i>CR1</i>	Respuesta inmune
<i>PICALM</i>	Metabolismo de membrana
<i>MS4A</i>	Proteína transmembrana
<i>CD33</i>	Receptor transmembrana de células mieloides
<i>CD2AP</i>	Dinámica del citoesqueleto
<i>ADAM10</i>	Procesamiento de APP
<i>SORL1</i>	Receptor neuronal de la ApoE
<i>RIN3</i>	Actividad GTPasa

Tabla 2. Genes asociados a la EA. Genes causales asociados a la EA y factores de riesgo genéticos de la EA con mayor validación en los últimos estudios GWAS (Andrews et al., 2020; Bellenguez et al., 2020). **Abreviaciones:** *TREM2* (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2), *BIN1* (Bridging Integrator 1), *CLU* (Clusterin), *ABCA7* (ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7), *CR1* (Complement Receptor Type 1), *PICALM* (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein), *MS4A* (Membrane spanning 4-domains 4A), *CD33* (CD33 Molecule), *CD2AP* (CD associated protein), *ADAM10* (ADAM Metallopeptidase Domain 10), *SORL1* (Sortilin related receptor 1), *RIN3* (Ras and Rab interactor 3).

En cuanto a los factores ambientales de riesgo como, por ejemplo, la HFD saturadas favorecen el desarrollo de enfermedades cardiovasculares que, al mismo tiempo, aumentan la acumulación de β A en el cerebro, el EO, la neuroinflamación y muerte neuronal (Rahman et al., 2020). Otros factores de riesgo ambientales como la exposición a tóxicos, pesticidas, metales pesados contribuyen a la producción de β A incrementando el riesgo de la EA (Rahman et al., 2020). En este punto, los

mecanismos epigenéticos juegan un papel importante en el proceso de neurodegeneración (Rahman et al., 2020). Asimismo, la 5-mC es de los principales mecanismos epigenéticos implicados en el envejecimiento, y por consiguiente, la neurodegeneración (Qazi et al., 2018). Se ha asociado a la EA con una disminución de los niveles de 5-mC global, por lo que, pacientes con EA tardía presentan niveles disminuidos de este marcador en el promotor del gen de la *ApoEε4*, lo cual, favorece su expresión (Qazi et al., 2018).

Además de los factores ambientales de riesgo, también existen factores protectores ante la EA tardía (Rahman et al., 2020). Por ejemplo, el ejercicio, o una dieta rica en vitamina C, vitamina E o polifenoles como el resveratrol (RSV), los cuales son antioxidantes naturales, previenen las alteraciones moleculares asociadas a la neurodegeneración (Rahman et al., 2020). La exposición temprana a estos factores ambientales (de riesgo o protectores) modularán los mecanismos epigenéticos y, al mismo tiempo, la expresión génica, desde el útero materno, predisponiendo a las siguientes generaciones a través de la herencia epigenética a manifestar EA; por ejemplo, la desnutrición en etapas tempranas del desarrollo intrauterino se considera uno de los factores de riesgo asociados al origen de las enfermedades neurodegenerativas. No obstante, estos procesos de heredabilidad se explicarán en apartados posteriores (Gabbianelli & Damiani, 2018; Qazi et al., 2018).

1.3. Mecanismos epigenéticos y envejecimiento

1.3.1. Generalidades

La epigenética se refiere a modificaciones relevantes en el genoma que no implican cambios en la secuencia del ADN. Asimismo, estos cambios son heredables por lo que tienen la capacidad de transmitirse a la siguiente generación

predisponiendo a determinados fenotipos (herencia epigenética) (Skvortsova et al., 2018). Estos mecanismos son de gran importancia, ya que, factores ambientales como la dieta o el ejercicio producen cambios en la maquinaria epigenética (capacidad reversible). Son, por tanto, el punto de interacción entre los factores ambientales y genéticos que, finalmente, determinarán el fenotipo del individuo (Skvortsova et al., 2018).

Los mecanismos epigenéticos regulan múltiples procesos del organismo en los diferentes tejidos y órganos (Harman & Martín, 2019). Concretamente el cerebro expresa a lo largo de toda la vida del organismo entre el 80-95% de los genes, hecho que hace, que la regulación transcripcional sea un mecanismo molecular relevante para este órgano. Como consecuencia, la participación de la maquinaria epigenética para regular la expresión de los diferentes genes en un espacio y tiempo determinados es crucial. Además, de ser el órgano más susceptible de deterioro durante el proceso de envejecimiento y neurodegeneración (Harman & Martín, 2019; Berson et al., 2018). Por lo tanto, múltiples cambios epigenéticos se producen durante el envejecimiento y contribuyen a la aparición de las enfermedades neurodegenerativas (Harman & Martín, 2019; Berson et al., 2018). Durante el proceso de envejecimiento se va produciendo un déficit en la capacidad de reparación y mantenimiento del ADN lo que va resultando en la acumulación de ADN dañado desencadenando la senescencia celular. Al mismo tiempo, los mecanismos epigenéticos son los encargados de mantener el ADN en buen estado, por lo que, una alteración de su funcionamiento lleva a su vez, a daños en el ADN asociados al proceso de envejecimiento (Park et al., 2017).

Podemos diferenciar cuatro mecanismos epigenéticos principales: 5-mC e hidroximetilación del ADN (5-hmC), modificación de histonas, modificación de ARNs no codificantes (ARNnc) y la metilación del ARN (m⁶A) (Skvortsova et al., 2018) (Figura 3).

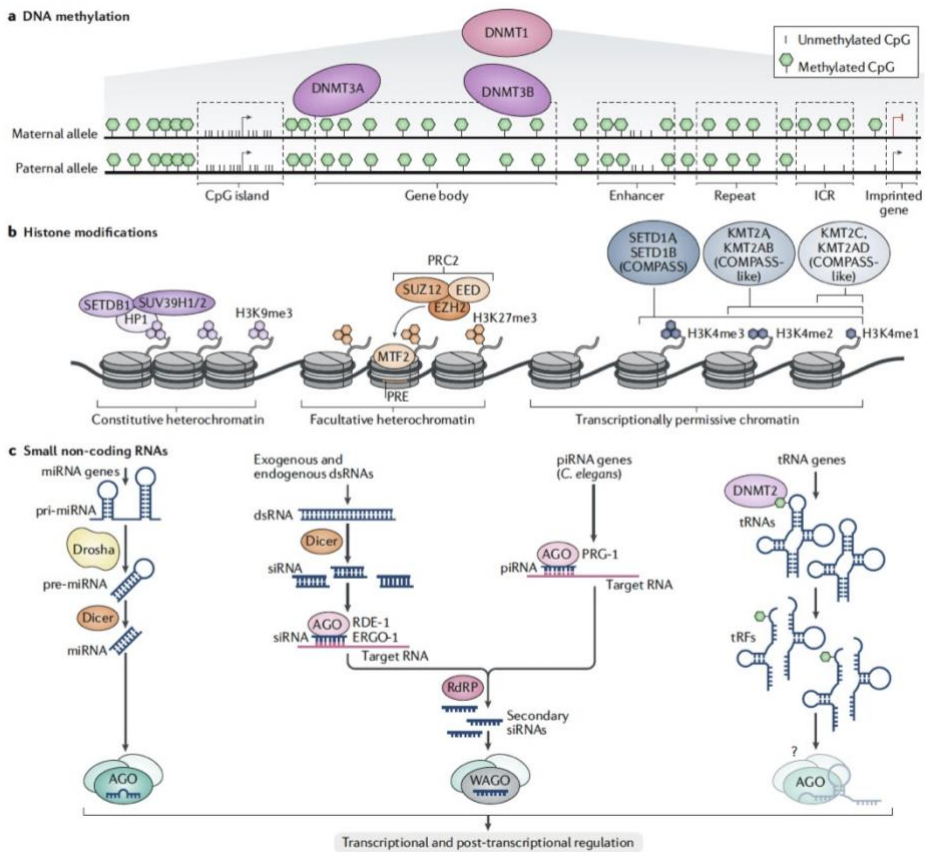


Figura 3. Principales mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica. A) Metilación del ADN y las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs); **B)** Modificación de histonas y las enzimas que lo modulan. La H3K9me3 está catalizada por la histona metiltransferasa SETD1B (*SET domain containing 1B, histone lysine methyltransferase*), HP1 (*Chromobox 5*), y SUV39H1/2 (*Suppressor of variegation 3-9 homolog 1/2*). La H3K27me3 está catalizada por EZH2 (*Enhancer of Zeste 1 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*), SUZ12 (*SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit*) y EED (*Embryonic ectoderm development*), este complejo es reclutado por el factor de transcripción MTF2 (*Metal response element binding transcription factor 2*). La metilación de H3K4me1, 2 y 3 son catalizadas por la proteína SET1A y 1B (*SET domain containing 1A, histone lysine methyltransferase*), las histonas metiltransferasas KMT2A, KMT2B, KMT2C y KMT2D (*Lysine methyltransferase*); y **C)** Tipos de ARNnc. Los microRNAs (miRNAs) y primarios (pri-miRNA) son escindidos por la endoribonucleasa Droscha para producir miRNAs precursores (pre-miRNAs). Los pre-miRNAs y los ARN bicatenarios son escindidos por la endoribonucleasa Dicer para producir miRNAs maduros y pequeños ARN interferentes (ARNin). *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), proteína Argonaute (AGO *Argonaute RISC component 1*), RDE-1 (*Defective ARN proteins 1*), WAGO (*Worm-specific AGO proteins*) (Skvortsova et al., 2018).

1.3.2. Metilación e hidroximetilación del ADN

El primer mecanismo epigenético descrito fue la 5-mC, además de ser de los más relevantes en la regulación transcripcional (Kandlur et al., 2020). Este mecanismo se caracteriza por la adición covalente de un grupo metilo en la posición 5 de una citosina (Kandlur et al., 2020). Con más incidencia sucede en las citosinas precedidas por una guanina, llamadas islas citosina-guanina (CpG), frecuentemente situadas en la región promotora del gen, lo que lleva a una regulación de su expresión (Kandlur et al., 2020; Harman & Martín, 2019; Park et al., 2017). Además, en el cerebro de los mamíferos aproximadamente el 62% de las islas CpG se encuentran metiladas (Kandlur et al., 2020). Generalmente, altos niveles de 5-mC se asocian con una disminución de la expresión génica, ya que, promueve la compactación de la cromatina y, por tanto, impide el acceso a los factores transcripcionales (Creighton et al., 2020). No obstante, su efecto es dependiente del lugar de unión y del gen que regule (Harman & Martín, 2019). En mamíferos, existen diferentes enzimas para la adición de un grupo metilo al ADN denominadas DNMTs. Existen tres clases: la DNMT3a y DNMT3b son las que realizan la metilación del ADN *de novo* durante el desarrollo y la DNMT1, la cual es importante para el mantenimiento del patrón de metilación durante la división celular (Harman & Martín, 2019; Park et al., 2017).

La 5-mC regula la transcripción específica de cada tejido y célula, el silenciamiento de elementos transponibles o la inactivación cromosómica (Harman & Martín, 2019). Otro aspecto importante es que el tipo de alteración de este marcador durante el envejecimiento puede ser a dos niveles: a nivel específico, es decir, que se dé la desregulación en ciertos genes específicos o que sea a nivel global del ADN (Park et al., 2017).

En cuanto a las alteraciones a nivel global, se ha demostrado que la 5-mC es un biomarcador asociado al envejecimiento debido a que, personas centenarias

muestran un patrón alterado y una hipometilación global del ADN en comparación con recién nacidos (Park et al., 2017). Es más, diversos estudios han asociado los niveles de 5-mC con la edad en diferentes tejidos y células por lo que se puede considerar un reloj biológico (Park et al., 2017). Estos cambios globales del patrón de 5-mC están asociados con una alteración de la estabilidad genómica, a la pérdida de telómeros y al proceso de envejecimiento celular (Park et al., 2017). Asociada a esta disminución de la 5-mC global se ha demostrado que los niveles de expresión de las *DNMTs* también se ven alteradas con la edad (Torres et al., 2019). Por un lado, se ha observado una disminución de la expresión de la *DNMT1* (encargada de mantener el patrón de 5-mC). Por otro lado, se ha descrito un aumento de la expresión de la *DNMT3a* y la *DNMT3b* en personas de avanzada edad (Park et al., 2017). En cambio, a nivel específico podemos encontrar un aumento o disminución de los niveles de 5-mC en genes determinados. Por ejemplo, animales jóvenes muestran una hipometilación de los promotores del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en hipocampo, factor implicado en procesos de aprendizaje, memoria y plasticidad sináptica y, al mismo tiempo, un aumento de la metilación del mismo junto a una disminución de su expresión en el hipocampo de ratones envejecidos (Harman & Martín, 2019; Berson et al., 2018).

Por otro lado, la 5-hmC es otro mecanismo epigenético asociado a la activación transcripcional (Creighton et al., 2020). Ésta implica la oxidación del grupo metilo mediante las enzimas de translocación diez-onze (TET). Aproximadamente el 1% de las citosinas en mamíferos están 5-hmC, aunque los niveles de 5-hmC varían en cada tejido siendo el SN de los que presenta mayores niveles (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018b).

Existen tres tipos de enzimas TET: la TET1, TET2 y TET3. Además, generalmente, un aumento de 5-hmC está asociado a un aumento de la expresión génica. Por tanto, el proceso de oxidación de 5-mC a 5-hmC se considera un paso

intermedio hacia el proceso de desmetilación del ADN (Irier & Jin, 2012). No obstante, los niveles globales de 5-mC e 5-hmC en tejido humano en condiciones normales es muy variable y no tienen por qué correlacionar, al igual que se ha demostrado que no se correlaciona una disminución de los niveles globales de 5-mC con un aumento global de 5-hmC ni de las TET (Harman & Martín, 2019).

La 5-hmC y la actividad de las enzimas TET tienen un papel importante en la regulación de procesos de aprendizaje y memoria, además de estar dinámicamente regulados por factores ambientales (Creighton et al., 2020; Torres et al., 2019). Cada subtipo de enzima se asocia a un tipo de memoria concreta y una disminución de éstas implica una alteración de la memoria en ratones (Creighton et al., 2020). En tejido hipocámpal de ratones envejecidos se observó una reducción de la expresión de *TET1* y *TET2*, y una disminución de los niveles de 5-hmC al mismo tiempo que la reducción de procesos de neurogénesis en el giro dentado (Torres et al., 2019). Todos estos cambios contribuyen a la acumulación del daño del material genómico a lo largo de la vida, potenciando el proceso de deterioro y envejecimiento (Torres et al., 2019). Al contrario, un aumento de los niveles de expresión de *TET2* produce una recuperación de la neurogénesis similar a la observada en ratones jóvenes (Torres et al., 2019).

1.3.3. Modificación de histonas

Las histonas son proteínas de bajo peso molecular que forman parte de la estructura básica de la cromatina conformando el nucleosoma, el cual está formado por la doble cadena de ADN enrollada sobre un paquete de histonas (octámero de histonas) o protaminas (en la fase final de la espermatogénesis) (Figura 4) (Park et al., 2017). Gracias a este empaquetamiento del material genético se reduce en tamaño hasta poder almacenarse en el núcleo celular (Park et al., 2017). Existen cinco tipos: H1, H2A, H2B, H3 y H4. Además, las histonas son unas proteínas que regulan la

expresión génica modificando la compactación de la cromatina a través de diferentes modificaciones epigenéticas (metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, citrulinación y ADP-ribosilación) que regulan la estructura de la cromatina y las interacciones proteína-proteína, además de la regulación transcripcional (Creighton et al., 2020; Park et al., 2017). Las modificaciones de histonas más asociadas al envejecimiento son la metilación y acetilación, junto con las enzimas que las regulan (Tabla 3).

El proceso de envejecimiento se asocia a múltiples modificaciones de las histonas (Harman & Martín, 2019). Se ha reportado que durante el envejecimiento se produce una alteración del funcionamiento de las enzimas que regulan las histonas produciendo cambios en el epigenoma (Harman & Martín, 2019). En general, durante el envejecimiento se produce una disminución de los mecanismos epigenéticos que silencian la expresión génica, y al mismo tiempo, un aumento de los mecanismos que activan la maquinaria transcripcional, lo que lleva a un cambio importante en la expresión génica (Harman & Martín, 2019).

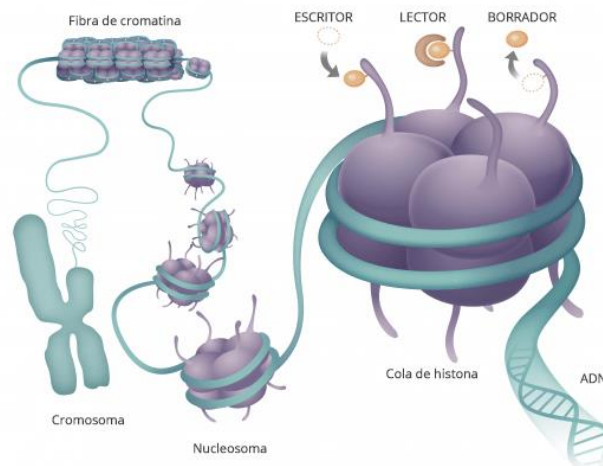


Figura 4. Estructura de la cromatina. Para garantizar el máximo empaquetamiento del ADN, este se enrolla alrededor de un paquete de histonas llamado octámero de histonas, formando los nucleosomas que con mayor compactación forman la fibra de cromatina hasta llegar la máxima compactación del material genómico en los cromosomas (Epigenética, Orizon, 2021).

Modificación de histonas	Efecto en la expresión génica	Enzimas	Subtipos	Mecanismos que regula	Niveles de expresión asociados al envejecimiento	Referencias
Acetilación	Relajación de la cromatina y aumento de la expresión génica	la HATs (Añaden acetilo en los residuos de lisina de las histonas)	P300/CBP GNAT/PCAF MYST, HAT1 Gcn5, PCAF, ELP3, Tip60, MOZ, MORE, HBO1, HMOF	Esperanza de vida, EO, senescencia celular	P300/CBP, HAT1, KAT6B	(Khokhar et al., 2020; Nagarajan & Parthun, 2020; Griñán-Ferré et al., 2018)
Desacetilación	Compactación de la cromatina y silenciamiento génica	los HDACs y SIRT's (Eliminan acetilo de las histonas)	HDACs Clase I: HDAC1, 2, 3 y 8. Clase II: HDAC 1-7/9 y 10. Clase III: SIRT1-SIRT7 Clase IV: HDAC11	Crecimiento axonal, mayor EO, SIRT1 y 6 metabolismo, plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria	SIRT2, HDAC1, 2 y 3	(Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018; Nagarajan et al., 2019)
Metilación	Compactación de la cromatina y silenciamiento génica	los HMT's (Añaden grupos metilo en los residuos de lisina y arginina de la H3 y H4)	EHMT1 y 2 EZH1 y 2 KMT, NSD1-3, CARM1, SMYD1-3, PRMT PRDM, SET, GLP, MLL1-4, ASH, SETD, SUV39H1-2, SUV420H1,2, SETMAR, DOT1L	Plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria	NSD1, EZH2	(Martin-Herranz et al., 2019; Michalak et al., 2019; Griñán-Ferré et al., 2018)
Desmetilación	Relajación de la cromatina y aumento de la expresión génica	los HDMS (Eliminan metilo de las histonas)	KDM1-6 JMJD, LSD1,2, JARID, NO66 PHE, UTX, UTY, JHDM	Plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria	PHF, KDM6, LSD1	(Michalak et al., 2019; Swahani & West, 2019)

Tabla 3. Modificaciones de histonas. Tipos de modificaciones de histonas, enzimas que las regulan, funciones y su asociación con procesos de envejecimiento. Abreviaciones: Histona acetiltransferasas (HATs), histona deacetilasas (HDACs), sirtuinas (SIRT's), metiltransferasas de histonas (HMTs) y desmetilasas de histonas (HDMs)

1.3.4. ARNs no codificantes

Se estima que solo un 1,5% del genoma codifica a ARN, que finalmente dará lugar a un transcripto, mientras que más del 65% del ARN no será traducido a una proteína y son los ARNnc (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018b). Son secuencias funcionales de ARN que no se traducen a proteínas pero que regulan la expresión génica, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Bertogliat et al., 2020). Existen diferentes tipos de ARNnc: microRNAs (miRNAs), circular, de interferencia corta, de interacción-PIWI y los ARNs no codificantes largos (ARNncl), entre otros. Aunque los miRNAs son los más estudiados en relación al funcionamiento cerebral y las enfermedades neurodegenerativas (Bertogliat et al., 2020).

Los miRNAs son pequeñas secuencias de ARNnc (entre 18-25 nucleótidos) que tienen la función de regular la expresión génica a nivel postranscripcional uniéndose a la secuencia de ARN mensajero (ARNm) en la región 3' no traductora (3'UTR) mediante diferentes mecanismos: 1) inhibiendo la traducción; 2) deteniendo la fase de elongación; 3) la detención de la traducción; o 4) degradando el ARNm en el mismo momento del proceso de traducción (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018b). Actualmente, se han reportado más de 2000 miRNAs incluidos en el mirbase (Reddy et al., 2017). El funcionamiento de los miRNAs es bastante complejo dado que un mismo miRNA puede regular múltiples genes, y a su vez, un gen puede ser regulado por múltiples miRNAs (Harman & Martín, 2019).

Se conoce que aproximadamente el 70% de los miRNAs registrados se expresan en el cerebro (Griñán-Ferré et al., 2018; Reddy et al., 2017). Las neuronas y las células gliales son ricas en miRNAs exclusivos que regulan procesos específicos (Harman & Martín, 2019). En el SNC los miRNAs regulan múltiples

funciones como la señalización neuronal, mecanismos de neuroreparación y plasticidad sináptica (Bertogliat et al., 2020). Consecuentemente, alteraciones en los niveles de expresión de diversos miRNAs se asocian con procesos de deterioro cognitivo y envejecimiento (Figura 5) (Harman & Martín, 2019; Reddy et al., 2017). Cambios en los niveles de miRNAs (tanto por disminución como por incremento) se asocian con cambios en la esperanza de vida y procesos de senescencia (Kumar et al., 2017; Reddy et al., 2017). Es más, se ha asociado al envejecimiento el

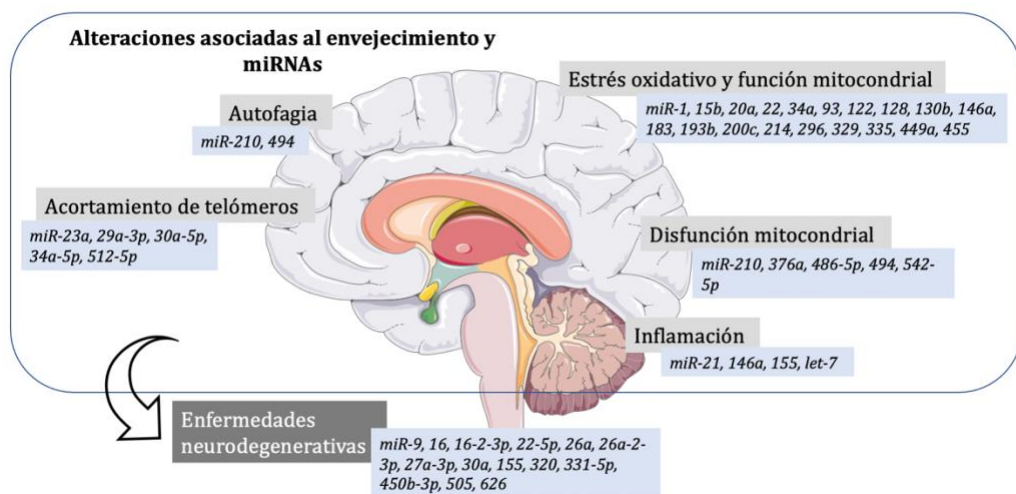


Figura 5. Alteraciones asociadas al envejecimiento y los miRNAs implicados. La disregulación de los niveles de estos miRNAs produce la alteración de diferentes procesos moleculares asociados a la senescencia celular y el envejecimiento, llevando a una disminución de la esperanza de vida y enfermedades neurodegenerativas (Reddy et al., 2017).

incremento global de la expresión de los miRNAs (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018b).

Los miRNAs mayormente asociados al proceso de envejecimiento son los miRNAs de la familia *let-7*, los cuales presentan un aumento asociado a la edad (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018b), mientras que *miR-101* y *miR-433* disminuyen en cerebros envejecidos (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018b). La familia de *miR-34*

ha sido asociada con procesos de deterioro cognitivo y envejecimiento (Kinser & Pincus, 2020). Específicamente, se ha asociado la disminución de su expresión con el aumento de la expresión de *Sirt1* en hipocampo de modelo de ratones de envejecimiento y EA (Kinser & Pincus, 2020).

1.3.5. m⁶A

El m⁶A es un mecanismo epigenético que se caracteriza por modular los niveles de metilación del ARNm de manera reversible y dinámica, además de ser de los mecanismos más presentes en células eucariotas (Shafik et al., 2021). Aproximadamente el 25% del ARNm se encuentra metilado y se localiza generalmente alrededor de los codones de parada, en las regiones 3' UTR y en los largos exones internos, más frecuentemente en el precursor de ARNm (pre-ARNm) (Huang et al., 2019; Wu et al., 2019). Este mecanismo se ha asociado a la regulación de múltiples funciones como la degradación del ARN, expresión génica, proceso metabólico del ARN, estabilidad del ARNm, eficiencia de la traducción y splicing alternativo (Shafik et al., 2021; Huang et al., 2019).

El m⁶A está regulado por tres tipos de proteínas (Figura 6): el primer grupo lo conforman las metiltransferasas que se encargan de añadir grupos metilo en el nucleótido de adenina (escritoras). Este grupo incluye la proteína metiltransferasa 3 (METTL3), la cual interactúa con METTL14 y la proteína WTAP (Wu et al., 2020; Huang et al., 2019). Además, forman parte del complejo escritor las proteínas VIRMA, ZC3H13, RBM15 y/o RBM15B y CBL1 que proporcionan la especificidad del lugar donde se metilará el ARN (Livneh et al., 2020). El segundo grupo, las desmetilasas encargadas de eliminar estos grupos metilo (borradoras) se incluye la proteína FTO y la proteína ALKBH5 (Wu et al., 2020). Y el tercer grupo, las encargadas de llevar a cabo la función de estas modificaciones del ARN (lectoras) que son: las proteínas YTHDF1, 2, 3 y YTHDC1 (Huang et al., 2019).

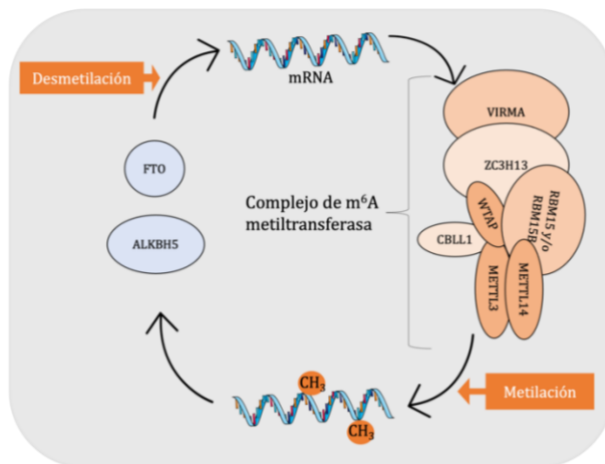


Figura 6. Regulación del proceso de m6A. Las enzimas que regulan la marca m6A mediante proteínas escritoras (el complejo metiltransferasa) y proteínas borradoras (FTO y ALKBH5). Forma adaptada de (Livneh et al., 2020).

Los niveles de m⁶A son cruciales para el desarrollo y mantenimiento del SNC y son especialmente abundantes en el cerebro, específicamente, en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala (Shafik et al., 2021; Widagdo & Anggono, 2018). Al mismo tiempo, está implicado en la regulación de diferentes procesos como el desarrollo neural, plasticidad sináptica, transmisión sináptica, guía axonal, neurogénesis, función postsináptica y juega un papel importante en la regeneración de nervios periféricos (Livneh et al., 2020; Widagdo & Anggono, 2018). Consecuentemente, es abundante en las neuronas y en zonas localizadas como los axones, dendritas, terminales presinápticas y espinas dendríticas (Widagdo & Anggono, 2018). Además, se ha encontrado que su función es importante para mantener la integridad y funcionalidad de las sinapsis tripartitas (neurona presináptica, postsináptica y células gliales) (Livneh et al., 2020; Widagdo & Anggono, 2018). Es más, los niveles de m⁶A y de las enzimas que la regulan en el cerebro van variando con la edad y se ha asociado con el proceso de envejecimiento y senescencia (Wu et al., 2020).

1.4. Epigenética y cognición

En los últimos años se han realizado numerosos estudios que demuestran la importancia de la maquinaria epigenética en relación con los procesos cognitivos, especialmente los procesos de aprendizaje y memoria (Griñán-Ferré, Izquierdo, et al., 2018; Moody et al., 2017a; Yuen et al., 2017). La memoria es la capacidad que permite la adaptación de un individuo al medio, modificando su conducta en base a las experiencias que obtiene del mundo, mientras que el aprendizaje es el proceso cognitivo mediante el cual se adquiere nueva información (Cassilhas et al., 2016). Por lo tanto, la memoria permite adquirir, almacenar y recuperar la información cuando sea necesario. Además, se caracteriza por depender de dos variables: los estímulos ambientales y el tiempo (Khalaf & Gräff, 2016).

No obstante, no todas las experiencias se almacenan de la misma forma ni provocan los mismos cambios a nivel estructural en el cerebro (Khalaf & Gräff, 2016). Solo aquellas que realmente persisten en el tiempo logran mantenerse durante días e incluso años (Khalaf & Gräff, 2016). Debido a esto, existen diferentes tipos de memoria y diferentes estructuras cerebrales implicadas en su funcionamiento, lo que la hace una de las capacidades más complejas (Cassilhas et al., 2016). Dicha clasificación puede ser en función del tiempo (memoria a corto o largo plazo) o por la naturaleza de la información, como por ejemplo, la memoria espacial, la cual es un subproceso encargado de almacenar información sobre la orientación y localización del individuo en el espacio (Solari & Hangya, 2018; Cassilhas et al., 2016). Otro subproceso importante es la memoria de trabajo. Ésta es un tipo de memoria a corto plazo la cual implica diferentes subprocesos cognitivos (entre ellos la atención) y diferentes áreas cerebrales (corteza prefrontal, corteza cingulada anterior y área parietal) (Chai et al., 2018). Por lo que, es un proceso cognitivo complejo que permite realizar tareas en el mismo momento de manera exitosa, manteniendo accesible la información de manera inmediata

(Ricker et al., 2018). También juega un papel importante en la consolidación de la memoria, y consecuentemente en la formación de la memoria a largo plazo (Chai et al., 2018). Tanto la memoria espacial como la memoria de trabajo se ven alteradas en cerebros envejecidos (Chai et al., 2018). Concretamente la memoria a corto plazo es la primera en verse afectada en individuos con enfermedades que cursan con deterioro cognitivo (Chai et al., 2018).

A la unión entre los procesos epigenéticos y los procesos cognitivos se le conoce como neuroepigenética, la cual se centra en investigar cómo la memoria se genera como consecuencia de los cambios dinámicos dependientes de las experiencias en el genoma (Kim & Kaang, 2017b).

Como ya se ha explicado anteriormente, la epigenética es la encargada de regular la transcripción génica modificando el estado de la cromatina, es decir, volviéndola más compacta y, por tanto, impidiendo la expresión génica (heterocromatina) o descompactándola, y volviéndola más accesible a la maquinaria transcripcional y favoreciendo la expresión génica (eucromatina)(Khalaf & Gräff, 2016; Kim & Kaang, 2017). Estos cambios se producen principalmente mediante la 5-mC e 5-hmC del ADN o a través de las modificaciones de las histonas (Kim & Kaang, 2017b). Además, estos cambios epigenéticos se producen a lo largo de la vida como respuesta al ambiente (Kim & Kaang, 2017b). Es más, si dichos cambios son lo suficientemente potentes tendrán un carácter heredable a las subsiguientes generaciones (Casavilca-Zambrano et al., 2019).

En el momento en el que se está produciendo un aprendizaje, se ven implicados una serie de mecanismos que regulan la expresión génica que, finalmente, se traducirá en un cambio molecular y estructural en las neuronas formando nuevas conexiones y, en consecuencia, nuevos recuerdos (Kim & Kaang, 2017b).

1.4.1. Principales mecanismos epigenéticos implicados en la formación de memoria.

La memoria es un proceso cognitivo dependiente de la experiencia, es decir, que depende de factores ambientales relevantes para el individuo (Kim & Kaang, 2017b). De esta forma, inicia mecanismos neuronales y moleculares que garantizarán su adaptación a los cambios que se producen en el medio (Kim & Kaang, 2017b). Dicha conexión entre individuo y ambiente se encuentran implicados los mecanismos epigenéticos, los cuales son responsables de producir cambios moleculares en respuesta a dicha interacción (Abdul et al., 2017, 2017). Especialmente, la 5-mC y las modificaciones de histonas están estrechamente relacionados en la generación y mantenimiento de los cambios en el comportamiento dependientes del ambiente en los mamíferos (Day & Sweatt, 2011).

Cada tipo de información que se almacena en el cerebro utiliza un código epigenético específico para guardarla a largo plazo en el SNC adulto junto con la activación de diferentes vías de señalización intracelular como la proteína MAPK, la proteína CaMKII, la proteína CREB, todas ellas factores de transcripción para la expresión génica y posterior síntesis de nuevas proteínas; o la liberación de neurotrofinas como BDNF o el factor de crecimiento neuronal (NGF) para potenciar la plasticidad sináptica y aumentar la eficiencia de las interconexiones neuronales (Gulyaeva, 2017).

Los cambios en la 5-mC son cruciales para los procesos de formación y mantenimiento de la memoria a largo plazo (Kim & Kaang, 2017a; R. Kumar et al., 2018). En relación con el contexto de condicionamiento del miedo se ha evidenciado que se producen cambios en los niveles de 5-mC de genes asociados a la memoria en el hipocampo, asociando este mecanismo epigenético a procesos de aprendizaje y memoria (Kim & Kaang, 2017b). Más concretamente se ha observado

un aumento de la 5-mC en ratas tras pasar por dicho paradigma (Kim & Kaang, 2017b). En el mismo sentido, Khalaf & Gräff demostraron que el aumento del RNAm de las DNMTs *de novo* en la región CA1 del hipocampo tras 30 minutos de entrenamiento de condicionamiento, destacando la importancia de las DNMTs en la consolidación de la memoria (Khalaf & Gräff, 2016). Por tanto, los mecanismos epigenéticos son necesarios para la formación de la memoria (Khalaf & Gräff, 2016). Por ejemplo, la inhibición de las DNMTs en hipocampo, bajo la prueba de condicionamiento del miedo, dificulta el proceso de aprendizaje y memoria en los animales, promoviendo un estado de hipometilación del ADN (Khalaf & Gräff, 2016).

A partir de estos hallazgos se ha asociado la inhibición de las DNMTs con el deterioro de la potenciación a largo plazo en las sinapsis hipocampales y con déficits en el aprendizaje (Pearce et al., 2017). Incluso la disminución de la Dnmt1 y Dnmt3a en neuronas produce un deterioro del aprendizaje en animales a través del laberinto acuático de Morris (MWM), demostrando la importancia de las DNMTs en la cognición (Feng et al., 2010).

1.5. Herencia epigenética y neurodegeneración

1.5.1. Generalidades

Son importantes los factores ambientales a los que un individuo está expuesto a lo largo de la vida (Gomez-Verjan et al., 2020). No obstante, también son importantes los factores a los que estuvieron expuestos sus predecesores, puesto que también tendrán un efecto en el desarrollo del individuo (Gomez-Verjan et al., 2020). Por parte de los progenitores se transmite la información genética aunque

esta incluye una pequeña parte de toda la información que se transmite entre generaciones (Jablonka & Noble, 2019). Por ejemplo, en el caso de la herencia epigenética, esta se encarga de transmitir la manera en la que el código genético se expresará en las siguientes generaciones, predisponiendo a un fenotipo u otro (Gomez-Verjan et al., 2020). Además, es importante diferenciar entre los conceptos de epigenética y herencia epigenética. La primera se refiere al conjunto de mecanismos que conforman y mantienen las marcas epigenéticas durante el desarrollo celular y que persisten en el tiempo (Jablonka & Noble, 2019). Mientras que la segunda se refiere a todas aquellas modificaciones epigenéticas que se heredan a lo largo de las generaciones sin una modificación de la secuencia de ADN o de la presencia persistente de los factores ambientales inductoras de dichos cambios tendiendo como unidad de transmisión la célula (Jablonka & Noble, 2019). Hay dos tipos de herencia epigenética: la herencia epigenética intergeneracional (HEI) y la herencia epigenética transgeneracional (HET) que se explicarán más adelante.

La herencia la conforman un conjunto de mecanismos que la hacen mucho más compleja y que se produce en diferentes momentos del desarrollo (Horsthemke, 2018). Durante muchos años, el estudio de la heredabilidad se ha centrado en la acción de los genes como principales responsables del fenotipo de los individuos (Horsthemke, 2018). No obstante, la herencia genética es una pequeña parte de la información transmitida a la descendencia en los mamíferos, teniendo como unidad de transmisión el gen (Horsthemke, 2018). Es decir, existen otros tipos de herencia que se describen a través de la teoría de los sistemas del desarrollo, la cual explica que la herencia es un sistema complejo que interacciona con diferentes tipos de sistemas de herencia como son: la epigenética (mecanismos epigenéticos), la endosimbiótica (la transmisión de microorganismos de madres a hijos), la ecológica (el ambiente social y cultural), la materna (ADNmt), la parental (estilo educativo y vínculo afectivo) y la simbólica (comunicación lingüística

exclusiva de los seres humanos) (Jablonka & Noble, 2019). Todos estos sistemas están formados por diferentes mecanismos, procesos y factores a través de los cuales diferentes tipos de información hereditaria son almacenadas y transmitidas entre generaciones, interaccionando entre ellas para conformar un fenotipo determinado, además favoreciendo su adaptación al ambiente de los individuos y

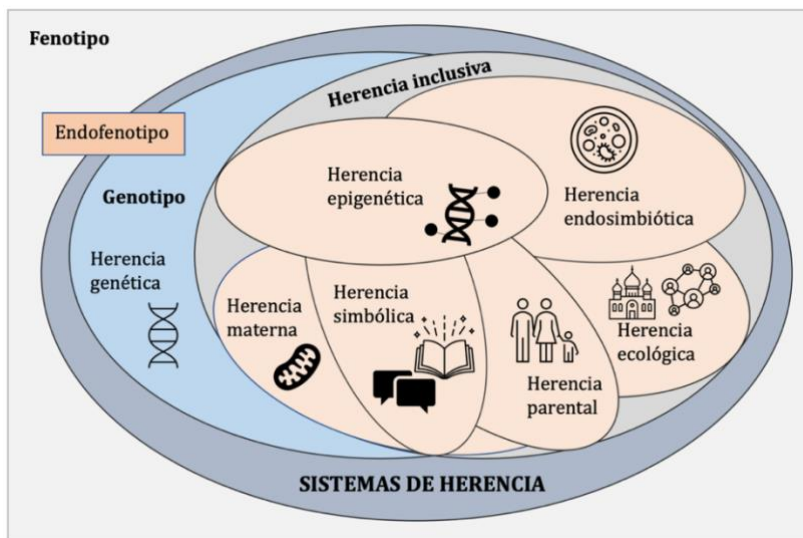


Figura 7. Los diferentes tipos de herencia que conforman a los individuos y su interacción. La información que se hereda es muy diversa. Una pequeña parte la conforma la herencia genética, la cual va interaccionando con los otros tipos de herencia que tiene en cuenta diferentes tipos de factores que rodean al individuo durante su desarrollo embrionario y postembrionario (herencia inclusiva). Dentro de estas se engloban la herencia epigenética, la herencia endosimbótica, la herencia materna, la herencia ecológica, la herencia simbólica y la herencia parental. Todas ellas interaccionan formando el fenotipo del individuo (sistemas de herencia). El endofenotipo explica algunas características presentes en los seres vivos que no son observables como el fenotipo pero que se mantienen latentes hasta activarse con la exposición a determinados estímulos estresantes, predisponiendo a un individuo a determinadas enfermedades (vulnerabilidad genética) (Jablonka & Noble, 2019).

de las siguientes generaciones (Jablonka & Noble, 2019) (Figura 7). A partir de esta perspectiva surge el término de herencia biológica, la cual presenta un punto de vista de herencia inclusiva en la que englobaría todos los tipos de herencia y su interacción, alejándonos del determinismo genético y sus limitaciones a la hora de explicar la naturaleza de los seres vivos (Jablonka & Noble, 2019).

Específicamente, los mecanismos epigenéticos son cruciales para la adaptación de un organismo al ambiente, ya que, se modifican en respuesta a los cambios ambientales, lo que mejora su adaptación generando múltiples fenotipos de un mismo genotipo (plasticidad) (Gomez-Verjan et al., 2020; Jablonka & Noble, 2019). Por tanto, el epigenoma lo conforma todas aquellas marcas epigenéticas que se mantienen generación tras generación (memoria epigenética) presentes en las células germinales y que juegan un papel importante en la susceptibilidad de un individuo a tener un proceso de envejecimiento determinado o a manifestar ciertas enfermedades (epimutaciones) (Gomez-Verjan et al., 2020; King & Skinner, 2020; Skvortsova et al., 2018).

Por consiguiente, además de los genes, se transmitirá cómo se regulará la secuencia de ADN a través de la mitosis y meiosis, es decir, se heredarán los cambios epigenéticos presentes en los gametos parentales que conformarán el cigoto (Skvortsova et al., 2018). Por lo que, los factores epigenéticos son los que regulan la transcripción génica y son heredables (5-mC, modificaciones de histonas y ARNnc) (Skvortsova et al., 2018). Mientras que el proceso por el cual se transmiten estos cambios se le denomina herencia epigenética (Skvortsova et al., 2018).

No obstante, la herencia epigenética en mamíferos es más compleja que en plantas o que en especies como el *C. elegans*, ya que, el epigenoma heredado en los gametos es reprogramado tras la fertilización y durante la formación de las células germinales primordiales (CGPs). Aunque se dé este proceso de remodelación y se reduzcan considerablemente las marcas epigenéticas, estas no son borradas en su totalidad y, en consecuencia, llegan a transmitirse a la siguiente generación (Skvortsova et al., 2018).

1.5.2. Principales modificaciones epigenéticas que se mantienen a través de las generaciones

Como ya se ha mencionado anteriormente, las epimutaciones son aquellas alteraciones que se dan en los mecanismos epigenéticos que se producen a través de la línea germinal y que tienen un carácter heredable (Skvortsova et al., 2018). Por consiguiente, los tipos de epimutaciones corresponden a los diferentes tipos de mecanismos epigenéticos: 5-mC, modificaciones en las histonas y cambios en los ARNnc (Skvortsova et al., 2018). En cuanto a los dos tipos de herencia epigenética (HEI y HET), ambos se engloban bajo el término de herencia epigenética meiótica ya que, se definen como la herencia epigenética a través del proceso de meiosis que se transmiten en las siguientes generaciones (F0, F1 y más allá) (Skvortsova et al., 2018).

Epimutaciones en la 5-mC del ADN

La 5-mC del ADN se considera uno de los factores epigenéticos más estables gracias a la existencia de mecanismos que añaden grupos metilo, tanto *de novo* como de mantenimiento (DNMTs) (Skvortsova et al., 2018). A pesar de esta estabilidad en tejidos somáticos, el patrón de 5-mC sufre dos reprogramaciones en el ciclo de vida de los mamíferos (Figura 8) (Skvortsova et al., 2018). La primera de todas se da en el momento de postfertilización, en la que se produce una desmetilación de manera globalizada del ADN del núcleo paterno y posteriormente, una caída de la 5-mC global en el cigoto hasta disminuir, en el punto más bajo, en el blastocito. Seguidamente, el genoma del embrión es remetilado tras su implantación (Skvortsova et al., 2018). No obstante, como ya se mencionó anteriormente, este proceso de reprogramación no se realiza en su totalidad en todo el genoma con la misma eficiencia, por lo que acaban manteniéndose aquellas marcas de 5-mC más persistentes (Skvortsova et al., 2018).

La segunda reprogramación se da en las CGPs. A pesar de estos dos momentos de reprogramación, las zonas hipermetiladas quedan casi intactas (Skvortsova et al., 2018). Muchas de estas zonas hipermetiladas coinciden con las áreas CpG situadas en los promotores de los genes, algunos asociados con la obesidad, funciones neuronales y metabólicas (Skvortsova et al., 2018).

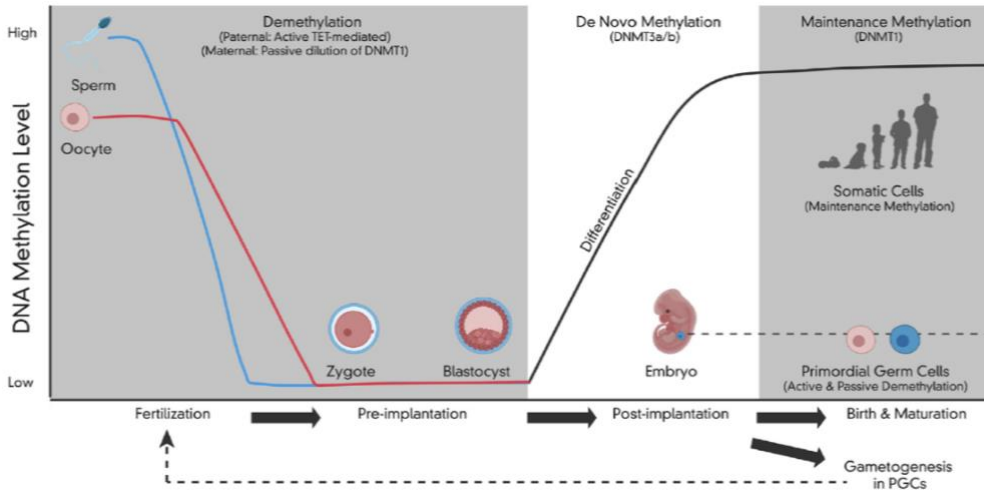


Figura 8. Niveles de 5-mC durante los periodos de reprogramación del epigenoma durante el desarrollo. Existen dos periodos de reprogramación: el primero antes de la fertilización en cada gameto por separado y la segunda en las CGPs durante la formación del embrión (Tuscher & Day, 2019).

Se ha demostrado en humanos que la obesidad paterna o una dieta materna HFD produce alteraciones en el patrón de 5-mC de genes asociados al metabolismo en la descendencia. Específicamente, los niveles de 5-mC del promotor del gen de leptina estaban incrementados en las siguientes generaciones (Kaspar et al., 2020) Ou et al., 2019; Illum et al., 2018; Zhou et al., 2018).

Epimutaciones en las histonas y ARNnc

La herencia epigenética a través de las modificaciones de histonas es bastante compleja dada su naturaleza dinámica (Kaspar et al., 2020). Además, durante la fase de espermatogénesis en mamíferos, las histonas son reemplazadas

por protaminas, que confieren un estado de empaquetamiento mayor, por lo que las histonas no son un marcador epigenético de herencia epigenética primordial (Kaspar et al., 2020). A pesar de esto, entre el 10 y el 18% de las histonas se mantienen intactas en el esperma humano (entre el 1 y 8% en ratón) (Kaspar et al., 2020).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que una dieta HFD durante la gestación produjo alteraciones en la acetilación y metilación de histonas en las siguientes generaciones (Bariani et al., 2020; Ramaiyan & Talahalli, 2018; Upadhyaya et al., 2017). Del mismo modo, se han identificado alteraciones en ARNnc debidas a una dieta paterna con HFD en la descendencia (Kaspar et al., 2020). Además, la obesidad paterna inducida por dieta HFD produce una alteración de los niveles de miRNAs que, al mismo tiempo, tienen una función reguladora de 5-mC del esperma en ratones (Gapp & Bohacek, 2018). Al mismo tiempo, se encontró una disminución de los niveles de 5-mC como consecuencia del aumento de *miR-29* que tiene como gen diana la *Dnmt3a*, lo que provocó un estado de hipometilación global del ADN que fue transmitido a la descendencia, predisponiendo a la obesidad a las siguientes generaciones (Gapp & Bohacek, 2018).

1.5.3. Herencia epigenética intergeneracional y transgeneracional

La herencia epigenética a través de la línea germinal se centra en investigar cómo los factores ambientales a los que han estado expuestos los progenitores puede influenciar a la descendencia (Gapp & Bohacek, 2018). Es decir, el impacto del factor ambiental sobre la maquinaria epigenética en la descendencia sin haber estado expuesta al mismo (Gapp & Bohacek, 2018).

Los cambios epigenéticos que se transmiten como consecuencia de la exposición directa de los progenitores (F0) a un factor ambiental que los provoca, y que se mantienen a través de las generaciones (indirectamente expuestas) a través de la línea germinal se le denomina HEI. Pero, cuando los cambios se mantienen sin haber ningún tipo de exposición al factor ambiental se considera HET (Blake & Watson, 2016).

Es importante diferenciar, del individuo que estuvo expuesto al factor ambiental inductor de los cambios epigenéticos, diferentes variables como el sexo, el momento del desarrollo y la duración de la exposición al factor ambiental. Esto es debido a que dependiendo de estas variables, la intensidad de los cambios será mayor o menor y afectará a más o menos generaciones (Figura 9) (King & Skinner, 2020).

Está bien documentado que los primeros estadios del desarrollo hacen al individuo más susceptible ante la exposición a factores ambientales, lo que genera que se produzcan con mayor intensidad cambios en su epigenoma. Éstos determinarán el fenotipo adulto y que sea transmitido a las siguientes generaciones (King & Skinner, 2020).

Se ha demostrado que en humanos las condiciones ambientales durante el estadio prenatal y la infancia son cruciales y más susceptibles de desarrollar cambios epigenéticos que afectan al desarrollo neuronal y a la cognición (Reuben, 2018; Fatima et al., 2017; van Bodegom et al., 2017). Por ejemplo, se ha encontrado una fuerte asociación entre la nutrición temprana, como la dieta materna, con el riesgo de tener enfermedades metabólicas o enfermedades cardiovasculares en la edad adulta (Gomez-Verjan et al., 2020). Otros factores de riesgo como el alcohol y el consumo de tabaco durante el embarazo se asocia con alteraciones en el neurodesarrollo de la descendencia (Gomez-Verjan et al., 2020).

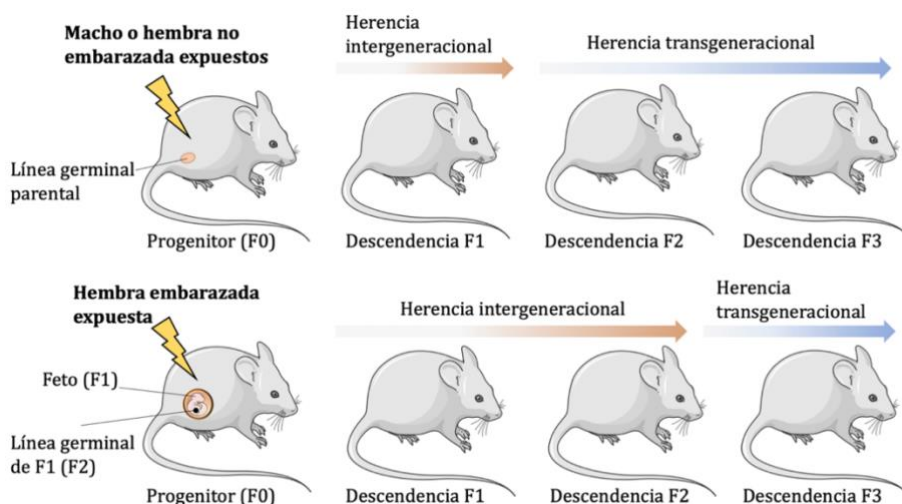


Figura 9. Exposición a un factor ambiental que produce cambios epigenéticos a través de la línea germinal y que se transmiten a las siguientes generaciones dependiendo del sexo y el momento de exposición. Según el momento de exposición podemos tener un efecto intergeneracional en la primera generación (F1) (machos expuestos o hembras no embarazadas) o hasta la segunda generación (F2) (en el caso de hembras embarazadas). Este tipo de herencia se caracteriza por mostrar el fenotipo parental estando indirectamente expuesto al factor causante. La HET se produce cuando la descendencia mantiene el fenotipo parental sin haber estado expuesto al factor ambiental (F2 y tercera generación (F3) en el caso de machos o hembras no embarazadas expuestos o sólo F3 en el caso de hembras que estuvieron expuestas durante el embarazo). Forma adaptada de (King & Skinner, 2020; Skvortsova et al., 2018).

1.5.4. Herencia epigenética y enfermedades en la edad adulta

Es importante y de elevada dificultad, la investigación de la heredabilidad de las modificaciones epigenéticas y su papel en la predisposición a ciertas enfermedades (Gomez-Verjan et al., 2020). El estudio de la asociación entre los cambios epigenéticos y el riesgo de padecer enfermedades se le denomina epidemiología epigenética (Gomez-Verjan et al., 2020).

La exposición a un ambiente hostil como, por ejemplo, la exposición a tóxicos, alteraciones en la nutrición o el estrés, provocan cambios en el epigenoma de la línea germinal (Nilsson et al., 2018). Estas epimutaciones heredadas por los ancestros no provocan las enfermedades directamente, sino que, las epimutaciones generan un patrón de expresión génica alterado en un tipo de tejido específico de la descendencia, lo que promueve alteraciones en el transcriptoma. Dicha alteración es la que crea la vulnerabilidad a padecer ciertas enfermedades (Nilsson et al., 2018).

Las experiencias en la edad temprana pueden tener un impacto sobre el envejecimiento normal o patológico (Ambeskovic et al., 2020). Según la hipótesis del origen del desarrollo de la salud y enfermedad, la exposición, tanto fetal como durante la infancia a factores ambientales extremos, como el estrés, la malnutrición o la exposición a tóxicos puede predisponer a ciertas enfermedades en la edad adulta a las siguientes generaciones a través de los factores epigenéticos (Figura 10) (Ambeskovic et al., 2020).

Por tanto, no sólo es importante la exposición a factores ambientales estresantes durante el desarrollo del individuo, sino, los factores estresantes a los que estuvieron expuestos los progenitores y cómo a través de los mecanismos epigenéticos, a pesar de los periodos de reprogramación, se transmiten a la descendencia a través de la línea germinal (Ambeskovic et al., 2020). La severidad y el tiempo de exposición a estos cambios determinará las consecuencias en la salud y si se manifestará alguna patología o no en la descendencia (Ambeskovic et al., 2020). Por tanto, la ventana de exposición a factores epigenéticos es muy importante (Casavilca-Zambrano et al., 2019). Las modificaciones pueden ocurrir en diferentes etapas de la vida, tales como el desarrollo gestacional, el neonatal, la pubertad, la menopausia y en edades avanzadas (Casavilca-Zambrano et al., 2019). Estos son puntos críticos para el individuo, que dependiendo del tiempo de

exposición e intensidad del factor ambiental provocará una mayor susceptibilidad a modular la maquinaria epigenética, y en consecuencia, de manifestar enfermedades (Casavilca-Zambrano et al., 2019).

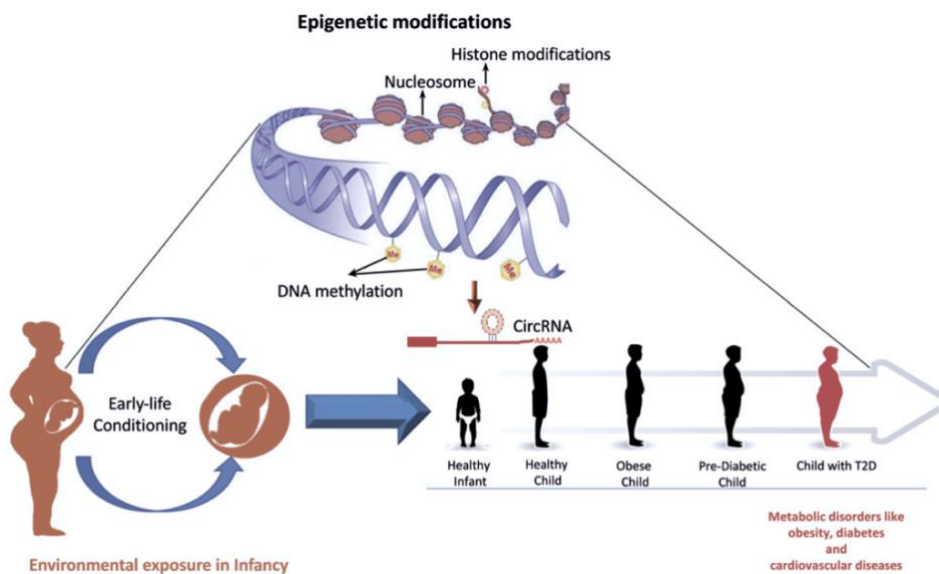


Figura 10. Ejemplo de exposición temprana a un factor ambiental durante el periodo de gestación. La exposición temprana a un estilo de vida poco saludable que predispone a la obesidad genera cambios en la maquinaria epigenética del embrión con mayor intensidad durante el desarrollo embrionario, aumentando la vulnerabilidad del individuo a padecer enfermedades en la edad adulta como, por ejemplo, diabetes mellitus (DM), obesidad, alteraciones metabólicas, enfermedades cardiovasculares, que a su vez, aumentan el riesgo para manifestar enfermedades neurodegenerativas (Agarwal et al., 2018).

Por ejemplo, a partir del análisis de Barker, un epidemiólogo británico, se evidenció la relación entre el desarrollo embrionario y las enfermedades en la edad adulta. A partir de sus observaciones, se empezó a remarcar la susceptibilidad del embrión ante la exposición a diferentes factores ambientales a través de la madre que son cruciales para el fenotipo adulto (Carpinello et al., 2018). En esta línea, se publicaron estudios sobre la programación fetal que, posteriormente, formaría las bases de la denominada hipótesis de Barker (Carpinello et al., 2018). Este identificó un aumento de la ratio de muertes por enfermedades cardiovasculares en las

regiones de Inglaterra y Gales, junto con un aumento de la ratio de la mortalidad de infantes (Carpinello et al., 2018). Posteriormente, se identificaron que las muertes neonatales estaban asociadas a un bajo peso al nacer y que, a su vez, estos solían ser más frecuentes en las madres que pasaron malnutrición (Carpinello et al., 2018). A partir de estas evidencias destacó la importancia del ambiente intrauterino como uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de enfermedades (Carpinello et al., 2018). En consecuencia, describió el desarrollo fetal y el ambiente intrauterino como el punto de inicio para la programación de enfermedades de aparición tardía (Carpinello et al., 2018).

Por otra parte, existen diversos estudios con humanos como, por ejemplo, mujeres que sufrieron condiciones altamente adversas (hambruna, guerra, desastres naturales o grandes infecciones) durante el embarazo tenían una descendencia con alta incidencia de alteraciones cardíacas, diabetes, enfermedades neurológicas y psiquiátricas en la edad adulta (Ambeskovic et al., 2020). Uno de ellos fue el que se realizó con un grupo de personas que sufrieron experiencias traumáticas en el Holocausto (Dashorst et al., 2019). La descendencia de los supervivientes tenía un riesgo mucho más elevado de sufrir trastorno por estrés postraumático, ya que, presentaban unos niveles disminuidos de cortisol, un marcador clínico del trastorno, el cual se había transmitido intergeneracionalmente (Ambeskovic et al., 2020).

Otro estudio relevante en la literatura científica fue el de la hambruna holandesa (Carpinello et al., 2018; Hajj et al., 2014). Este acontecimiento evidencia la importancia de la herencia epigenética y el desarrollo embrionario. Durante el invierno de 1944 y 1945, finalizando la Segunda Guerra Mundial, hubo un periodo de hambruna en la población de los Países Bajos (Carpinello et al., 2018; Hajj et al., 2014). La administración militar alemana impuso un embargo sobre todos los transportes de comida dejando a los holandeses en un estado de escasez de

alimentos extrema (Carpinello et al., 2018). Se reportó que la ingesta calórica aproximada por persona fue menor a las 500/600 calorías por día. En este caso, la descendencia de las mujeres que sufrieron este déficit calórico durante el embarazo (progenitores, F0) nació con un peso más bajo comparado con los nacidos antes del periodo de hambruna (primera generación, F1) (Carpinello et al., 2018). Posteriormente, se realizó un seguimiento de las mujeres que nacieron con infrapeso de la F1 (Carpinello et al., 2018). En primer lugar, las hijas que estuvieron expuestas a la hambruna durante el primer y segundo trimestre de su desarrollo embrionario (F1) tuvieron una descendencia (F2) con un peso al nacer menor al de las madres no expuestas a la hambruna. En cambio, las hijas (F1) que estuvieron expuestas durante el tercer trimestre tuvieron una descendencia (F2) con un peso equivalente a los nacidos que no estuvieron expuestos (Figura 11) (Carpinello et al., 2018). Como consecuencia, se observó en la descendencias F1 y F2 una elevada incidencia de obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, entre otras (Carpinello et al., 2018; Hajj et al., 2014).

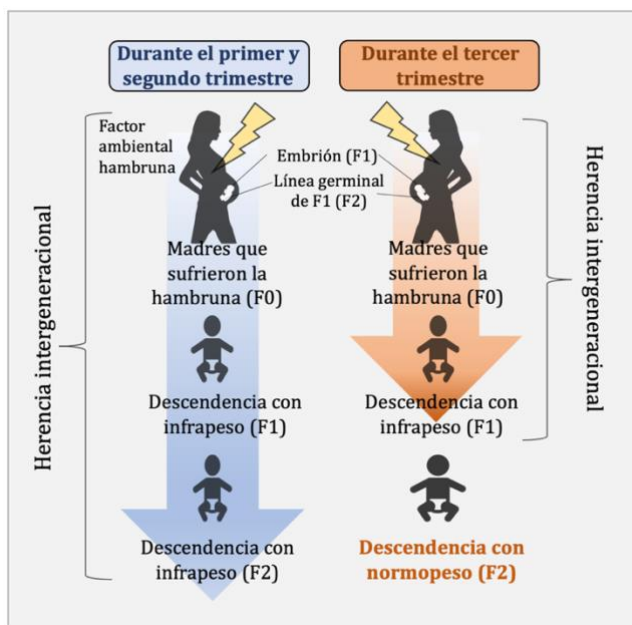


Figura 11. Efecto intergeneracional de la hambruna holandesa. La potencia del efecto de la hambruna depende del momento del desarrollo embrionario en el que se encuentre. Etapas más tempranas (primer y segundo trimestre) hacen que el efecto se mantenga hasta la F2 mientras que la exposición más tardía (tercer trimestre) tiene un efecto hasta la F1 (Carpinello et al., 2018).

Estos datos evidencian que el fenotipo de un individuo no está determinado únicamente por sus genes, sino por su interacción constante con el ambiente, teniendo un mayor impacto en etapas tempranas del desarrollo, como es un ambiente subóptimo intrauterino que predispone al individuo a manifestar patologías en la edad adulta (Zambrano, 2009). Con esto se evidenció la importancia de la reprogramación intrauterina temprana que juega un papel crucial en la programación del feto para producir cambios epigenéticos en respuesta al ambiente y, además, transmitirlos a la descendencia (Fernandez-Twinn et al., 2019; Carpinello et al., 2018; Horsthemke, 2018; Hajj et al., 2014). Es más, nos ayuda a distinguir entre el efecto de la herencia genética a través de la mutación de genes (genoma) que se caracteriza por ser más estable en el tiempo, mientras que la herencia epigenética se caracteriza por transmitir los cambios epigenéticos que regulan la expresión génica (epigenoma) y tiene un carácter reversible y dinámico, ya que, con el tiempo, estas marcas suelen desaparecer tras los procesos de reprogramación en pocas generaciones (Casavilca-Zambrano et al., 2019).

A pesar de todas estas evidencias, tanto en humanos como en animales, aún se desconocen exactamente los mecanismos moleculares que subyacen a estos procesos de heredabilidad a lo largo de las generaciones.

1.5.5. Nutrición y mecanismos epigenéticos

Uno de los factores ambientales más importantes relacionado con los mecanismos epigenéticos es la nutrición. Existen evidencias sobre la influencia de

la dieta como modulador de las marcas epigenéticas, por tanto, en la modulación de la expresión génica y su relación con la salud (Stevens et al., 2018; Tiffon, 2018).

La dieta de los progenitores tiene un efecto sobre la expresión génica de la descendencia, consecuentemente, una influencia en cómo será su proceso de envejecimiento, y al mismo tiempo, su predisposición a determinadas enfermedades (Johnson et al., 2017; Loche et al., 2018), transmitiendo ciertas marcas epigenéticas a las siguientes generaciones (Johnson et al., 2017; Loche et al., 2018; Zhang et al., 2017). En este caso, la frase “somos lo que comemos” no es casual, puesto que los micronutrientes modulan directamente los niveles de 5-mC y sus enzimas que regulan la expresión de genes asociados a diferentes patologías (Stevens et al., 2018; Tiffon, 2018).

Muchos micronutrientes presentes en la dieta son importantes donantes o cofactores para diferentes reacciones, tales como: los folatos, la vitamina B12, la metionina, la betaína o la colina (Stevens et al., 2018). Además, juegan un papel importante en la función de las enzimas como S-adenosil metionina (SAM), regulando los niveles de 5-mC (Stevens et al., 2018). Es más, es crucial para el desarrollo embrionario la ingesta materna de ciertos donantes de grupos metilo para evitar problemas graves de su desarrollo (Manta-Vogli et al., 2020; S. Wu et al., 2019; Spiegler et al., 2018). Por tanto, el tipo de dieta que tenga un individuo interfiere en la modulación de la expresión génica, sobretodo, durante los primeros años de vida, llegando sus efectos hasta la edad adulta (fenotipo adulto) y predisponiendo a la descendencia a un fenotipo sano o patológico (efecto transgeneracional) (Figura 12) (Tiffon, 2018).

Otros nutrientes beneficiosos para la salud y que están implicados en la modulación de los mecanismos epigenéticos son: las vitaminas A, B, C, D y E, el selenio, ácidos grasos omega-3, el RSV, oleuropeína, cúrcuma, las catequinas, el ginseng, las isoflavonas y las antiocianinas (Athanasopoulos et al., 2016). Mientras

que el selenio, el plomo, el cadmio, el arsénico, el aluminio, el etanol modulan los factores epigenéticos provocando un efecto perjudicial en la salud (Athanasopoulos et al., 2016).

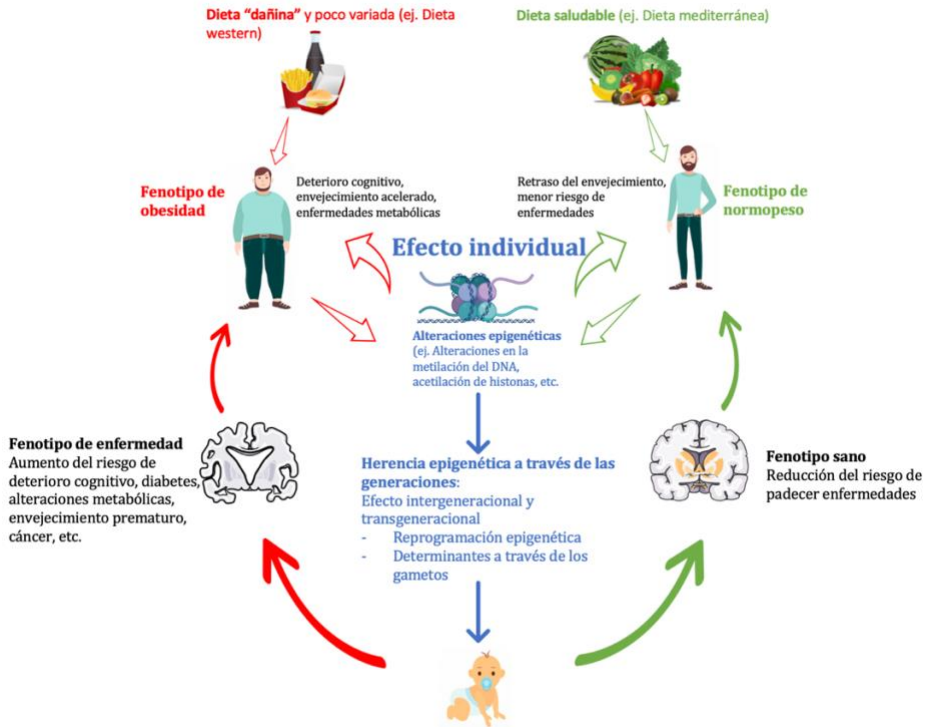


Figura 12. Dieta y epigenética. Efecto de la dieta en los mecanismos epigenéticos en el fenotipo individual y a través de las generaciones (herencia epigenética). Forma adaptada de (Tiffon, 2018).

Viendo la relación entre la nutrición y la salud se entiende la importancia que puede llegar a tener la nutrición como factor que promueve cambios epigenéticos y sus efectos sobre el desarrollo de un individuo. Además, predisponer a ciertas patologías como la diabetes, la obesidad, enfermedades neurodegenerativas o incluso trastornos mentales en la edad adulta (Stevens et al., 2018). Debido a que, tanto la dieta, como los mecanismos epigenéticos son susceptibles de cambios, ambos son una diana terapéutica muy atractiva para diversas enfermedades multifactoriales (Stevens et al., 2018).

1.6. Dieta y envejecimiento

1.6.1. Resveratrol

El RSV (3, 5, 4'-trihidroxi-estilbeno) es un polifenol natural de bajo peso molecular que pertenece a la familia de los estilbenos y que puede presentarse en dos configuraciones diferentes: *cis* y *trans* (Tian & Liu, 2020; Chaplin et al., 2018). La molécula puede transformarse de una isoforma a otra dependiendo de las condiciones en las que se encuentre, por ejemplo, en condiciones de pH mayores a 11 o radiación UV (Figura 13) (Pannu & Bhatnagar, 2019). La forma *trans* es más potente que la *cis*, ya que tiene mayor actividad biológica (Tian & Liu, 2020; Pannu & Bhatnagar, 2019).

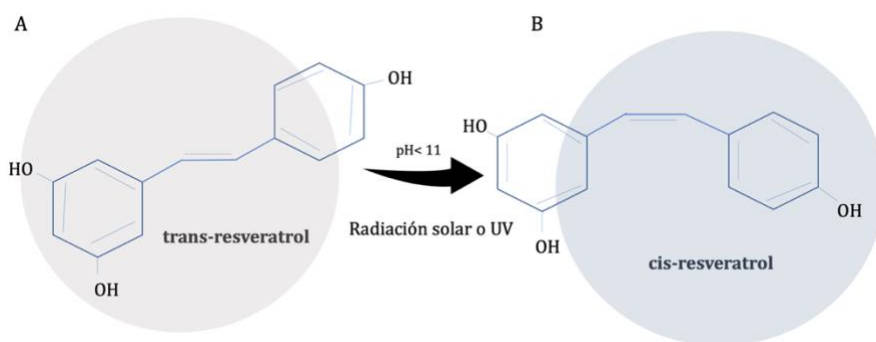


Figura 13. Estructura química del RSV y sus dos isoformas bajo la influencia de factores externos. A) Trans- y B) Cis- . Forma adaptada de (Pannu & Bhatnagar, 2019).

El RSV es una molécula que actúa como mecanismo defensivo de las plantas (fitoalexina) ante agresiones externas, ya sea por un ataque por patógenos (hongos, bacterias), daños físicos o radiación solar. La planta ante condiciones de estrés sintetiza RSV como respuesta al daño (Tian & Liu, 2020). Está presente en más de 100 tipos de plantas y en múltiples alimentos como: las uvas, el vino tinto, los cacahuetes, frutos del bosque, el chocolate negro y el té (Tabla 4) (Tian & Liu, 2020).

Productos alimentarios	Rango de concentración
Uvas	0.16-3.54 µg/g
Piel de uva seca	~24.06 µg/g
Zumo de uva negra	~0.5 mg/L
Zumo de uva blanca	~0.05 mg/L
Vino tinto	0.1-14.5 mg/L
Vino blanco	0.1-2.1 mg/L
Cacahuetes	0.02-1.92 µg/g
Pistachos	0.09-1.67 µg/g

Tabla 4. Concentración de RSV en algunos alimentos (Carrizzo et al., 2013)

El RSV fue detectado por primera vez en la raíz de la planta *Veratrum grandiflorum* (Pannu & Bhatnagar, 2019). Pero, científicamente, empezó a ser un foco de atención en la investigación sobre la década de 1990, a partir de la noticia de que, a pesar del consumo de una HFD en la población francesa había una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares y un alto consumo de vino tinto. A partir de estos datos, el papel protector del vino tinto ante enfermedades coronarias se conoce como la paradoja francesa (Pannu & Bhatnagar, 2019).

1.6.1.1. Biosíntesis, estabilidad y biodisponibilidad

El RSV se sintetiza en las plantas a partir de la vía de fenolipropanoide en respuesta a un estímulo externo estresante. Por tanto, el RSV es un metabolito secundario en respuesta al estrés (Pannu & Bhatnagar, 2019).

El RSV es un metabolito de rápida absorción y baja biodisponibilidad (<1%) (Griñán-Ferré et al., 2021). Esto se explicaría por su rápido metabolismo, aun así, destaca su gran bioactividad en múltiples propiedades terapéuticas (Quadros Gomes et al., 2018). Tras su ingesta, el RSV o sus precursores viajan por el tracto gastrointestinal y aproximadamente el 70% es absorbido por difusión transepitelial de manera activa en contra de gradiente desde el intestino (Chaplin

et al., 2018). La forma libre de RSV se une a la albumina o a lipoproteínas para su distribución por el torrente sanguíneo hasta el hígado, a través de la vena porta, donde se llevará a cabo su metabolismo hepático (Pannu & Bhatnagar, 2019; Chaplin et al., 2018).

Se han detectado, tras una única administración de RSV en humanos, el RSV y hasta 6 metabolitos conjugados en plasma (Brown et al., 2010). Por ejemplo, se pueden detectar en diferentes tejidos, compuestos derivados del RSV como el piceatannol (resultado de la hidroxilación del RSV en el hígado por el citocromo p450) y el dihidroresveratrol (sintetizado por la microbiota intestinal), aunque los metabolitos más abundantes en seres humanos y roedores son el trans-resveratrol-3-O-glucurónido y el trans-resveratrol-3-O-sulfato (Chaplin et al., 2018).

1.6.1.2. Dosis y toxicidad del RSV

Consecuentemente, la biodisponibilidad del RSV y sus metabolitos dependen del tiempo de administración (aguda o sostenida) y la dosis, por lo que la acción de esta molécula es dosis-dependiente (Chaplin et al., 2018). Se han sugerido diferentes dosis de RSV en diferentes enfermedades en humanos en las que se ha demostrado un efecto beneficioso (Tabla 5) (Kulashekar et al., 2018).

En un estudio con humanos para evaluar la bioseguridad del RSV se les administró a los voluntarios durante 29 días diferentes dosis de 0.5, 1, 2.5 y 5g. Sólo algunos de los individuos a los que se les administró las dos dosis más elevadas se quejaron de molestias gastrointestinales leves (nauseas, flatulencias, molestia abdominal y diarrea) (Brown et al., 2010). No se ha reportado más información destacable en cuanto a su toxicidad, por lo general el RSV es seguro y bien tolerado en humanos en altas dosis por vía oral (Turner et al., 2015).

Enfermedades	Beneficios	Dosis recomendada (mg)
Enfermedad cardiovascular	Disminuye la presión arterial sistólica	≥ 150
Obesidad	Disminuye los niveles de glucosa y TG	150
Diabetes	Disminuye los niveles de colesterol y hemoglobina A _{1c}	250
EA	Atenúa las puntuaciones en ADCS-ADL (test de evaluación del deterioro cognitivo)	500-2000
Cáncer	Disminuye IDF-1 e IGFBP-3	500-5000

Tabla 5. Dosis recomendadas de RSV. Sugerencias de dosis diarias para adultos de un suplemento con RSV basadas en estudios que demuestran un efecto en humanos con diferentes patologías. Abreviaciones: Prueba de actividades de la vida diaria de la EA (ADCS-ADL *Alzheimer's Diseases Cooperative Study Activities of Daily Living*); la proteína IGFBP-3 (*Insulin like growth factor binding protein 3*). Forma adaptada de (Kulashekar et al., 2018).

1.6.1.3. Beneficios del consumo de una dieta rica en RSV

El RSV se caracteriza por su acción pleiotrópica, es decir, tiene múltiples propiedades farmacológicas debido a su acción en múltiples dianas, además, de que actúa en diferentes tejidos. Por lo que lo hace muy atrayente en el área terapéutica (Pannu & Bhatnagar, 2019).

Las principales funciones asociadas al RSV son la antioxidante y la antiinflamatoria (Griñán-Ferré et al., 2021). Pero se le han atribuido múltiples beneficios: antidiabético, antiobesidad, antienvjecimiento, anticancerígeno, neuroprotector, entre otros (Figura 14) (Griñán-Ferré et al., 2021). Esto es debido a que modula múltiples mecanismos implicados en el proceso de envejecimiento, como por ejemplo la SIRT1, el factor nuclear NRF2, la proteína Keap1, la inhibición del factor de transcripción NF-κB, la iNOS o la ciclooxigenasa (COX), entre otras (Pannu & Bhatnagar, 2019).

También se le ha asociado el nombre de senolítico natural debido a su acción específica eliminando células senescentes, marcador estrechamente relacionado

con procesos de envejecimiento (inflamación, senescencia celular, acortamiento de telómeros, etc.) (Russo et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, el EO es uno de los marcadores más asociados al proceso de envejecimiento y el RSV es capaz de revertirlo (Griñán-Ferré et al., 2021). Su función antioxidante hace que sea una diana terapéutica esencial para enfermedades asociadas al envejecimiento, a través de la regulación de enzimas antioxidantes, como la superóxido dimutasa (SOD), catalasa, glutatión reductasa, y glutatión peroxidasa (Y. R. Li et al., 2018).

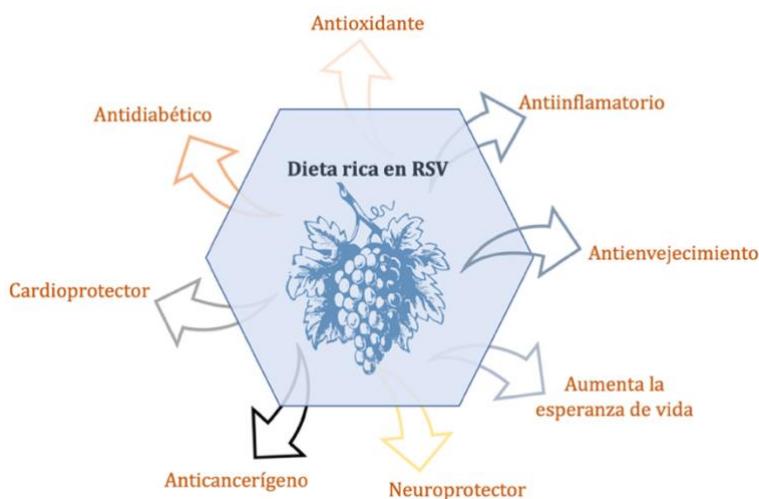


Figura 14. Principales beneficios del consumo de RSV. Forma adaptada de (Galiniak et al., 2019)

La acción neuroprotectora del RSV en el SNC se explica por su acción en diversos mecanismos en el cerebro que lo protegen frente al envejecimiento, el EO, la neuroinflamación, muerte neuronal, deterioro cognitivo y memoria (Sarubbo et al., 2017). Todo esto, contribuye a reducir el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas tipo EA, enfermedad de Parkinson o ELA (Sarubbo et al., 2017). Por ejemplo, Sarubbo y colaboradores demostraron que tras una administración oral de 28 días de RSV en ratas se mantuvo la masa cerebral y la

integridad mitocondrial (Sarubbo et al., 2017). Además, una administración crónica previno el descenso de los principales neurotransmisores asociados al envejecimiento (Sarubbo et al., 2017).

Una de las razones por la que los polifenoles tienen una acción antienviejimiento es debido a su acción antiinflamatoria (Verónica Palomera-Ávalos et al., 2018). Roedores envejecidos alimentados con una dieta rica en RSV mostraron un efecto antienviejimiento gracias a la disminución de citoquinas proinflamatorias en el hipocampo (Gomes et al., 2018; Palomera-Ávalos et al., 2018; Silva et al., 2019). Como se ha mencionado, la alteración de la estructura de las proteínas y su acumulación intra- y extracelular favorece el estado proinflamatorio en el SNC (Limonta et al., 2019), provocando la activación de la respuesta UPR para recuperar la homeostasis celular (Folch et al., 2017). El RSV disminuye la agregación de proteínas como la β A regulando las diferentes vías implicadas en la UPR y la neuroinflamación (Regitz et al., 2016).

Asociado a estos procesos, el RSV está implicado en la regulación de SIRT1 y AMPK (Veronica Palomera-Avalos et al., 2017). En primer lugar, SIRT1 está asociada a la regulación de diferentes respuestas, tanto fisiológicas como metabólicas, ante señales de estrés, regulando mecanismos de supervivencia celular (Lee et al., 2019). Por ejemplo, en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, modulación de la inflamación, EO, biogénesis mitocondrial, crecimiento axonal y plasticidad neuronal, por lo que favorece la longevidad de los organismos (Russo et al., 2020; Sarubbo et al., 2017). En segundo lugar, AMPK actúa como un sensor de balance energético actuando en respuesta a los cambios en los niveles de AMP/ATP, activándose cuando los niveles de glucosa son muy bajos (Russo et al., 2020). A su vez, AMPK regula negativamente la actividad de mTOR y positivamente la proteína PGC-1 α junto con SIRT1 (Russo et al., 2020).

1.6.2. Dieta grasa y resveratrol

1.6.2.1. *La dieta grasa como acelerador del proceso de envejecimiento*

Durante las últimas décadas del siglo 20 empezó a popularizarse un estilo de dieta llamada Western o comida rápida originaria de la cultura occidental, que destaca por contener altos niveles de grasas saturadas, cereales y azúcares procesados (Rohr et al., 2020). Junto al mayor consumo de este tipo de dietas empezaron a asociarse diferentes problemas de salud y enfermedades como la obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Rohr et al., 2020).

La HFD es uno de los factores que conformarían un ambiente obesogénico, junto con un nivel de actividad física bajo, consumo de alcohol, la influencia de la conducta alimentaria de los padres, el estado socioeconómico, una dieta poco variada y factores genéticos (Flores-Dorantes et al., 2020). Y lo más importante, la interacción entre factores ambientales y genéticos, que incrementa el riesgo de obesidad (Flores-Dorantes et al., 2020). A su vez, la obesidad es un factor de riesgo de otras enfermedades como diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, cáncer o síndrome metabólico (SM), (patologías altamente relacionadas entre si), además de ser un factor acelerador del envejecimiento implicado en procesos como el acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, disfunción mitocondrial, senescencia celular, etc (Salvestrini et al., 2019).

El consumo crónico de HFD está asociado al aumento del tejido adiposo, el cual induce la producción de ERO, desencadenando disfunción mitocondrial y el aumento de marcadores proinflamatorios como TNF- α , NF- κ B y citoquinas proinflamatorias (Tan & Norhaizan, 2019). Al mismo tiempo, el receptor PPAR funciona como un sensor regulando los niveles de proteínas y lípidos (Tan &

Norhaizan, 2019). La activación de este sensor va disminuyendo con la edad, lo que favorece la acumulación de grasa en el organismo (Tan & Norhaizan, 2019). Como consecuencia, el consumo de HFD está asociado el envejecimiento prematuro y a las enfermedades neurodegenerativas, ya que, promueve el daño celular gracias al desajuste metabólico que provoca (Tan & Norhaizan, 2019). Además, el SNC es muy sensible a la acumulación de ácidos grasos libres que contribuyen a un estado lipotóxico de dislipidemia que contribuyen al daño celular, a la alteración de la plasticidad sináptica y, finalmente, al deterioro cognitivo (Tan & Norhaizan, 2019).

1.6.2.2. Efecto del RSV en enfermedades asociadas a la obesidad y al envejecimiento

Síndrome metabólico

El SM se caracteriza por presentar diversas condiciones como hipertensión, hiperglicemia, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, hiperlipidemia y obesidad (Finicelli et al., 2019; Pannu & Bhatnagar, 2019). Además, se asocia con un mayor riesgo de padecer otras enfermedades como diabetes tipo 2 (DT2) y enfermedades cardiovasculares (Chaplin et al., 2018).

Existen cuatro parámetros implicados en el inicio y progresión del SM: 1) la resistencia a la insulina, 2) inflexibilidad metabólica y disfunción mitocondrial, 3) adiposopatía e 4) inflamación (Finicelli et al., 2019).

El RSV presenta múltiples beneficios, ya descritos anteriormente, que hacen que sea un tratamiento idóneo para este tipo de alteraciones, ya que, regula procesos relacionados con el aumento el gasto energético a través de la biogénesis mitocondrial, disminución de la acumulación de grasa a través de la activación de la SIRT1 (Pannu & Bhatnagar, 2019).

Obesidad

La obesidad se caracteriza por un exceso de grasa corporal debido a un desequilibrio energético entre los niveles de ingesta calórica y gasto energético (actividad física) de etiología multifactorial (Figura 15)(Flores-Dorantes et al., 2020; Blüher, 2019). Se cuantifica mediante el parámetro de índice de masa corporal, dividiendo el peso por la altura (Kg/m^2), mediante el cual se establecen unos intervalos de clasificación del estado del individuo (según la OMS bajo peso <18.5 , normopeso $18.5-24.9$, sobrepeso $25-29.9$, obesidad > 30) (Suarez & Sanchez, 2018).

En los últimos 50 años se ha experimentado un incremento de la prevalencia de la obesidad a nivel mundial (Blüher, 2019). Incluso se ha convertido en uno de los factores de riesgo más importantes de enfermedades como el SM, enfermedades cardiovasculares, DT2, cáncer, osteoartritis o apnea del sueño (Salvestrini et al., 2019).

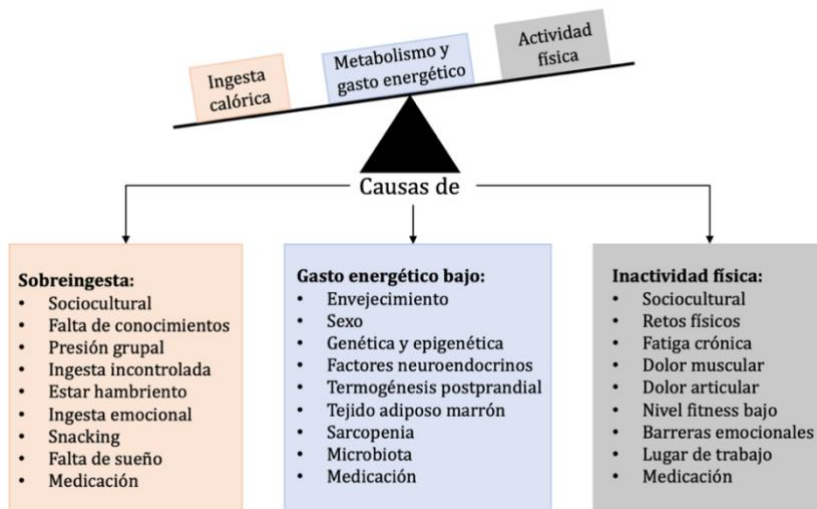


Figura 15. Factores que pueden influenciar el balance energético positivo crónico causando la obesidad. La ganancia de peso es el resultado de la combinación de un incremento en la ingesta

calórica, un gasto energético bajo debido a una baja actividad física. Forma adaptada de (Blüher, 2019).

Los principales beneficios del RSV en relación con la obesidad incluyen la regulación de la dislipidemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, procesos inflamatorios, además de efectos similares a la restricción calórica (Kulashekar et al., 2018).

La activación de SIRT1 hace del RSV una molécula antiobesidad, ya que, SIRT1 activa PPAR γ y 1 α y AMPK, las cuales regulan la biogénesis mitocondrial, la activación de la oxidación de ácidos grasos y la inhibición de la síntesis de ácidos grasos (Kulashekar et al., 2018; Palomera-Avalos et al., 2017). En cuanto al efecto antiobesidad del RSV, por un lado, se ha obtenido en estudios *in vitro*, que actúa a nivel de preadipocitos, induciendo procesos de apoptosis e inhibición de la proliferación y diferenciación de estos y activa procesos de lipólisis en adipocitos blancos maduros (Chaplin et al., 2018). Por otro lado, inhibe de la lipogénesis *de novo* y promueve los adipocitos marrones (Chaplin et al., 2018). Además, se ha demostrado que hombres obesos que consumieron RSV durante un mes, mostraron una reducción de lípidos hepáticos, de glucosa en plasma y una reducción de la presión arterial (Quadros Gomes et al., 2018).

Diabetes mellitus

La DM es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por presentar hiperglicemia y resistencia a la insulina siendo su etiología multifactorial (Huang et al., 2020). Las personas que sufren DM pueden llegar a sufrir otras complicaciones como: nefropatía diabética, neuropatía, retinopatía y cardiomiopatía (Huang et al., 2020). Está demostrado que el RSV mejora la sensibilidad a la insulina a través de la regulación de los niveles de insulina, el factor IGF y glucosa en sangre a través de la activación de AMPK y SIRT1 en humanos con

DM (Huang et al., 2020). Además, hay evidencia de que el RSV reduce la glicemia, insulinemia y mejora la resistencia a la insulina en ratones a los que se le indujo a través de la dieta (Chaplin et al., 2018). También se ha comprobado como el RSV incrementa la sensibilidad a la insulina a través de la regulación de vías asociadas con el EO, lo que lleva a una regulación de la señalización de la insulina mucho más eficiente en pacientes con DT2 (Li et al., 2018). Al mismo tiempo, el RSV mejora los niveles de EO e inflamación a través de la inhibición de $TNF\alpha$ y $NF-\kappa B$ inducidos por HFD y reduce la expresión de interleucinas (IL) como IL-1 β , IL-1 e IL-6 bajo la condición de DM (Salvestrini et al., 2019).

1.7. El ratón SAMP8 como modelo para el estudio del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento

1.7.1. Origen del ratón SAMP8

Existen diferentes modelos animales experimentales para la investigación de los procesos de envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. Uno de ellos es el ratón con senescencia acelerada SAMP8 el cual fue generado a partir de cruces de la cepa de ratones comunes AKR/J por el Dr. Takeda en la Universidad de Kioto (Akiguchi et al., 2017). Tras varios cruces endogámicos, algunos de los ratones de esta colonia fueron seleccionados fenotípicamente por presentar características de envejecimiento prematuro (Akiguchi et al., 2017). Posteriormente, se desarrollaron diferentes subtipos de la cepa SAMP, que presentaba un fenotipo de senescencia acelerada y SAM resistente (SAMR), que mantenía rasgos sanos (Akiguchi et al., 2017). Posteriormente, se generaron 11 líneas de ratones SAMP que mostraron fenotipos específicos asociados a enfermedades relacionadas con el

envejecimiento; SAMP1-11 y las líneas R; SAMR1, 4 y 5 (Liu et al., 2020). Ambas se diferencian por la esperanza de vida donde el SAMP tiene un promedio de 9,7 meses y el SAMR 16,3 meses de vida (Akiguchi et al., 2017).

1.7.2. Características generales del ratón SAMP8

El ratón SAMP8 presenta múltiples características que lo hacen interesante en comparación con otros modelos animales transgénicos utilizados para la investigación de la EA (Liu et al., 2020). Las características patológicas que destacan en el SAMP8 son el deterioro de la memoria y aprendizaje (Griñán-Ferré et al., 2018a). Además, el ratón SAMP8 presenta diferente sintomatología asociada al deterioro y envejecimiento prematuro (Figura 16) (Griñán-Ferré et al., 2018a; Morley et al., 2012; Takeda, 2009; Pallas et al., 2008):

- 1) Caída y pérdida del brillo del pelo, lesiones peri-oftálmicas, reducción de la actividad física y lordocifosis.
- 2) Deterioro sensoriomotor y pérdida auditiva.
- 3) Alteraciones del ritmo circadiano.
- 4) Disfunción inmunológica, astrogliosis en el hipocampo, neuroinflamación crónica, EO y disfunción mitocondrial.
- 5) Alteración del metabolismo de la glucosa.
- 6) Alteración de la barrera hematoencefálica.
- 7) Atrofia cortical, pérdida neuronal y atrofia de neuronas aminérgicas y colinérgicas.
- 8) Reducción de las espinas dendríticas del hipocampo e incremento de la distrofia axonal.
- 9) Alteración de la vía amiloidogénica y p-tau en hipocampo.
- 10) Esperanza de vida más corta en comparación con SAMR1.

11) Alteración de la memoria y aprendizaje, trastornos emocionales y ansiedad.

Todas estas alteraciones asociadas con un envejecimiento acelerado se pueden observar en el SAMP8 a edades muy tempranas, entre los 2 a 6 meses de edad (Akiguchi et al., 2017).

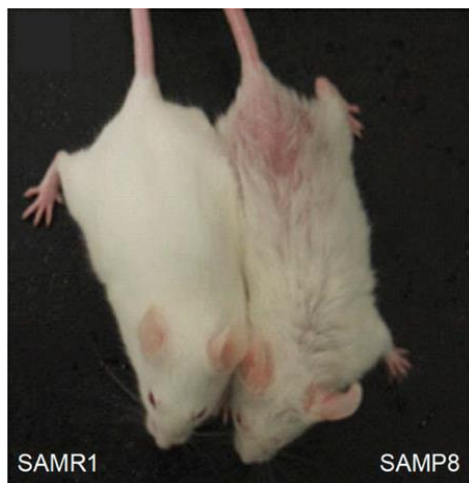


Figura 16. Diferencias fenotípicas entre el ratón SAMP8 y el ratón SAMR1. A la derecha el ratón SAMP8 con alopecia parcial a los 6 meses de edad comparado con el ratón SAMR1 situado a la izquierda (Delerue et al., 2013).

1.7.3. Características bioquímicas del ratón SAMP8

1.7.3.1. Neuroinflamación, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

Es característico del SAMP8 una neurodegeneración cerebral y sistémica, no obstante, el hipocampo es de las estructuras más afectadas mostrando una elevada astrogliosis cuantificada a través del marcador de la proteína de activación glial (GFAP), presentando niveles muy elevados a los 2 meses y que empeora con la edad (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018a). Esta neuroinflamación crónica en el hipocampo explica la alteración en la memoria y aprendizaje tan marcada que presenta este modelo animal, ya que, se observa un deterioro progresivo de las

neuronas colinérgicas del hipocampo y corteza cerebral a los 8 meses de edad (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018a).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la inflamación junto con el EO son marcadores asociados a el proceso de neurodegeneración. El modelo SAMP8 presenta diversos marcadores bioquímicos que demuestran un estado de inflamación crónico que llevan a un estado de envejecimiento prematuro, característico del SAMP8 (Griñán-Ferré, Palomera-Ávalos, et al., 2016). Los marcadores proinflamatorios se mantienen elevados desde temprana edad y van aumentando con el tiempo en comparación con su cepa de referencia SAMR1. Por ejemplo, el ratón SAMP8 muestra niveles elevados de NF- κ B (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018a). El estado de neuroinflamación crónica presente en SAMP8 se asocia con la presencia de niveles elevados de EO, el deterioro cognitivo-conductual y alteración de la proteostasis asociadas al envejecimiento patológico (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018a). La disfunción mitocondrial es uno de los marcadores más importantes en el proceso de envejecimiento junto con el aumento de ERO (Albasanz et al., 2011). Esta alteración es de las más demostradas en el modelo SAMP8 (Albasanz et al., 2011). Así mismo, presenta niveles aumentados de ERO como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y una disminución de enzimas antioxidantes como SOD1, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en comparación con el modelo SAMR1 (Albasanz et al., 2011). Además, se ha descrito que a los 5 meses de edad el ratón SAMP8 presenta un incremento de la peroxidación lipídica en comparación con SAMR1 (Pallas et al., 2008).

Por tanto, el ratón SAMP8 es un modelo que representa bien el fenotipo de neurodegeneración y envejecimiento asociado a mecanismos de EO, disfunción mitocondrial y neuroinflamación, factores que juegan un papel crucial en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas.

En cuanto al proceso de ERE, el ratón SAMP8 presenta un incremento de las proteínas PERK, eIF-2 α e IRE1 α en comparación con SAMR1 (Liu et al., 2020). Además, el ratón SAMP8 presenta incrementados los marcadores de ERE en el cerebro (Liu et al., 2020). Asociado al mecanismo de la UPR están los procesos de autofagia implicados en la degradación y eliminación de orgánulos y proteínas dañadas. Dicho proceso está alterado en pacientes con EA (Wang et al., 2017). Concretamente, el mecanismo de autofagia lisosomal se ve alterado en el cerebro del ratón SAMP8 a los 5 meses de edad (Liu et al., 2020). Es decir, los marcadores de autofagia se ven incrementados en el ratón SAMP8 a partir de los 5-6 meses de edad (Liu et al., 2020).

1.7.3.2. Marcadores asociados a EA

Asociado al procesamiento de la proteína APP, el ratón SAMP8 muestra un incremento de la expresión génica de la *PSEN1* y *PSEN2*, asociadas con el complejo de la γ -secretasa (Xiao et al., 2020). La mutación de este complejo está asociada con el aumento de la vía amiloidogénica de la APP presente en la EA familiar (Xiao et al., 2020). El ratón SAMP8 presenta niveles elevados de p-tau en diferentes áreas cerebrales como el hipocampo, cerebelo, estriado y corteza cerebral en comparación con SAMR1 (Albasanz et al., 2011). En cuanto a la deposición de la proteína β A, existe una gran controversia respecto a la similitud entre las PS en SAMP8 y en humanos (Albasanz et al., 2011). Esto es debido a que las PS que presenta el ratón SAMP8 no se tiñen con thioflavin S (Albasanz et al., 2011). Consecuentemente, algunos investigadores consideran que el deterioro cognitivo del modelo SAMP8 es independiente de la β A (Porquet et al., 2015; Ashe & Zahs, 2010). Por tanto, lo consideran un modelo óptimo para el estudio de las primeras alteraciones asociadas a la EA (Porquet et al., 2015; Ashe & Zahs, 2010). No obstante, otros expertos afirman que se encuentran depósitos de β A en diferentes regiones cerebrales a partir de los 10 meses de edad (Kametani & Hasegawa, 2018;

Liu et al., 2020). O que presenta una alteración del procesamiento de la APP sin llegar a presentar PS (Porquet et al., 2015; Puigoriol-Illamola et al., 2018).

1.7.3.3. Cambios epigenéticos asociados a la neurodegeneración

El hecho de que el ratón SAMP8 presente esta diversidad de marcadores neuropatológicos asociados a procesos de neurodegeneración siendo un modelo seleccionado fenotípicamente, hace que los mecanismos epigenéticos cobren especial relevancia, ya que, tiene un mayor peso en el origen de los mecanismos fisiopatológicos implicados en el proceso de envejecimiento patológico, a diferencia de un modelo transgénico (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018a). Además, como ya se ha comentado en apartados anteriores, la maquinaria epigenética es susceptible de cambio ante factores ambientales como el ejercicio (Fernandes et al., 2017), la dieta (Veronica Palomera-Avalos et al., 2017), el estrés (Puigoriol-Illamola et al., 2020) o el enriquecimiento ambiental (Griñán-Ferré, Puigoriol-Illamola, et al., 2016). En conjunto todos los datos anteriores incrementaron el interés en profundizar en los mecanismos epigenéticos en el modelo SAMP8.

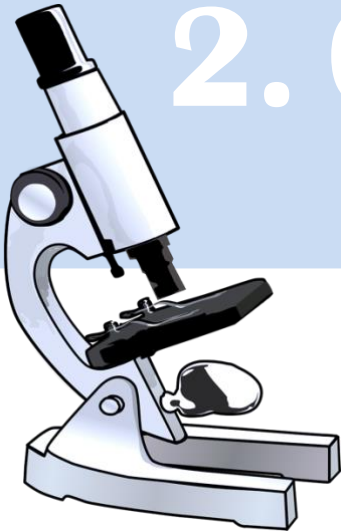
Se han identificado las alteraciones epigenéticas que presenta el ratón SAMP8 en comparación con SAMR1. En primer lugar, se han demostrado alteraciones en los niveles de 5-mC e 5-hmC en hembras SAMP8 a 2 y 9 meses de edad en comparación con el ratón SAMR1 (Cosín-Tomás et al., 2018). Concretamente, se observaron niveles disminuidos de 5-mC en SAMP8 a los 2 meses de edad. A los 9 meses el ratón SAMR1 presentaba niveles disminuidos en comparación a los 2 meses, pero, el SAMP8 no presentó cambios con la edad (Cosín-Tomás et al., 2018). En segundo lugar, los niveles de 5-hmC incrementaron a los 2 meses y se mantuvieron elevados a los 9 meses en comparación a SAMR1 (Cosín-Tomás et al., 2018). Estos datos demuestran la alteración de la maquinaria epigenética presente en el modelo SAMP8 a una edad temprana y que se asocia con

la neuropatología asociada al envejecimiento y deterioro cognitivo (Cosín-Tomás et al., 2018).

En cuanto al estado de acetilación de histonas, el modelo de ratón SAMP8 muestra una disminución de las histonas H3 y H4 acetiladas a los 2 meses (Cosín-Tomás et al., 2018). Además, la H3 acetilada se mantiene disminuida con la edad mientras que la H4 acetilada aumenta con el envejecimiento en SAMP8 (Cosín-Tomás et al., 2018). También se ha encontrado una disminución de la metilación de histona H3 (H3K24, H3K27, H3K36, H3K79, H3K129), H4K20 y H2AR89 en el cerebro de SAMP8 asociadas al proceso de senescencia (Griñán-Ferré, Corpas, et al., 2018a).

Otro mecanismo epigenético importante en el modelo SAMP8 son las modificaciones en los niveles de miRNAs relacionados, principalmente, en procesos de desarrollo y envejecimiento (Liu et al., 2015). Liu y colaboradores demostraron una disminución de los niveles de *miR-16* en SAMP8 el cual está asociado a la regulación negativa de los niveles proteicos del precursor de la proteína β A (β APP) y de la familia de los *miR-9* implicado en la regulación los genes *PSEN1*, *SCN2B*, *MAP3K3* y *β -secretasa 1 (BACE1)* asociando el modelo SAMP8 a mecanismos implicados en la EA (Liu et al., 2015; Liu et al., 2012). La sobreexpresión presente en SAMP8 de *miR-139* implicado en la regulación de la memoria y aprendizaje dependiente de hipocampo a través del receptor cannabinoide 2 (CB2) (Tang et al., 2017). Además, presenta cambios en los niveles de miRNAs que se encuentran alterados en pacientes de EA: *miR-20a*, *-18a*, *-26a*, *-106b*, *-34a*, *-17*, *-155*, *-101* y *-125b* (Cheng, 2013). Todos estos datos demuestran la implicación de los mecanismos epigenéticos en diferentes marcadores asociados al envejecimiento en el modelo de ratón SAMP8.

2. Objetivos



Durante las últimas décadas se ha demostrado la importancia de los mecanismos epigenéticos en el proceso de envejecimiento y deterioro cognitivo. Al mismo tiempo, los cambios producidos por factores ambientales como la dieta se han mostrado capaces de modificar las marcas epigenéticas pudiendo tener un carácter heredable. Tanto es así, que se ha descrito la HFD como un acelerador del envejecimiento a través de la activación de vías moleculares que promueven la degeneración. Asimismo, estudios en animales y humanos han corroborado la participación de la dieta materna en la manifestación de enfermedades en la descendencia. Por otro lado, existen evidencias que demuestran como ciertas vías moleculares implicadas en los procesos degenerativos y moduladas por el RSV son también heredadas por la descendencia.

Teniendo en cuenta todas estas evidencias, el objetivo general de esta tesis doctoral fue ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de la herencia epigenética implicados en el deterioro cognitivo y el envejecimiento modulados por una HFD y revertidos por el RSV en la descendencia del modelo murino SAMP8.

Para llevar a cabo este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar las modificaciones epigenéticas, producidas por la dieta materna rica en RSV, sobre marcadores asociados al deterioro cognitivo y envejecimiento, en las generaciones F1 y F2 del modelo murino SAMP8 a los 6 meses de edad.

- Investigar el efecto del RSV sobre el peso y la ingesta calórica.

- Estudiar y caracterizar las alteraciones del comportamiento asociadas al deterioro cognitivo y envejecimiento.

- Analizar las alteraciones en la maquinaria epigenética relacionadas con el funcionamiento del SNC y el envejecimiento.

- Investigar los niveles de metilación de los promotores de los genes relacionados con la respuesta al EO y neuroinflamación, además de comprobar si se asocian con los niveles de ERO.

- Estudiar vías moleculares implicadas en los procesos de envejecimiento como el balance energético, autofagia y ERE.

2. Estudiar el efecto de una dieta materna rica en RSV, a través de los mecanismos epigenéticos, asociados al proceso de neurodegeneración, inducidos por una HFD en la descendencia F1 y F2 del modelo murino SAMP8.

- Investigar el efecto del RSV y HFD sobre el peso y el metabolismo energético.

- Estudiar y caracterizar las alteraciones del comportamiento asociadas al deterioro cognitivo y envejecimiento patológico.

- Determinar alteraciones epigenéticas implicadas en el envejecimiento y neurodegeneración inducidas por la HFD.

- Analizar la correlación entre los mecanismos epigenéticos y la cognición.

- Estudiar marcadores asociados a la neuroinflamación, plasticidad sináptica y neurogénesis.

3. Resultados



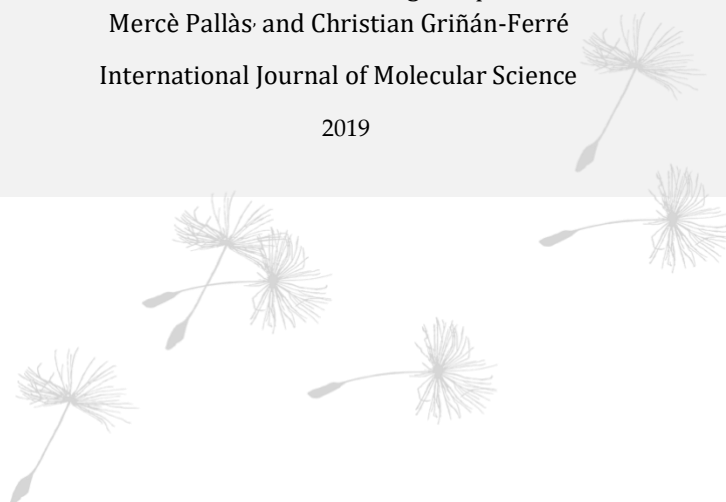
3.1. *Publicación 1*

Maternal Resveratrol Supplementation Prevents Cognitive Decline in Senescent Mice Offspring

Vanesa Izquierdo, Verónica Palomera-Ávalos, Sergio López-Ruiz, Anna-Maria Canudas,
Mercè Pallàs and Christian Griñán-Ferré

International Journal of Molecular Science

2019



Resumen

Una gran variedad de factores ambientales contribuyen significativamente al deterioro cognitivo relacionado con la edad y al deterioro de la memoria en la EA y otras enfermedades neurodegenerativas. La nutrición puede alterar la epigenética, promoviendo un estado saludable y transmitirlo de generación en generación; este proceso es conocido como herencia epigenética. En este estudio investigamos los efectos beneficiosos de una dieta materna rica en RSV en la generación F1 (expuesta directamente) y la generación F2 (efecto transgeneracional). La descendencia se generó a partir de hembras SAMP8 alimentadas con una dieta enriquecida con RSV durante dos meses antes del apareamiento. Las pruebas de comportamiento NORT (*Novel object recognition test*) y MWM (*Morris water maze*) demostraron mejoras en la cognición en las generaciones F1 y F2 a los 6 meses. Se encontró un aumento significativo de 5-mC con una disminución en la 5-hmC en F1 y F2. En consecuencia, se produjo cambios en los niveles de expresión génica de las enzimas *Dnmt3a* y *Tet2* en la descendencia de madres alimentadas con RSV. Además, se observaron cambios en los niveles de metilación de los promotores de los genes *Nrf2* y *NF-kβ* de la descendencia, lo que provocó cambios en la expresión de sus genes diana, así como los niveles de H₂O₂. Es más, la descendencia de las madres alimentadas con RSV mostró un aumento de la activación de AMPK α , inhibición de mTOR y un aumento en la expresión del gen *Pgc-1 α* y los niveles de proteína Beclin-1. Relacionado con estos marcadores se demostró un efecto sobre marcadores implicados en la UPR y ERE en las generaciones F1 y F2. En general, nuestros resultados demostraron que la suplementación materna con RSV previene el deterioro cognitivo en la descendencia de ratones SAMP8 a través de cambios epigenéticos y vías de señalización celular asociadas con el deterioro cognitivo y el envejecimiento.

Abstract

A variety of environmental factors contribute significantly to age-related cognitive decline and memory impairment in Alzheimer's Disease (AD) and other neurodegenerative diseases. Nutrition can alter epigenetics, improving health outcomes, which can be transmitted across generations; this process is called epigenetic inheritance. We investigate the beneficial effects of maternal resveratrol supplementation in the direct exposed F1 generation and the transgenerational F2 generation. The offspring was generated from females Senescence Accelerated Mouse-Prone (SAMP8) fed a resveratrol-enriched diet for two months prior to mating. Object novel recognition and Morris Water Maze (MWM) demonstrated improvements in cognition in the 6-month-old F1 and F2 generations from resveratrol fed mothers. A significant increase in global DNA methylation with a decrease in hydroxymethylation in F1 and F2 were found. Accordingly, *Dnmt3a/b* and *Tet2* gene expression changed. Methylation levels of *Nrf2* and *NF-κβ* genes promoters raised in offspring, inducing changes in target genes expression, as well as hydrogen peroxide levels. Offspring that resulted from a resveratrol fed mother showed increase AMPKα activation, mTOR inhibition, and an increase in *Pgc-1α* gene expression and Beclin-1 protein levels. Endoplasmic reticulum stress sensors were found changed both in F1 and F2 generations. Overall, our results demonstrated that maternal resveratrol supplementation could prevent cognitive impairment in the SAMP8 mice offspring through epigenetic changes and cell signaling pathways.

Keywords: Cognitive decline; epigenetics; epigenetic inheritance; methylation; Nrf2; NF-κB; oxidative stress; inflammation; resveratrol; SAMP8.

Introduction

Age-related cognitive decline, especially memory impairment, is one of the most prevalent consequences of growing older [1]. The severity of age-related cognitive decline predisposes to neurodegenerative disease such as Alzheimer's Disease (AD). The molecular mechanisms of age-related cognitive decline and AD are considered multifactorial and implicate the interaction of genetics and environmental factors acting as susceptibility factors or triggers [2] that promote brain injury accumulation due to their chronicity during ageing. Thus, several cell pathways play a significant role in the progression and development of cognitive impairment such as transcriptional dysregulation, Oxidative Stress (OS) [3], inflammation [4], Endoplasmic Reticulum (ER) stress [5], autophagy [6], and retrograde autophagosome transport [7], among others. Recently, an increased understanding of the complexity of age-related cognitive decline has led to define the important role of epigenetics in the pathogenesis [8]. Moreover, mounting evidence indicates that various environmental factors can modulate expression profiles of several genes through epigenetic programs that might modify the susceptibility and variability in the trajectory of age-related cognitive decline and AD [9]. This evidence emphasizes that environmental factors may operate throughout life to influence the biological mechanisms that dictate the cognitive impairment of an individual's health trajectory.

Until now, it has been accepted that epigenetic changes that occur during life are not generally transmitted into the next generation. This, it has been argued, is because in each generation a developmental reprogramming process that resets the epigenome of the early embryo takes place [10]. Nevertheless, some of the epigenetic alterations have been shown to escape this process, such as global DNA methylation (5-mC), histone modifications, and microRNAs (miRNAs) [11].

Exposure of an organism to different environmental conditions can affect offspring health for the first generation (intergenerational inheritance), or subsequent generations (transgenerational inheritance); this process is called transgenerational epigenetic inheritance [10]. Moreover, several epidemiological studies have shown that the risk of several age-related diseases, including diabetes, cardiovascular disease, as well as cancers and neurodegenerative disorders might largely depend on features of maternal nutrition, stress, toxicants, pathogens, and exercise, among others [11,12]. However, the mechanism underlying this transgenerational memory of environmental factors and its potential consequences across generations remains genuinely unexplored and might involve epigenetic mechanisms. Thus, few studies have attempted to investigate beneficial nutrition outcomes following exposure to a resveratrol maternal diet. Accepting these limitations, recent studies have demonstrated that maternal methyl supplements in mice change 5-mC in offspring [13] and maternal high-fat diet exposure promotes histone modifications in neonatal rats [14]. Furthermore, changes in protein levels of Nrf2 have been reported, a transcription factor that is part of the Antioxidant Response Element (ARE) in the offspring of maternal nutritional intervention [15]. ARE-Nrf2 activates antioxidant enzymes reducing OS, as well as NF- κ B, a transcription factor that activates pro-inflammatory cytokines [16]. Other changes in DNA methylation CpG have been found in various gene promoters [17] and miRNA expression profiles are also found in the offspring after maternal diet intervention in several animal models [18].

The Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8) is a non-transgenic strain, established through phenotypic selection from the AKR/J strain by Takeda [19]. The SAMP8 strain exhibits age-related cognitive decline, with behavioral abnormalities as well as neuropathological hallmarks of AD [20,21]. Likewise, several key events associated with neurodegeneration are presented in SAMP8

mice such as OS [22–24], and inflammatory biomarkers [23]. Recently, epigenetic changes have been associated with accelerated ageing in SAMP8 [25,26], and several studies demonstrated that environmental interventions induced changes in the epigenome, reducing cognitive impairment [25,27].

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) is a phytoalexin found in grapes, peanuts, and wine, with anti-aging, antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective, and antitumor activities [28]. Resveratrol also protects the brain in different neurological conditions, such as AD and Parkinson's Disease (PD) [29–31]. Our group has shown that resveratrol modulates important neuronal functions, improving cognitive decline in several AD mice models [32–34]. Although the beneficial effects of resveratrol in the Central Nervous System (CNS) are well established, the mechanisms of these effects are not fully understood but can include epigenetic modulation [35].

The present work aimed to evaluate the neuroprotective effects of maternal resveratrol supplementation in SAMP8 offspring through several key neurodegenerative pathways as well as delving deep into the epigenetic mechanisms influenced by a resveratrol supplementation diet. We focus on OS, neuroinflammation, ER stress, and monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) cascade signaling. We also evaluated the cognitive performance of the offspring.

Material and Methods

Animals

Offspring generation was carried out from two diet groups of SAMP8 in which mice were fed either a standard chow diet (Males F0 (CT), $n = 2$) that had access to

standard chow and a resveratrol group (Females F0 (Resveratrol, $n = 4$) that had access to diet enriched with the resveratrol (1 g/Kg) for two months. We interrupted the supplementation diet for mating to take place, obtaining the first generation (the intergenerational inheritance offspring (F1, $n = 20$; females $n = 10$, males $n = 10$)). Afterwards, we crossed the F1 and obtained the second generation (the transgenerational inheritance offspring (F2, $n = 20$; females $n = 10$, males = 10)) (Figure 1A). These two generations were fed a standard diet. This procedure was carried out to advance one generation to obtain the transgenerational inheritance in the F2 generation instead of the F3 generation. On the other hand, we generated the SAMP8 control group (CT, $n = 20$; females $n = 10$, males $n = 10$) that had access to standard chow. Animals had free access to food and water and were kept under standard temperature conditions (22 ± 2 °C) and 12 h: 12 h light-dark cycles (300 lux/0 lux).

All experimental procedures involving animals were performed followed by standard ethical guidelines European Communities Council Directive 86/609/EEC and by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona (670/14/8102, approved at 11/14/2014) and by Generalitat de Catalunya (10291, approved 1/28/2018). All efforts were made to minimize the number of mice used and their suffering.

Behavioral Tests

- Novel Object Recognition Test

The NORT protocol employed was a modification of [66,67]. In brief, mice were placed in a 90°, two-arms, 25-cm-long, 20-cm-high, 5-cm-wide black maze. Before performing the test, the mice were individually habituated to the apparatus for 10 min for 3 days. On day 4, the animals were submitted to a 10-min acquisition

trial (first trial), during which they were placed in the maze in the presence of two identical, novel objects at the end of each arm. After a delay (2 h and 24 h), the animal was exposed to two objects one old object and one novel object. The time that mice explored the Novel object (TN) and Time that mice explored the Old object (TO) were measured. A DI was defined as $(TN - TO)/(TN + TO)$. To avoid object preference biases, objects were counterbalanced.

- Morris Water Maze Test

An open circular pool (100 cm in diameter, 50 cm in height) was filled halfway with water [68], and the temperature was maintained at $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Two principal perpendicular axes were defined; thus, the water surface was divided into four quadrants (NE, SE, SW, and NW) and five starting points were set (NE, E, SE, S, and SW). Four visual clues were placed on the walls of the tank (N, E, S, and W). Non-toxic, white latex paint was added to make the water opaque, and a white escape platform was submerged 1.5 cm below the water level (approximately in the middle of one of the quadrants).

The animals swimming paths were recorded by a video camera mounted above the center of the pool, and data were analyzed with SMART version 3.0 software. The acquisition phase consisted of 6 days of trials for each mouse. The animals were submitted to five trials each day starting from the positions set (in random order) and without a resting phase between each trial and the subsequent one. At each trial, the mouse was placed gently into the water, facing the wall of the pool, and allowed to swim for 60 s. If not able to locate the platform in this period, the mouse was guided to the platform by the investigator. Animals were left on the platform each time for 20 s to allow for spatial orientation. A memory test was performed at the end of the training days, in which the platform was removed and the latency to the target, among other parameters by each mouse, was measured.

Immunodetection Experiments

- Brain Processing and Protein Determination

Mice were euthanized one day after the behavioral test finished by cervical dislocation. Brains were immediately removed from the skull. The hippocampus was then isolated and frozen on powdered dry ice. They were maintained at -80°C for further use. Tissue samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7.4), EDTA-free Protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and Phosphatase inhibitor cocktail II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Total proteins were extracted and quantified by the Bradford method.

- Western Blotting

For Western Blotting, aliquots of 15 μg of hippocampal protein were used. Protein samples were separated by Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (8% to 18%) and transferred into Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore). The membranes were blocked in 5% non-fat milk in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C with the primary antibodies listed in Table S1. Membranes were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Immunoreactive protein was viewed with a chemiluminescence-based detection kit, following the manufacturer's protocol (ECL Kit; Millipore, Billerica, MA, USA), and digital images were acquired using a ChemiDoc XRS + System (BioRad, Hercules, CA, USA). Semi-quantitative analyses were carried out using Image Lab software (BioRad), and results were expressed in Arbitrary Units (AU) considering control protein levels as 100%. Protein loading was routinely monitored by immunodetection of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) or β -actin.

- RNA Extraction and Gene Expression Determination

Total RNA isolation was carried out using TRIzol® reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The yield, purity, and quality of RNA were determined spectrophotometrically with a NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA apparatus and an Agilent 2100B Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). RNAs with 260/280 ratios and RIN higher than 1.9 and 7.5, respectively, were selected. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was performed as follows: 2 µg of messenger RNA (mRNA) was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Real-time quantitative PCR (qPCR) was used to quantify mRNA expression of chromatin-modifying genes as well as to validate selected genes from microarray data results.

SYBR® Green real-time PCR was performed in a Step One Plus Detection System (Applied-Biosystems) employing SYBR® Green PCR Master Mix (Applied-Biosystems). Each reaction mixture contained 6.75 µL of complementary DNA (cDNA) (which concentration was 2 µg/µL), 0.75 µL of each primer (which concentration was 100 nM), and 6.75 µL of SYBR® Green PCR Master Mix (2×).

TaqMan-based real-time PCR (Applied Biosystems) was also performed in a Step One Plus Detection System (Applied-Biosystems). Each 20 µL of TaqMan reaction contained 9 µL of cDNA (25 ng), 1 µL 20× probe of TaqMan Gene Expression Assays and 10 µL of 2× TaqMan Universal PCR Master Mix.

Data were analyzed utilizing the comparative Cycle threshold (C_t) method ($\Delta\Delta C_t$), where the housekeeping gene level was used to normalize differences in sample loading and preparation. Normalization of expression levels was performed with *β-actin* for SYBR® Green-based real-time PCR results and *Gapdh* for TaqMan-

based real-time PCR. Primers and TaqMan probes are listed in Table S2. Each sample was analyzed in duplicate, and the results represent the n-fold difference of the transcript levels among different groups.

- Global DNA Methylation and Hydroxymethylation Determination

Isolation of genomic DNA was conducted using the FitAmp™ Blood and Cultured Cell DNA Extraction Kit (EpiGentek, Farmingdale, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. Following this, MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (EpiGentek, Farmingdale, NY, USA) and MethylFlash Hydroxymethylated DNA Quantification Kit were used in order to detect methylated and hydroxymethylated DNA. Briefly, these kits are based on specific antibody detection of 5-mC and 5-hmC residues, which trigger an ELISA-like reaction that allows colorimetric quantification by reading absorbance at 450 nm using a Microplate Photometer. The absolute amount of methylated or hydroxymethylated DNA (proportional to the Optical Density (OD) intensity) was measured and quantified using a standard curve plotting OD values vs. five serial dilutions of a control methylated and hydroxymethylated DNA (0.5 to 10 ng).

- Genomic DNA Extraction, Bisulfite DNA Conversion and Methylation-specific PCR (MSP)

Genomic DNA was isolated from the hippocampus using the FitAmp™ Blood and Cultured DNA Extraction Kit (EpiGentek, Farmingdale, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and purity were quantified using NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). This was followed by bisulfite conversion being performed using the BisulFlash DNA Modification Kit from EpiGentek (Farmingdale, NY, USA). Following this, the unmethylated cytosine residues were modified into uracil, while the methylated cytosine residues were preserved. As a result, the sodium bisulfite-treated DNA of the methylated and the

unmethylated differed and was distinguishable by methyl-specific PCR primers designed to have complementary sequences to the formerly unmethylated and methylated genome. The primer sequences can be found in Table S3. DNA amplification was performed using reagents prepared by Methylamp MS-PCR Fast Kit from Epigentek (Farmingdale, NY, USA). The thermal profile consisted of 95 °C for 7 min as the initial denaturation step, 40 cycles of 95 °C for 10 s, 55 °C for 10 s, 72 °C for 60 s for DNA amplification, followed by a final extension step of 72 °C for 1 min. PCR reactions were performed in 96-well plates in a Step One Plus Detection System (Applied Biosystems).

- Determination of Oxidative Stress in Hippocampus

Hydrogen peroxide was measured as an indicator of oxidative stress and it was quantified using the Hydrogen Peroxide Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) according to the manufacturer's instructions.

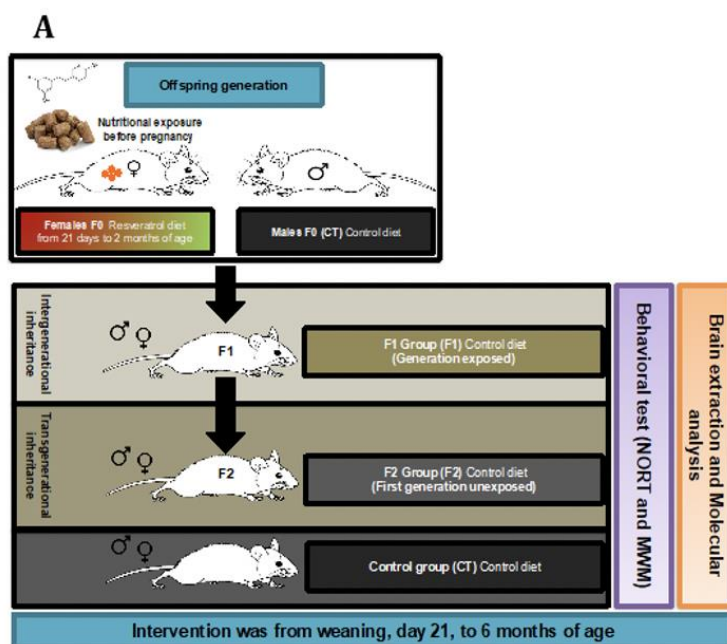
Data Analysis

The statistical analysis was conducted using GraphPad Prism ver. 6 statistical software. Data are expressed as the mean \pm SEM of at least 4 samples per group. Sex and group effects for body weight and behavioral tests were assessed by the Two-Way Analysis of variance, followed by Tukey post-hoc analysis. Molecular analysis was assessed by The One-Way Analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post-hoc analysis or two-tail Student's t-test when it was necessary. Statistical significance was considered when p -values were <0.05 . The statistical outliers were determined with Grubbs' test and subsequently removed from the analysis.

Results

Body Weight Evolution in SAMP8 Offspring after Maternal Resveratrol Supplementation

Body weight was measured weekly during the intervention. Starting from baseline (3 weeks of age), all mice groups significantly increased body weight over time, demonstrating the correct development of all groups. Furthermore, no changes in body weight were found within the individual sex groups during the intervention, the only difference in body weight was among male mice groups and female mice groups (Figure 1B). The average body weight increase was 11.953 g for CT group, 12.305 g for F1 group, and 11.130 g for F2 group from week three to week 17 in female mice groups. Likewise, the average body weight increase was 11.713 g for CT group, 11.109 g for F1 group, and 12.162 g for F2 group from week three to week 17 in female mice groups (Figure 1C).



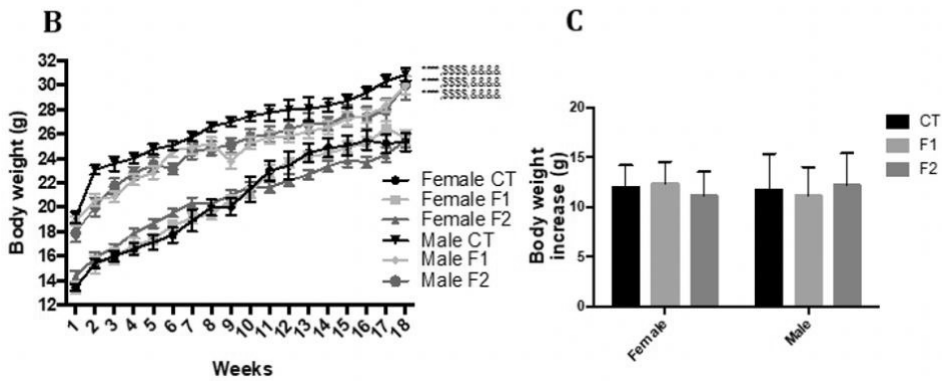


Figure 1. Experimental design and offspring generation of F1 (intergenerational inheritance) and F2 (transgenerational inheritance), and control (CT) mice group. At 6 months of age, mice were tested by memory tests followed by euthanasia, brain extraction, and molecular analysis (A). Results of body weight each week in both females and males (B). Results of total body weight increase in both females and males (C). Values represented are mean \pm standard error of the mean (SEM); $n = 60$ (CT $n = 20$, F1 = 20, F2 $n = 20$; for each group, females $n = 10$, males $n = 10$). Statistics: vs. female CT group: **** $p < 0.0001$ vs. female F2 group: **** $p < 0.0001$ vs. female F2 group: **** $p < 0.0001$.

Maternal Resveratrol Supplementation Mitigate Cognitive Impairment Presented by SAMP8 Across Generations

In the Novel Object Recognition Test (NORT) analysis we demonstrated that F1 and F2 mice groups exhibited a significant improvement in cognitive performance in both short- and long-term memory in comparison with the CT mice group of both sexes (Figures 2A, B), showing higher Discrimination Index (DI) with statistically significant differences in both females and males, but not among gender. Furthermore, in the Morris Water Maze (MWM) test, all mice groups were able to learn through training days; no differences were found comparing groups (Figure 2C). On the test day, it was observed that the CT mice group showed deficits in spatial memory, with a significant increase in the latency to the target and erratic

swim path in comparison with F1 and F2 mice groups in both sexes (Figures 2D, E). As in NORT, no gender differences were found.

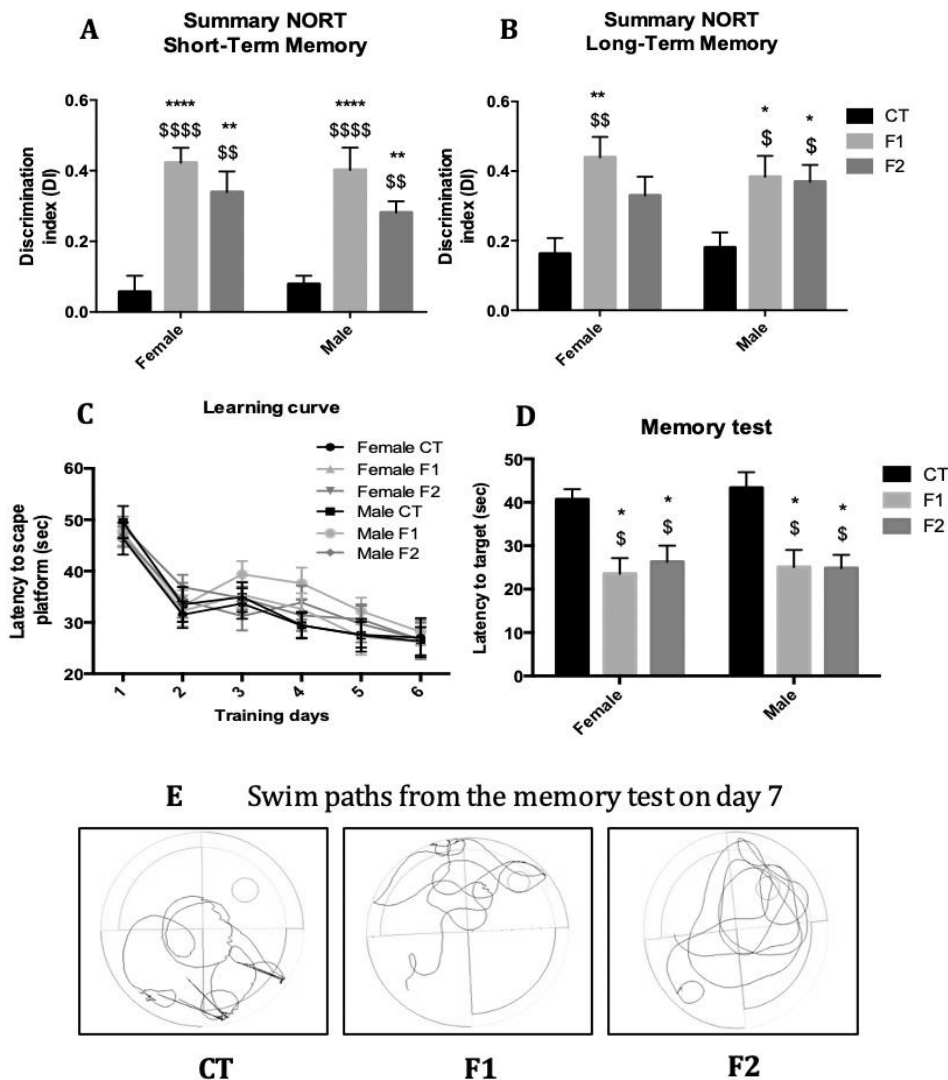


Figure 2. Results of DI of Novel Object Recognition Test (NORT) in females and males at 6 months of age in both females and males for all mice groups. Summary from short-term memory (A), and a summary from long-term memory (B). Results of Morris Water Maze (MWM) in females and males at 6 months of age for all mice groups. Learning curves of MWM during the spatial acquisition phase (C). Latency to the target of MWM on the memory test (D). Representative swim

paths on the memory test (E). Values represented are mean \pm SEM; n = 60 (CT n = 20, F1 = 20, F2 n = 20; for each group, females n = 10, males n = 10). Statistics: vs. female CT group: * p < 0.05; ** p < 0.01; **** p < 0.0001 vs. male CT group: \$ p < 0.05; \$\$ p < 0.01; \$\$\$ p < 0.0001.

Global Changes in DNA Methylation and Hydroxymethylation and its Epigenetic Modulators in the Hippocampus of SAMP8 Offspring

5-mC levels were increased in F1 and significantly increased in F2 in comparison with the CT mice group (Figure 3A). Likewise, 5-hmC levels were significantly reduced in both F1 and F2 in comparison with the CT mice group (Figure 3A). In parallel, DNA Methyltransferases family (DNMTs) gene expression was evaluated and results demonstrated a significant increase in *Dnmt3a* and *Dnmt3b* in both F1 and F2 mice groups (Figure 3B). Ten-Eleven Translocation family (TETs) gene expression was also evaluated, and no changes were found in *Tet1* as well as slightly increased in *Tet2* in both F1 and F2 mice groups compared to the CT group (Figure 3B). No gender differences were found, and, for this reason, results are presented merging both genders.

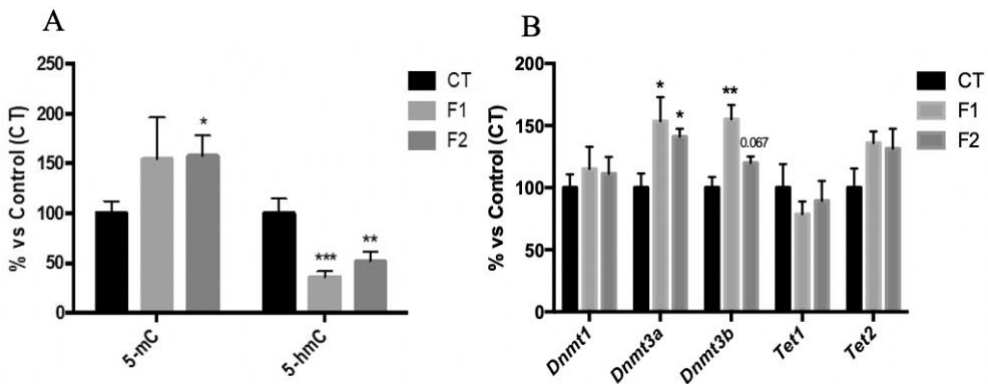
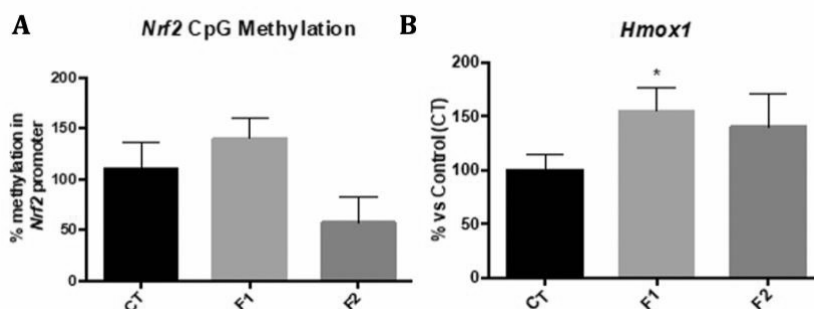


Figure 3. Global 5-methylated and 5-hydroxymethylated cytosine levels in the hippocampus of females and males at 6 months of age for all mice groups (A). Relative gene expression of *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet1*, and *Tet2* (B). Gene expression levels were measured by real-time polymerase chain reaction (PCR) from hippocampal mRNA. Mean \pm SEM in bar graphs are adjusted to 100% for

each gene of CT group; n = 18 to 21 (CT n = 6 to 7, F1 n = 6 to 7, F2 n = 6 to 7; for each group, females 3 to 4, males n = 3). Statistics: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Changes in Methylation levels of Nrf2 and NF- κ B Gene Promoters and Gene Expression of their Targets reduce Oxidative Stress and Inflammation in the Hippocampus of SAMP8 Offspring

We studied the promoter methylation levels of transcription factor genes Nrf2 and NF- κ B. The Nrf2 promoter methylation levels showed a reduction only in the F2 mice group in comparison with the CT group (Figure 4A). In parallel fashion, gene expression of Heme oxygenase (decycling) 1 (Hmox1), a target gene of Nrf2 was upregulated in both F1 and F2 mice groups, being only significant in F1 compared to the CT group (Figure 4B). Finally, the analysis of hydrogen peroxide levels in homogenates of the hippocampus showed a reduction in Radical Oxygen Species (ROS) levels in F1 and a significant reduction in F2 in comparison with the CT group mice (Figure 4D). Furthermore, the promoter methylation of NF- κ B gene was studied, and a significant increase in both F1 and F2 mice groups were found in comparison with the CT group (Figure 4E). Likewise, we found that this increase in promoter methylation levels rendered a reduction in Il-6 and Cxcl10 gene expression in both F1 and F2 mice groups in comparison with the CT mice group (Figures 4F, G). No gender differences were found, and, for this reason, results are presented merging both genders.



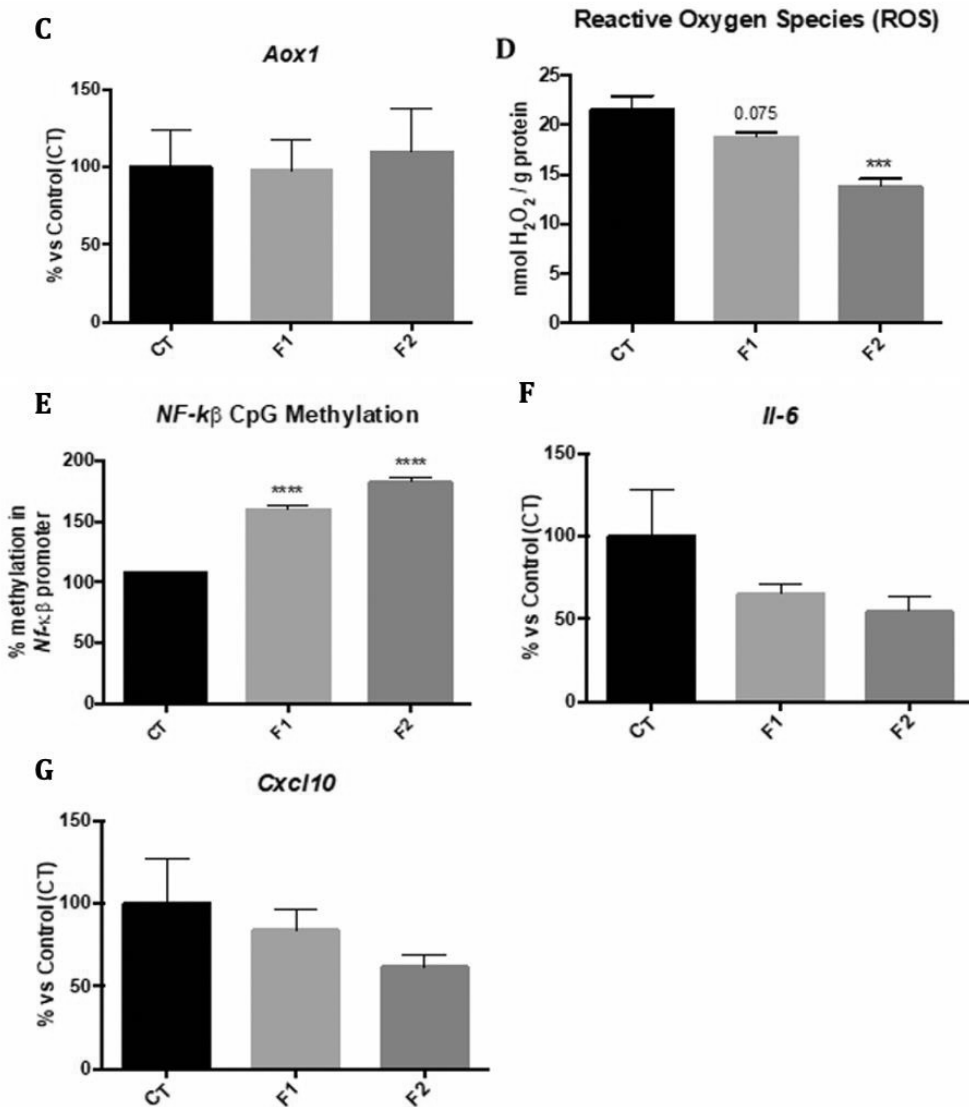
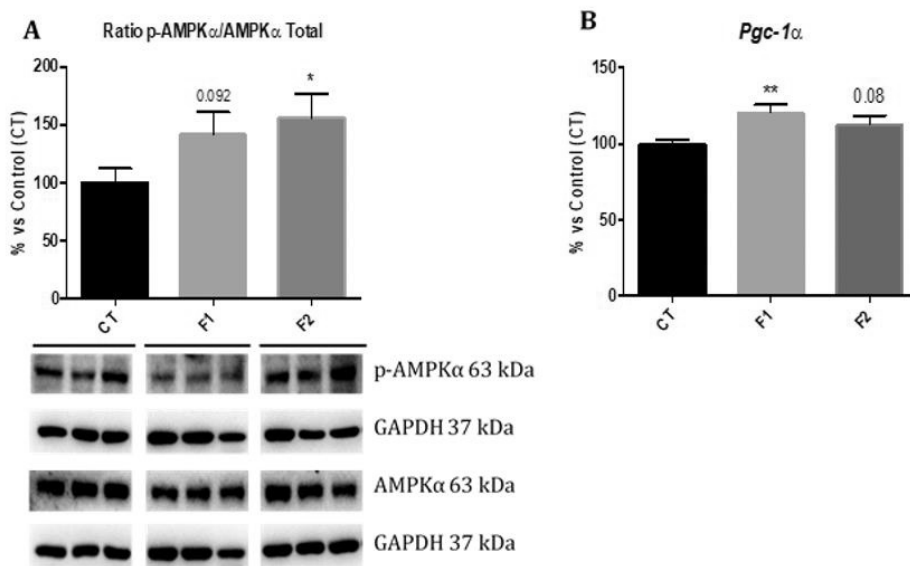


Figure 4. DNA methylation analysis of the Nrf2 (A) and NF-k β (E) gene promoter in the hippocampus of females and males at 6 months of age for all mice groups. Percentage of gene methylation was determined by real-time PCR. Mean \pm values in bar graphs are adjusted to 100% for each gene of the CT mice group. Representative Oxidative stress measured as hydrogen peroxide concentration in homogenates of hippocampus tissue (D). Representative gene expression for *Hmox1* (B), *Aox1* (C), *Il-6* (F), *Cxcl10* (G). Gene expression levels were measured by real-time PCR from hippocampal mRNA. Mean \pm SEM in bar graphs are adjusted to 100% for each gene of the CT; n = 18 (CT n = 6, F1 n = 6, F2 n = 6; for each group, females n = 3, males n = 3). Statistics: * p < 0.05; *** p < 0.001.

Changes in AMPK/mTOR Signalling Cascade in the Hippocampus of SAMP8 Offspring

Western blot analysis revealed a significant increase in phosphorylated AMPK (p-AMPK) levels in F2, but no changes were found in the F1 mice group in comparison with the CT group (Figure 5A). Moreover, a significant increase in gene expression of *Pgc-1 α* in F1 as well as a clear tendency to increase in F2 mice group, compared to the CT group (Figure 5B). In parallel, a significant reduction in phosphorylated mTOR (p-mTOR) levels was found in both F1 and F2 in comparison with the CT group (Figure 5C). Finally, a significant increase in Beclin-1 protein levels in both F1 and F2 mice groups in comparison with the CT mice group were found (Figure 5D). No gender differences were found, and, for this reason, results are presented merging both genders.



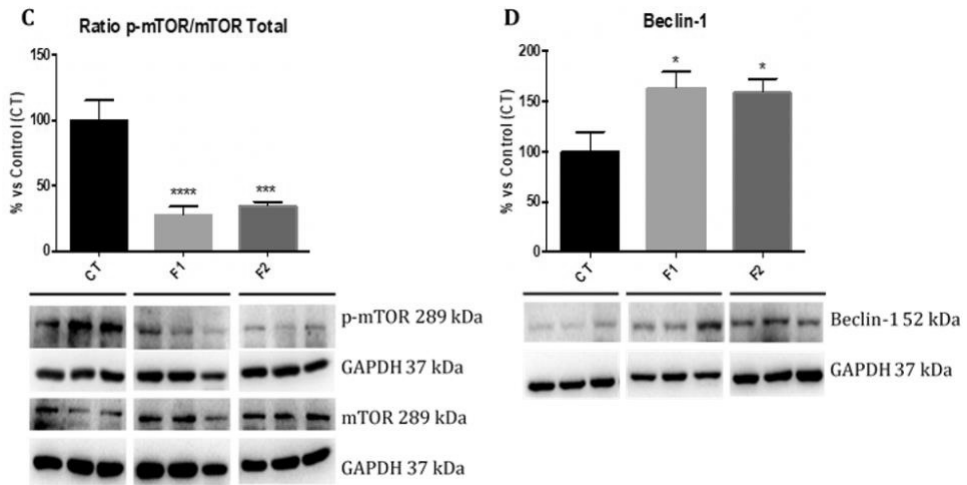


Figure 5. AMPK/mTOR signaling cascade in the hippocampus of females and males at 6 months of age for all mice groups. Representative Western blot for ratio p-AMPK/AMPK, ratio p-mTOR/mTOR, Total and Beclin-1 protein levels, and their respective quantification (**A, C, D**). Values in bar graphs are adjusted to 100% for protein levels of the CT group. Representative gene expression for *Pgc-1 α* (**B**). Gene expression levels were measured by real-time PCR from hippocampal mRNA. Values are mean \pm SEM; n = 18 (CT n = 6, F1 n = 6, F2 n = 6 for each group, females n = 3, males n = 3). Statistics: *** p < 0.001; **** p < 0.0001.

Reduction in ER Stress in the Hippocampus of SAMP8 Offspring

We evaluated the ER stress markers such as Immunoglobulin binding Protein (BiP), phosphorylated protein kinase R-line Endoplasmic Reticulum Kinase (p-PERK), phosphorylated Eukaryotic Translation-initiation Factor 2 (p-EIF2 α), and Activating Transcription Factor 6 (ATF-6) by Western blot. Analysis revealed that protein levels of BiP and p-PERK were significantly reduced only in the F1 group, although a reduction was also found in the F2 group in comparison with the CT group mice (***) (Figures 6A, B). Regarding p-EIF2 α levels, a significant reduction in the F2 group and slightly decreased in the F1 mice group were observed in comparison with the CT group (Figure 6C). Finally, no changes in ATF-6 protein levels were

found among mice groups (Figure 6D). No gender differences were found, and, for this reason, results are presented merging both genders.

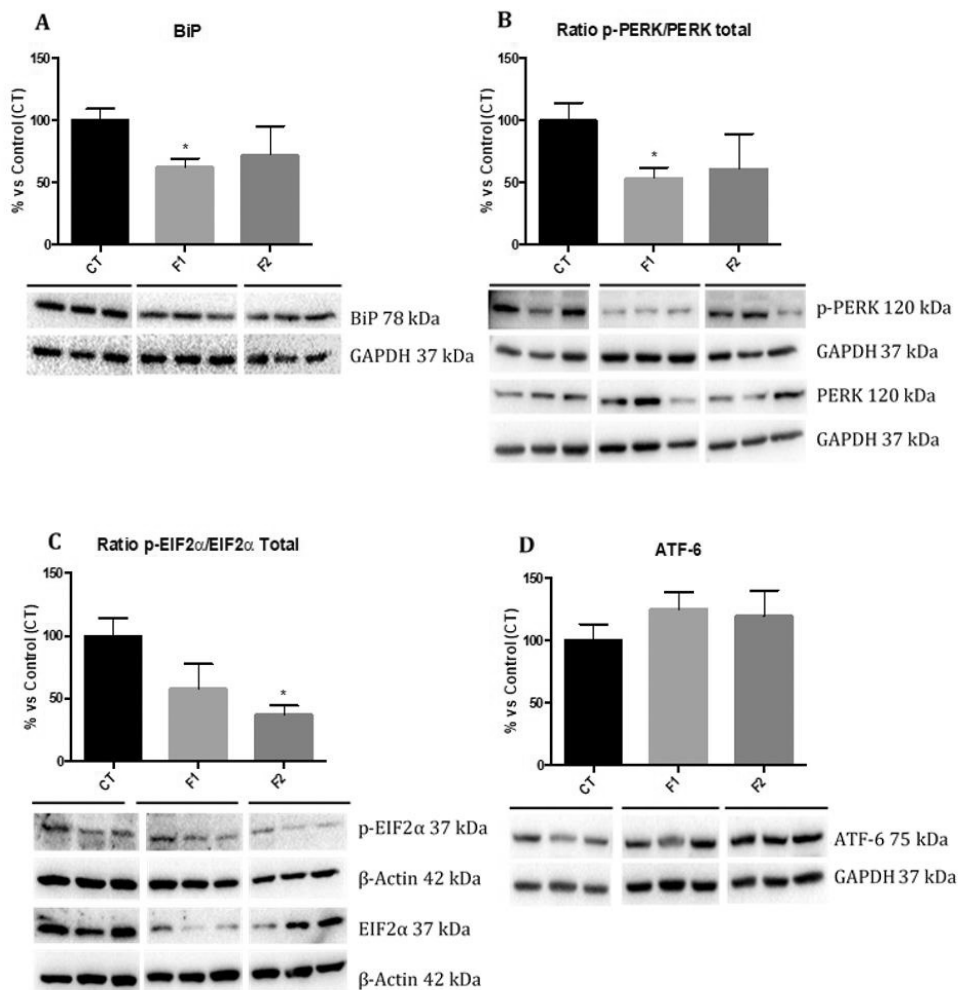


Figure 6. Endoplasmic Reticulum (ER) stress markers sensors in the hippocampus of females and males at 6 months of age for all mice groups. Representative Western blot for BiP), ratio p-PERK/PERK Total, ratio p-EIF2 α /EIF2 α , ATF-6 and their respective quantification (A–D). Values in bar graphs are adjusted to 100% for protein levels of the CT group). Values are the mean \pm SEM; n = 18 (CT n = 6, F1 n = 6, F2 n = 6 for each group, females n = 3, males n = 3). Statistics: * p < 0.05.

Discussion

The present study investigated, the beneficial effect of maternal resveratrol supplementation 2 months before conception on offspring over two generations in the SAMP8 mouse model. Thus, cognitive performance, several molecular pathways influenced by an age-related cognitive decline as well as 5-mC and 5-hmC and the machinery involved in these marks and DNA methylation levels of CpG gene promoters were studied to elucidate the resveratrol-induced epigenetic transgenerational inheritance mechanism. The intervention was finished at the age of 6-months-old when cognitive impairment and main molecular mechanisms of neurodegeneration such as OS, inflammation, among others are well characterized in female and male of SAMP8 [36,37].

We have previously described that resveratrol dietary supplementation induced changes in cognition and molecular pathways in the hippocampus of aged [38,39] and AD mice models [33,40]. Here, we reported that body weight remained unchanged in the offspring from females supplemented with resveratrol before pregnancy in comparison with the sex control group, confirming the same effect in both sexes elicited by polyphenol, and corroborating previous studies [41,42]. Furthermore, we demonstrated that in two generations of progenies from females exposed to resveratrol supplementation before pregnancy displayed improvement in recognition (NORT) and spatial memories (MWM) in both sexes. Thus, no sex-biased multigenerational effect in the offspring outcomes induced by maternal resveratrol prior to mating was found. Consistent with our new findings, it has been reported that the neuroprotective effects of resveratrol, against cognitive impairment induced by prenatal stress in the offspring of Wistar rats [43].

As mentioned above, an increasing number of studies in rodents have demonstrated that the nutritional stimuli may alter the phenotype of animals through epigenetic mechanisms [44] as well as these epigenetic alterations being transmitted through at least three generations in mammals [45]. Here, we found a higher degree of global 5-mC and a diminution in 5-hmC, which paralleled with changes in their enzymatic machinery such as DNMTs and TETs, in the hippocampus of the offspring. These epigenetic marks have been described as essential for hippocampal synaptic plasticity, cognitive function [46], and age-related modifications [47]. In line with our results, several studies found that dietary polyphenols alter epigenetic mechanisms by changing 5-mC levels [48] or regulating the gene expression or enzymatic activity of DNMTs and TETs [49]. In addition, recent studies suggest that maternal resveratrol intake after different stimuli can have a significant influence on the susceptibility of the offspring to age-related diseases including cognitive decline [44,50,51]. Nevertheless, to our knowledge, this is the first study in which only a maternal resveratrol supplementation before pregnancy has been shown to lead to beneficial effects on cognition in the offspring of SAMP8, being the action orchestrated through epigenetic mechanisms.

Because of the improvement in cognitive function observed in the offspring, it was of interest to determine which of the cellular mechanisms are implicated in the neuroprotective effects of resveratrol-mediated by epigenetic changes demonstrated. In this way, OS and inflammation pathways can be regulated through epigenetic mechanisms, hence we first studied the methylation status of two transcriptional regulatory gene promoters; Nrf2 a transcription factor that plays a crucial role in protection against ROS, binds to the ARE, and regulates antioxidant enzymes [52] and NF- κ B, another transcription factor that regulates a large number of genes involved in the inflammatory response [53]. Gene

transcription is activated when specific CpG sites are demethylated and, conversely, silenced when sites are methylated [54]. Here, we found that methylation levels in the promoter of the Nrf2 gene were lower in the F2 offspring. *Hmox1* gene expression, but not Aldehyde oxidase 1 (*Aox1*), was increased in both generations. HMOX1 protein can protect against OS [55], whereas AOX1 mediated ROS [27]. Moreover, higher methylation levels in the promoter of the NF- κ B in both generations were found, confirming the lower gene expression levels of *Il-6* and *Cxcl10*. Therefore, these results demonstrated the reduction in ROS and pro-inflammatory cytokines in the hippocampus of the two generations from females exposed to resveratrol. These findings are consistent with reports in other maternal resveratrol intake interventions in which the offspring presented a decrease in OS levels in nonhuman primates [56], and reduced secretion and expression of pro-inflammatory markers in rodents [57] and humans [51]. It is also important that cognitive improvement in Nrf2- and NF- κ B levels modulation have been described in SAMP8 after environmental enrichment (EE) [27] and a rat kidney ischemia model [58], among others.

In addition to antioxidant and anti-inflammatory effects, it is well established that resveratrol has a number of indirect effects [59,60], including mitochondrial biogenesis by AMPK activation [61] and autophagy by inhibition of mTOR [62]. Accordingly, our results showed that the neuroprotective effects of resveratrol in the offspring could be explained, in part, by the activation of the AMPK/mTOR signaling pathway. For instance, higher levels of p-AMPK/AMPK ratio with a concomitant increase of *Pgc-1 α* gene expression in the offspring from females supplemented with resveratrol compared to the control group were observed, being practically significant in both generations. Furthermore, a drastic decline of p-mTOR/mTOR ratio and significantly increased protein levels of Beclin-1 were found. Although similar results were found in resveratrol-treated animals and the

offspring after maternal resveratrol exposure [51,63], here it is shown that the beneficial effects of resveratrol were maintained unexpectedly across generations. It is of paramount importance demonstrate that molecular mechanisms implicated in the intergenerational and transgenerational resveratrol effects occur through the contact with polyphenol, reinforcing the importance of epigenetic machinery in the inheritance across generations.

Finally, our study revealed that offspring from females supplemented with resveratrol resulted in amelioration of ER stress marker proteins as emphasized by a drastic reduction of p-PERK/PERK ratio and p-EIF2 α /EIF2 α ratio in the hippocampus. Likewise, a reduction in BiP and no changes in ATF-6 protein levels were found in the offspring. This finding concurs with the report, which demonstrated that pre-treatment with resveratrol attenuated cognitive impairment and decreased ER stress markers in aged mice [64], as well as the modulatory effects of resveratrol on ER stress in a rat model of PD, restoring locomotor activity [65], through the suppression of ER stress via PERK/EIF2 α pathway by resveratrol.

Taken together, our study provides new evidence that maternal resveratrol supplementation can delay the progression of several signs of neurodegeneration, such as cognitive impairment in the next two generations. Interestingly, those effects appeared both in male and female offspring. These results demonstrate that resveratrol acts by modifying epigenetic marks and their machinery as well as methylation levels of CpG in *Nrf2* and *NF-k β* gene promoters, thus reducing ROS levels and inflammation. Besides, changes in the AMPK/mTOR signaling cascade and ER stress sensor markers explain the beneficial effects induced by resveratrol in the hippocampus of SAMP8 offspring and confirm that maternal dietary

interventions before pregnancy can be a promising experimental strategy to elucidate the underlying mechanisms of age-related cognitive decline (Figure 7).

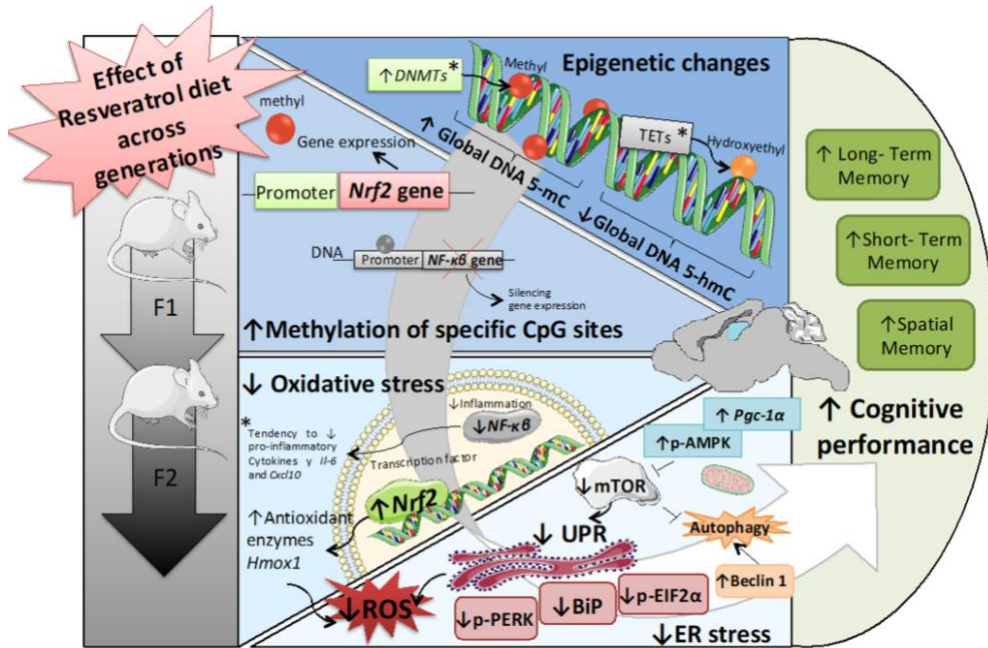


Figure 7. Representative scheme of epigenetic and molecular mechanisms modified in the hippocampus of Senescence-Accelerated Prone Mice (SAMP8) across generations. Significant modifications are shown in bold and potential modifications with the symbol *.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/xxx/s1. **Table S1.** Antibodies used in Western blot studies. **Table S2.** Primers and probes used in qPCR studies. **Table S3.** Primer sequences for the MSP primers.

Author Contributions: V.I. and V.P.-Á. contributed equally. C.G.-F. and M.P. designed the study. V.I., V.P.-Á. and S.L.-R. carried out the behavior and cognition studies and molecular parameters determination. V.I., V.P.-Á., A.-M.C., C.G.-F., and M.P. contributed to writing the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding: This study was supported by Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and FEDER (SAF2016-77703), PCIN-2015-229, and 2017SGR106 (AGAUR, Catalonia). Financial support was

provided for V.I. (University of Barcelona, APIF_2017) and V.P.-Á. (University of Guadalajara, V/2014/2016).

Conflicts of interest: The authors of this manuscript have no conflict of interests to declare.

References

1. Murman, D.L. The Impact of Age on Cognition. *Semin. Hear.* **2015**, *36*, 111–121, doi:10.1055/s-0035-1555115.
2. Rodriguez-Rodero, S.; Fernandez-Morera, J.L.; Menendez-Torre, E.; Calvanese, V.; Fernandez, A.F.; Fraga, M.F. Aging genetics and aging. *Aging Dis.* **2011**, *2*, 186–195.
3. Berr, C. Oxidative stress and cognitive impairment in the elderly. *J. Nutr. Health Aging* **2002**, *6*, 261–266.
4. d'Avila, J.C.; Siqueira, L.D.; Mazeraud, A.; Azevedo, E.P.; Foguel, D.; Castro-Faria-Neto, H.C.; Sharshar, T.; Chretien, F.; Bozza, F.A. Age-related cognitive impairment is associated with long-term neuroinflammation and oxidative stress in a mouse model of episodic systemic inflammation. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 28, doi:10.1186/s12974-018-1059-y.
5. Brown, M.K.; Naidoo, N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 263, doi:10.3389/fphys.2012.00263.
6. Metaxakis, A.; Ploumi, C.; Tavernarakis, N. Autophagy in Age-Associated Neurodegeneration. *Cells* **2018**, *7*, 37, doi:10.3390/cells7050037.
7. Azarnia Tehran, D.; Kuijpers, M.; Haucke, V. Presynaptic endocytic factors in autophagy and neurodegeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2018**, *48*, 153–159, doi:10.1016/j.conb.2017.12.018.
8. Barter, J.D.; Foster, T.C. Aging in the Brain: New Roles of Epigenetics in Cognitive Decline. *Neuroscientist* **2018**, *24*, 516–525, doi:10.1177/1073858418780971.
9. Walhovd, K.B.; Fjell, A.M.; Espeseth, T. Cognitive decline and brain pathology in aging--need for a dimensional, lifespan and systems vulnerability view. *Scand. J. Psychol.* **2014**, *55*, 244–254, doi:10.1111/sjop.12120.
10. Heard, E.; Martienssen, R.A. Transgenerational epigenetic inheritance: Myths and mechanisms. *Cell* **2014**, *157*, 95–109, doi:10.1016/j.cell.2014.02.045.
11. Cantone, I.; Fisher, A.G. Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 282–289, doi:10.1038/nsmb.2489.
12. Marques, A.H.; O'Connor, T.G.; Roth, C.; Susser, E.; Bjorke-Monsen, A.L. The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*, 120, doi:10.3389/fnins.2013.00120.
13. Cooney, C.A.; Dave, A.A.; Wolff, G.L. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 2393s-2400s, doi:10.1093/jn/132.8.2393S.

14. Strakovsky, R.S.; Zhang, X.; Zhou, D.; Pan, Y.X. Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2707–2717, doi:10.1113/jphysiol.2010.203950.
15. Johnson, J.A.; Johnson, D.A.; Kraft, A.D.; Calkins, M.J.; Jakel, R.J.; Vargas, M.R.; Chen, P.C. The Nrf2-ARE pathway: An indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1147*, 61–69, doi:10.1196/annals.1427.036.
16. Tikoo, K.; Vikram, A.; Shrivastava, S.; Jena, G.; Shah, H.; Chhabra, R. Parental High-Fat Diet Promotes Inflammatory and Senescence-Related Changes in Prostate. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 4962950, doi:10.1155/2017/4962950.
17. Geraghty, A.A.; Lindsay, K.L.; Alberdi, G.; McAuliffe, F.M.; Gibney, E.R. Nutrition During Pregnancy Impacts Offspring's Epigenetic Status-Evidence from Human and Animal Studies. *Nutr. Metab. Insights* **2015**, *8*, 41–47, doi:10.4137/nmi.S29527.
18. Fernandez-Twinn, D.S.; Alfaradhi, M.Z.; Martin-Gronert, M.S.; Duque-Guimaraes, D.E.; Piekarz, A.; Ferland-McCollough, D.; Bushell, M.; Ozanne, S.E. Downregulation of IRS-1 in adipose tissue of offspring of obese mice is programmed cell-autonomously through post-transcriptional mechanisms. *Mol. Metab.* **2014**, *3*, 325–333, doi:10.1016/j.molmet.2014.01.007.
19. Miyamoto, M. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp. Gerontol.* **1997**, *32*, 139–148.
20. Pallas, M.; Camins, A.; Smith, M.A.; Perry, G.; Lee, H.G.; Casadesus, G. From aging to Alzheimer's disease: Unveiling the switch with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J. Alzheimer's Dis. JAD* **2008**, *15*, 615–624.
21. Morley, J.E.; Farr, S.A.; Kumar, V.B.; Armbrrecht, H.J. The SAMP8 mouse: A model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 1123–1130.
22. Sureda, F.X.; Gutierrez-Cuesta, J.; Romeu, M.; Mulero, M.; Canudas, A.M.; Camins, A.; Mallol, J.; Pallas, M. Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Exp. Gerontol.* **2006**, *41*, 360–367, doi:10.1016/j.exger.2006.01.015.
23. Grinan-Ferre, C.; Palomera-Avalos, V.; Puigoriol-Illamola, D.; Camins, A.; Porquet, D.; Pla, V.; Aguado, F.; Pallas, M. Behaviour and cognitive changes correlated with hippocampal neuroinflammation and neuronal markers in female SAMP8, a model of accelerated senescence. *Exp. Gerontol.* **2016**, *80*, 57–69, doi:10.1016/j.exger.2016.03.014.
24. Morley, J.E.; Armbrrecht, H.J.; Farr, S.A.; Kumar, V.B. The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 650–656, doi:10.1016/j.bbadis.2011.11.015.
25. Cosin-Tomas, M.; Alvarez-Lopez, M.J.; Sanchez-Roige, S.; Lalanza, J.F.; Bayod, S.; Sanfeliu, C.; Pallas, M.; Escorihuela, R.M.; Kaliman, P. Epigenetic alterations in hippocampus of SAMP8 senescent mice and modulation by voluntary physical exercise. *Front. Aging Neurosci.* **2014**, *6*, 51, doi:10.3389/fnagi.2014.00051.
26. Cosin-Tomas, M.; Alvarez-Lopez, M.J.; Companys-Aleman, J.; Kaliman, P.; Gonzalez-Castillo, C.; Ortuno-Sahagun, D.; Pallas, M.; Grinan-Ferre, C. Temporal Integrative Analysis of mRNA and

- microRNAs Expression Profiles and Epigenetic Alterations in Female SAMP8, a Model of Age-Related Cognitive Decline. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 596, doi:10.3389/fgene.2018.00596.
27. Grinan-Ferre, C.; Puigoriol-Illamola, D.; Palomera-Avalos, V.; Perez-Caceres, D.; Companys-Aleman, J.; Camins, A.; Ortuno-Sahagun, D.; Rodrigo, M.T.; Pallas, M. Environmental Enrichment Modified Epigenetic Mechanisms in SAMP8 Mouse Hippocampus by Reducing Oxidative Stress and Inflammation and Achieving Neuroprotection. *Front. Aging Neurosci.* **2016**, *8*, 241, doi:10.3389/fgene.2016.00241.
 28. Baur, J.A.; Sinclair, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 493–506, doi:10.1038/nrd2060.
 29. Sun, A.Y.; Wang, Q.; Simonyi, A.; Sun, G.Y. Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* **2010**, *41*, 375–383, doi:10.1007/s12035-010-8111-y.
 30. Gomes, B.A.Q.; Silva, J.P.B.; Romeiro, C.F.R.; Dos Santos, S.M.; Rodrigues, C.A.; Goncalves, P.R.; Sakai, J.T.; Mendes, P.F.S.; Varela, E.L.P.; Monteiro, M.C. Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer's Disease: Role of SIRT1. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 8152373, doi:10.1155/2018/8152373.
 31. Xia, D.; Sui, R.; Zhang, Z. Administration of resveratrol improved Parkinson's disease-like phenotype by suppressing apoptosis of neurons via modulating the MALAT1/miR-129/SNCA signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *10.1002/jcb.27769*, doi:10.1002/jcb.27769.
 32. Porquet, D.; Casadesus, G.; Bayod, S.; Vicente, A.; Canudas, A.M.; Vilaplana, J.; Pelegri, C.; Sanfeliu, C.; Camins, A.; Pallas, M.; et al. Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age* **2013**, *35*, 1851–1865, doi:10.1007/s11357-012-9489-4.
 33. Porquet, D.; Grinan-Ferre, C.; Ferrer, I.; Camins, A.; Sanfeliu, C.; Del Valle, J.; Pallas, M. Neuroprotective role of trans-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis. JAD* **2014**, *42*, 1209–1220, doi:10.3233/jad-140444.
 34. Palomera-Avalos, V.; Grinan-Ferre, C.; Puigoriol-Illamola, D.; Camins, A.; Sanfeliu, C.; Canudas, A.M.; Pallas, M. Resveratrol Protects SAMP8 Brain Under Metabolic Stress: Focus on Mitochondrial Function and Wnt Pathway. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 1661–1676, doi:10.1007/s12035-016-9770-0.
 35. McCubrey, J.A.; Lertpiriyapong, K.; Steelman, L.S.; Abrams, S.L.; Yang, L.V.; Murata, R.M.; Rosalen, P.L.; Scalisi, A.; Neri, L.M.; Cocco, L.; et al. Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs. *Aging* **2017**, *9*, 1477–1536, doi:10.18632/aging.101250.
 36. Akiguchi, I.; Pallas, M.; Budka, H.; Akiyama, H.; Ueno, M.; Han, J.; Yagi, H.; Nishikawa, T.; Chiba, Y.; Sugiyama, H.; et al. SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology* **2017**, *37*, 293–305, doi:10.1111/neup.12373.
 37. Menardo, J.; Tang, Y.; Ladrech, S.; Lenoir, M.; Casas, F.; Michel, C.; Bourien, J.; Ruel, J.; Rebillard, G.; Maurice, T.; et al. Oxidative stress, inflammation, and autophagic stress as the key mechanisms of premature age-related hearing loss in SAMP8 mouse Cochlea. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *16*, 263–274, doi:10.1089/ars.2011.4037..

38. Palomera-Avalos, V.; Grinan-Ferre, C.; Izquierdo, V.; Camins, A.; Sanfeliu, C.; Canudas, A.M.; Pallas, M. Resveratrol modulates response against acute inflammatory stimuli in aged mouse brain. *Exp. Gerontol.* **2018**, *102*, 3–11, doi:10.1016/j.exger.2017.11.014.
39. Palomera-Avalos, V.; Grinan-Ferre, C.; Izquierdo, V.; Camins, A.; Sanfeliu, C.; Pallas, M. Metabolic Stress Induces Cognitive Disturbances and Inflammation in Aged Mice: Protective Role of Resveratrol. *Rejuvenation Res.* **2017**, *20*, 202–217, doi:10.1089/rej.2016.1885..
40. Rahman, I. Dietary polyphenols mediated regulation of oxidative stress and chromatin remodeling in inflammation. *Nutr. Rev.* **2008**, *66* (Suppl. 1), S42–S45, doi:10.1111/j.1753-4887.2008.00067.x.
41. Zare Javid, A.; Hormoznejad, R.; Yousefimanesh, H.A.; Zakerkish, M.; Haghghi-Zadeh, M.H.; Dehghan, P.; Ravanbakhsh, M. The Impact of Resveratrol Supplementation on Blood Glucose, Insulin, Insulin Resistance, Triglyceride, and Periodontal Markers in Type 2 Diabetic Patients with Chronic Periodontitis. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 108–114, doi:10.1002/ptr.5737.
42. Kang, W.; Hong, H.J.; Guan, J.; Kim, D.G.; Yang, E.J.; Koh, G.; Park, D.; Han, C.H.; Lee, Y.J.; Lee, D.H. Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under insulin-resistant conditions only: In vitro and in vivo experiments in rodents. *Metabolism* **2012**, *61*, 424–433, doi:10.1016/j.metabol.2011.08.003.
43. Sahu, S.S.; Madhyastha, S.; Rao, G.M. Neuroprotective effect of resveratrol against prenatal stress induced cognitive impairment and possible involvement of Na(+), K(+)-ATPase activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2013**, *103*, 520–525, doi:10.1016/j.pbb.2012.09.012.
44. Zhang, N. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. *Anim. Nutr.* **2015**, *1*, 144–151, doi:10.1016/j.aninu.2015.09.002.
45. Peaston, A.E.; Whitelaw, E. Epigenetics and phenotypic variation in mammals. *Mamm. Genome* **2006**, *17*, 365–374, doi:10.1007/s00335-005-0180-2.
46. Cui, D.; Xu, X. DNA Methyltransferases, DNA Methylation, and Age-Associated Cognitive Function. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1315, doi:10.3390/ijms19051315.
47. Brunet, A.; Berger, S.L. Epigenetics of aging and aging-related disease. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med Sci.* **2014**, *69* (Suppl. 1), S17–S20, doi:10.1093/gerona/glu042.
48. Paluszczak, J.; Krajka-Kuzniak, V.; Baer-Dubowska, W. The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicol. Lett.* **2010**, *192*, 119–125, doi:10.1016/j.toxlet.2009.10.010.
49. Frolinger, T.; Herman, F.; Sharma, A.; Sims, S.; Wang, J.; Pasinetti, G.M. Epigenetic modifications by polyphenolic compounds alter gene expression in the hippocampus. *Biol. Open* **2018**, *7*, doi:10.1242/bio.035196.
50. Hsu, C.N.; Lin, Y.J.; Lu, P.C.; Tain, Y.L. Maternal Resveratrol Therapy Protects Male Rat Offspring against Programmed Hypertension Induced by TCDD and Dexamethasone Exposures: Is It Relevant to Aryl Hydrocarbon Receptor? *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2459, doi:10.3390/ijms19082459.
51. Zheng, S.; Feng, Q.; Cheng, J.; Zheng, J. Maternal resveratrol consumption and its programming effects on metabolic health in offspring mechanisms and potential implications. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20171741, doi:10.1042/bsr20171741.

52. Gan, L.; Johnson, J.A. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 1208–1218, doi:10.1016/j.bbadis.2013.12.011.
53. Oeckinghaus, A.; Ghosh, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, a000034, doi:10.1101/cshperspect.a000034.
54. Moore, L.D.; Le, T.; Fan, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* **2013**, *38*, 23–38, doi:10.1038/npp.2012.112.
55. Son, Y.; Byun, S.J.; Pae, H.O. Involvement of heme oxygenase-1 expression in neuroprotection by piceatannol, a natural analog and a metabolite of resveratrol, against glutamate-mediated oxidative injury in HT22 neuronal cells. *Amino Acids* **2013**, *45*, 393–401, doi:10.1007/s00726-013-1518-9.
56. Roberts, V.H.; Pound, L.D.; Thorn, S.R.; Gillingham, M.B.; Thornburg, K.L.; Friedman, J.E.; Frias, A.E.; Grove, K.L. Beneficial and cautionary outcomes of resveratrol supplementation in pregnant nonhuman primates. *FASEB J.* **2014**, *28*, 2466–2477, doi:10.1096/fj.13-245472.
57. Vega, C.C.; Reyes-Castro, L.A.; Rodriguez-Gonzalez, G.L.; Bautista, C.J.; Vazquez-Martinez, M.; Larrea, F.; Chamorro-Cevallos, G.A.; Nathanielsz, P.W.; Zambrano, E. Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 1483–1499, doi:10.1113/jp271543.
58. Li, J.; Li, L.; Wang, S.; Zhang, C.; Zheng, L.; Jia, Y.; Xu, M.; Zhu, T.; Zhang, Y.; Rong, R. Resveratrol Alleviates Inflammatory Responses and Oxidative Stress in Rat Kidney Ischemia-Reperfusion Injury and H₂O₂-Induced NRK-52E Cells via the Nrf2/TLR4/NF-kappaB Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *45*, 1677–1689, doi:10.1159/000487735.
59. Pirola, L.; Frojdo, S. Resveratrol: One molecule, many targets. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 323–332, doi:10.1002/iub.47.
60. Diaz-Gerevini, G.T.; Repossi, G.; Dain, A.; Tarres, M.C.; Das, U.N.; Eynard, A.R. Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition* **2016**, *32*, 174–178, doi:10.1016/j.nut.2015.08.017.
61. Price, N.L.; Gomes, A.P.; Ling, A.J.; Duarte, F.V.; Martin-Montalvo, A.; North, B.J.; Agarwal, B.; Ye, L.; Ramadori, G.; Teodoro, J.S.; et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 675–690, doi:10.1016/j.cmet.2012.04.003.
62. Park, D.; Jeong, H.; Lee, M.N.; Koh, A.; Kwon, O.; Yang, Y.R.; Noh, J.; Suh, P.G.; Park, H.; Ryu, S.H. Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21772, doi:10.1038/srep21772.
63. Tsai, H.Y.; Ho, C.T.; Chen, Y.K. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 134–147, doi:10.1016/j.jfda.2016.07.004.
64. Wang, B.; Ge, S.; Xiong, W.; Xue, Z. Effects of resveratrol pretreatment on endoplasmic reticulum stress and cognitive function after surgery in aged mice. *BMC Anesthesiol.* **2018**, *18*, 141, doi:10.1186/s12871-018-0606-5.
65. Gaballah, H.H.; Zakaria, S.S.; Elbatsh, M.M.; Tahoon, N.M. Modulatory effects of resveratrol on endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis and oxido-inflammatory markers in a rat

model of rotenone-induced Parkinson's disease. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *251*, 10–16, doi:10.1016/j.cbi.2016.03.023.

66. Ennaceur, A.; Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* **1988**, *31*, 47–59.
67. Ennaceur, A.; Meliani, K. Effects of physostigmine and scopolamine on rats' performances in object-recognition and radial-maze tests. *Psychopharmacology* **1992**, *109*, 321–330.
68. Vorhees, C.V.; Williams, M.T. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 848–858, doi:10.1038/nprot.2006.116.

Supplementary material

Table S1. Antibodies used in Western blot studies.

Antibody	Host	Source/Catalog	WB dilution
AMPK	Rabbit	Cell Signaling/#2532	1:1000
p-AMPK	Rabbit	Cell Signaling/#2537	1:1000
mTOR	Rabbit	Millipore/MABS14	1:1000
p-mTOR	Rabbit	Millipore/09-213	1:1000
PERK	Rabbit	Cell Signaling/#3192	1:1000
p-PERK	Rabbit	Cell Signaling/#3179	1:1000
ATF-6	Rabbit	Cell Signaling/#65880	1:1000
BiP	Rabbit	Cell Signaling/D14E12	1:1000
EIF2 α	Rabbit	Cell Signaling/#9722	1:1000
p-EIF2 α	Rabbit	Cell Signaling/#9721	1:1000
β -Actin	Mouse	Sigma/A-5441	1:10000
GAPDH	Mouse	Millipore/MAB374	1:5000
Goat-anti-mouse HRP conjugated		Biorad/#170-5047	1:2000
Goat-anti-rabbit HRP conjugated		Cell Signaling/#7074	1:2000

Table S2. Primers and probes used in qPCR studies.

SYBR Green primers

Target	Product size (bp)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Tet2</i>	113	CCATCATGTTGTGGGACGGA	ATTCTGAGAACAGCGACGGT
<i>Il-6</i>	189	ATCCAGTTGCCTTCTTGGGA CTGA	TAAGCCTCCGACTTGTGAAG TGGT
<i>Cxcl10</i>	72	GGCTAGTCCTAATTGCCCTT GG	TTGTCTCAGGACCATGGCTT G
<i>Hmox1</i>	177	TGACACCTGAGGTCAAGCAC	GTCTCTGCAGGGGCAGTATC
<i>Aox1</i>	286	CATAGGCGGCCAGGAACATT	TCCTCGTTCCAGAATGCAGC
<i>Pgc-1a</i>	274	GGCCTAACTCTCCACAAC	GGTCACCAAACAGCCGAAG A
<i>β-Actin</i>	190	CAACGAGCGGTTCCGAT	GCCACAGGTTCCATACCCA

Taqman probes

Target	Product size (bp)	Reference
<i>Dnmt1</i>	58	Mm01151063_m1
<i>Dnmt3a</i>	58	Mm00432881_m1
<i>Dnmt3b</i>	83	Mm01240113_m1
<i>Tet1</i>	69	Mm01169087_m1
<i>Gapdh</i>	107	Mm99999915_g1

Table 3S. Primer sequences for the MSP primers.

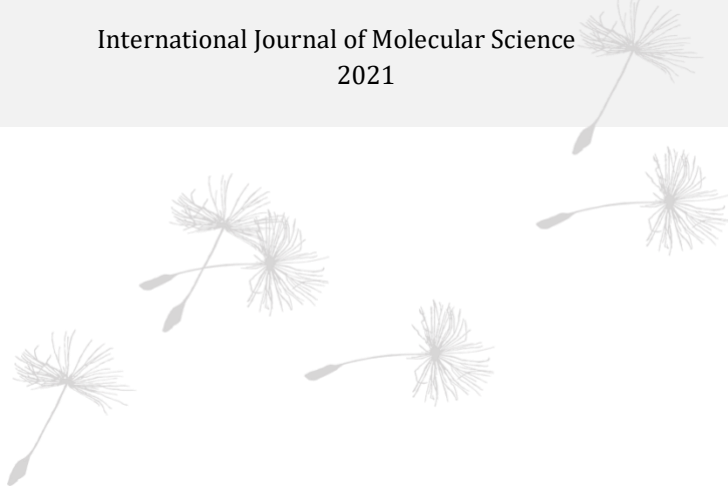
mRNA	Primer (5'-3')	Denaturing °C (s)	Annealing °C (s)	Elongation °C (s)	Cycles
<i>Nrf2</i>		95 (10)	55 (10)	72 (60)	40
	F: TTCGTTGTTCCGATTAGTTA R: CCGACGACGAACTACTTA				
<i>Nf-κβ</i>		95 (10)	55 (10)	72 (60)	40
	F: AAGAGTTTCGAGACGTTATTC R: CTTCCTCCCCTAACTA				

3.2. *Publicación 2*

Resveratrol Supplementation Attenuates Cognitive and Molecular Alterations Under Maternal High-Fat Diet Intake: Epigenetic Inheritance Over Generations

Vanesa Izquierdo, Verónica Palomera-Ávalos, Mercè Pallàs and Christian Griñán-Ferré

International Journal of Molecular Science
2021



Resumen

Factores ambientales como una dieta materna alta en grasas (HFD *High fat diet*) pueden aumentar el riesgo de deterioro cognitivo relacionado con la edad en la descendencia adulta. Los mecanismos epigenéticos son un posible vínculo entre el efecto de la dieta y la neurodegeneración a través de las generaciones. En este estudio encontramos una disminución significativa de los niveles de triglicéridos bajo el efecto de una dieta HFD y RSV (HFD + RSV) y dos generaciones de SAMP8 de las madres que consumieron esta misma dieta (F1 y F2). Primero, obtuvimos un mejor rendimiento cognitivo en los grupos HFD + RSV y su descendencia. Segundo, molecularmente, se encontró un aumento significativo de los niveles de 5-mC, así como un aumento de la expresión génica de las enzimas *Dnmt1* y *Dnmt3a* en el grupo HFD + RSV F1. Además, se encontró un aumento significativo de los niveles de m⁶A en HFD + RSV F1, así como cambios en la expresión génica de sus enzimas *Mettl3* y *Fto*. Además, encontramos una disminución de los niveles de expresión génica de marcadores proinflamatorios como la *Il1-β*, *Il-6*, *Tnf-α*, *Cxcl-10*, *Mcp-1* y *Tgf-β1* en los grupos HFD + RSV y HFD + RSV F1. También, hubo un aumento de la expresión génica de neurotrofinas como *Ngf*, *Nt3* y sus receptores *TrkA* y *TrkB*. Asimismo, se encontró un aumento en los niveles de proteína de BDNF y fosfoproteína quinasa B (p-Akt) en HFD + RSV F1. Estos resultados sugieren que la suplementación materna con RSV bajo la ingesta de HFD previene el deterioro cognitivo en la descendencia adulta de ratones propensos a la senescencia acelerada (SAMP8), promoviendo una reducción en los niveles plasmáticos de triglicéridos y leptina, cambios en el perfil proinflamatorio y restaura el panorama epigenético como así la plasticidad sináptica.

Abstract

Environmental factors as maternal high-fat diet (HFD) intake can increase the risk of age-related cognitive decline in adult offspring. The epigenetic mechanisms are a possible link between diet effect and neurodegeneration across generations. Here, we found a significant decrease in triglyceride levels in a high-fat diet with resveratrol (RSV) HFD + RSV group and the offspring. Firstly, we obtained better cognitive performance in HFD+RSV groups and their offspring. Molecularly, a significant increase in DNA methylation (5-mC) levels, as well as increased gene expression of *DNA methyltransferase 1 (Dnmt1)* and *Dnmt3a* in HFD + RSV F1 group, were found. Furthermore, a significantly increased of N⁶-Methyladenosine methylation (m⁶A) levels in HFD+RSV F1, as well as changes in gene expression of its enzymes *Methyltransferase like 3 (Mettl3)* and *FTO alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase (Fto)* were found. Moreover, we found a decrease in gene expression levels of pro-inflammatory markers such as *Interleukin 1 β (Il1- β)*, *Interleukin 6 (Il-6)*, *Tumor necrosis factor- α (Tnf- α)*, *C-X-C motif chemokine ligand 10 (Cxcl-10)*, the pro-inflammatory factors monocyte chemoattractant protein 1 (Mcp-1) and *Tumor growth factor- β 1 (Tgf- β 1)* in HFD+RSV and HFD+RSV F1 groups. Moreover, there was increased gene expression of neurotrophins such as *Neural growth factor (Ngf)*, Neurotrophin-3 (Nt3), and its receptors *Tropomyosin receptor kinase TrkA* and *TrkB*. Likewise, an increase in protein levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and phospho-protein kinase B (p-Akt) in HFD+RSV F1 was found. These results suggest that maternal RSV supplementation under HFD intake prevents cognitive decline in senescence-accelerated mice prone 8 (SAMP8) adult offspring, promoting a reduction in triglycerides and leptin plasma levels, changes in the pro-inflammatory profile, and restoring the epigenetic landscape as well as synaptic plasticity.

Keywords: cognitive decline; epigenetics; resveratrol; high-fat diet; aging; SAMP8; N⁶-Methyladenosine methylation; multigenerational inheritance.

Introduction

Due to the advanced age in modern societies, research in aging-hallmarks leading to neurodegeneration and Alzheimer's disease (AD), is an important scientific field [1]. Aging has been linked to progressive brain deterioration, leading to impaired cognitive function, and increasing vulnerability to death [2]. This cognitive impairment is commonly accompanied by different molecular alterations like inflammation, synaptic dysfunction, and epigenetic modification, among others [3]. Therefore, pleiotropic compounds to rescue them is a significant field of research [4].

In this regard, nutrition and supplementation are important components of healthy brain aging, particularly in those with dementia [5]. It is well-established that the consumption of a high-fat diet (HFD) increases the risk of several chronic diseases, including age-related cognitive decline [6]. Accordingly, studies have evidenced the link between HFD and neurodegeneration through several altered pathways. Among them, Wang and coworkers (2020) found the inflammation and synaptic plasticity [7]. Inflammation and synaptic dysfunction are two of the most important events in neurodegeneration and AD; further inflammation can alter synaptic plasticity engendering cognitive impairment [8,9]. Microglia activation is considered the main hallmark of neuroinflammation that releases pro-inflammatory cytokines such as Interleukin 1 beta (IL1- β), Interleukin 6 (IL-6), or Tumor necrosis factor- α (TNF- α) [10]. Likewise, the synaptic plasticity is primarily mediated by neurotrophins, among them, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and neurotrophin-3 (NT3), allowing the permissive conditions under which plasticity can appear [11,12].

On the other hand, evidence suggests that epigenetic mechanisms are an important contributor to the pathogenesis of age-related neurodegenerative diseases [13,14]. Likewise, there is a relationship between the effect of neuroinflammation, synaptic dysfunction and the epigenetic landscape [15]. Recently, it has been described that nutrients can affect epigenetic marks such as DNA methylation (5-mC), hydroxymethylation (5-hmC) as well as RNA N⁶-methyladenosine methylation (m⁶A), thereby promoting changes in gene expression of critical genes associated with the pathophysiology of several age-related diseases, including AD [16,17]. Thus, epigenetics has emerged as a tool for understanding a broad range of human diseases, such as type 2 diabetes mellitus, obesity, inflammation, and neurodegenerative disorders [14,18,19]. In utero, an HFD supplementation in rodents causes a metabolic syndrome-like (MeS) state that can be transmitted across multiple generations from directly exposed generation (transgenerational inheritance - F1) to indirectly exposed generation (transgenerational inheritance - F2) through non-genetic factors such as epigenetic mechanisms [20,21]. Moreover, several studies have demonstrated that HFD exposure promoted leptin's epigenetic modifications, persisting for multiple generations [22-24]. Thus, transgenerational epigenetic inheritance can be modulated by exposures occurring during life in the P0 generation, impacting in the F2, as the F1 germline cells have not been directly exposed. Overall, those key events demonstrate the active involvement in the maintenance of neuronal integrity, synapses and cognitive function for the individual and his offspring [25,26].

Resveratrol (RSV) (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) is a natural phytoalexin produced in grapes, peanuts, and its derivatives, with a plethora of beneficial effects as an anti-inflammatory and synaptic plasticity inductor, including epigenetic

modifications [27,28]. RSV also exerts neuroprotection in several neuropathological conditions [29–31]. Previous results from our group have demonstrated that RSV modulates key pathways for the correct neuronal function, improving cognitive decline in the senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) and its offspring [32]. However, the pleiotropic mechanism of action of RSV is not completely described, although increasing evidence in animal models brings to light the beneficial effects of polyphenols such as RSV across generations [33,34].

The SAMP8 mouse is a well-established aging animal model, generated by phenotypic selection from the genetic pool of AKR/J mice [35]. The SAMP8 strain manifests behavioral alterations, age-related cognitive decline, as well as neuropathological AD hallmarks [36]. Jointly with AD hallmarks, several key events associated with neurodegeneration are presented in SAMP8 mice such as neuroinflammation [35], and synaptic dysfunction [13,37]. Of note, those changes are accompanied by epigenetic alterations [17,38]. Furthermore, several studies demonstrated that non-pharmacological interventions such as environmental enrichment (EE), and diet supplementation can induce changes in the epigenome, reducing cognitive decline and modifying key neurodegenerative pathways altered in SAMP8 [39,40].

Concretely, the present work aimed to prove the neuroprotective effects of maternal RSV supplementation under HFD intervention in SAMP8 offspring through neuroinflammation, synaptic dysfunction as well as delving deep into the epigenetic patterns modulated by a RSV supplementation. Therefore, we demonstrated that SAMP8 under HFD enriched with RSV showed a preserved cognitive decline across generations, being an important insight for RSV use in public health interventions favoring healthy aging.

Materials and Methods

Animals

SAMP8 offspring were generated from the high-fat diet (HFD) group (Females F0 (HFD F0, $n = 4$) that had access to diet (AIN-93G) modified to provide 60% of Kcal from fat with carbohydrate/protein/fat ratio of 16:23:61 % of Kcal). Specifically, HFD + RSV contains 1g/kg w/w of RSV (Females HFD+RSV F0, $n = 4$). Mice were fed for 2 months and the supplementation diet was interrupted before crossing HFD + RSV F0 females with ND males, which had access to standard chow with carbohydrate/protein/fat ratio of 64:19:17 % of Kcal to obtain the first generation (the intergenerational inheritance offspring (HFD + RSV F1, $n = 14$; females $n = 4$, males $n = 10$) for accelerating the transgenerational effect one generation early (in F2 instead of F3). Then, we crossed HFD + RSV F1 females (Females HFD + RSV F1, $n = 4$) with ND males to generate the second generation (the transgenerational inheritance offspring HFD + RSV F2, $n = 15$; females $n = 10$, males $n = 5$). HFD + RSV F1 and HFD + RSV F2 groups were fed a standard diet (Figure 1A). The intervention sample size was chosen following previous studies in our laboratory and using one of the available interactive tools (<http://www.biomath.info/power/index.html>). Animals had free access to food, water and were kept under standard temperature conditions (22 ± 2 °C) as well as 12 h:12 h light-dark cycles (300 lux/0 lux) until 6 months of age. The body weight of the animals was monitored weekly.

Mice were treated according to European Community Council Directive 86/609/EEC and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona (670/14/8102, approved at 11/14/2014) and by Generalitat de Catalunya, Spain (10291, approved at

1/28/2018). Every effort was made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals.

Behavioural Test

- Novel Object Recognition Test (NORT)

In summary, mice were placed in a 90 °, two-arms, 25 cm-long, 20 cm-high, 5 cm-wide black mazes. Firstly, mice were individually habituated to the maze for 10 min for 3 days. On the fourth day, the animals were exposed to a 10 min acquisition trial (first trial), during which they were placed in the maze in the presence of two identical novel objects at the end of each arm. After 2 h, the animal was exposed to two objects, in this time, one old object and one novel object. On the fifth day, the animal was exposed at 24 h in the same conditions. The time that mice explored the Novel object (TN) and Time that mice explored the Old object (TO) were measured generating a Discrimination Index (DI) that we calculated as $(TN - TO)/(TN + TO)$ in both performances evaluating short- and long-term memory of animals. To avoid object preference biases objects were counterbalanced. The maze, surface, and objects were cleaned with 70% ethanol between the animal's trials to eliminate olfactory cues.

- Morris Water Maze (MWM)

To evaluate mice's spatial learning and memory, we exposed the animals to an open circular pool (100 cm in diameter, 50 cm in height) filled with water. Water was painted white with latex in order to opaque it, and its temperature was 22 ± 1 °C. Two perpendicular axes were defined; thus, the water surface was divided into four quadrants (NE, SE, SW, and NW) and five starting points were set (NE, E, SE, S, and SW). For visual clues (N, S, E, and W) were placed on the walls of the tank so that animal could orientate and fulfill the objective. MWM consisted of training

mice to find a submerged platform (Learning phase), for 6 consecutive days, and assess whether the animal had learned and remembered where the platform was the last day (day 7) when it was removed (Spatial memory test). For 6 learning days, 5 trials were performed in 5 different points that we explained before. In each trial, the mouse was placed gently into the water, facing the wall of the pool, allowed to swim for 60 s, and there was not a resting time between trials. If the animal could not locate the platform, the investigator guided it to the platform and was allowed to rest and orientate for 30 s. The platform was placed approximately in the middle of one of the quadrants, 1.5 cm below the water level. Above the pool, a camera recorded the animal's swimming paths with SMART® program ver.3.0 (Panlab, Cornellà, BCN, Spain). During the learning phase, a learning curve was drawn, in which is represented the latency to find the platform every training day. More parameters were measured on the day test, such as the target crossings, the distance swum to target or time in the platform zone.

Immunodetection Experiments

- Brain Processing

Mice were euthanized one day after behavioral tests finished by cervical dislocation. Brains were immediately removed, and the hippocampus was isolated and frozen on powdered dry ice. They were kept at -80°C until use.

- Plasma Isolated, Leptin and Triglycerides Quantification

Briefly, trunk blood was collected when the mice were euthanized using heparinized tubes (Micro tube 1.1 mL Z-Gel; Sarstedt AG & Co. KG). Plasma was isolated by centrifugation for 5 min at $10,000 \times g$ at 20°C and frozen at -20°C until assay. We quantified Leptin levels in plasma samples with the kit mouse leptin ELISA Kit (Cat. # EZML-82-K© 2013 EMD Millipore, Burlington, MA, USA). This kit

to detect leptin in samples with specific antibodies binds to leptin and reacts in sufficient substrate presence. The enzyme activity was measured spectrophotometrically by colorimetric reaction at the absorbance of 450 nm and corrected by 590 nm. Therefore, the increase in absorbance is directly proportional to the amount of captured leptin in samples. Later, we quantified using a standard curve of known concentrations of mouse leptin (0.23–30 ng/mL). The determination of triglycerides concentration was performed using a triglyceride meter device (Accutrend® Plus, Cobas, Roche), in which a drop of blood covered the corresponding strips.

- Western Blotting (WB)

The hippocampus tissue from each animal was homogenized in lysis buffer (Tris HCl pH 7.4 mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM and 1X-Triton X-100) containing phosphatase and protease inhibitors (Cocktail II, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to obtain total protein homogenates. The Bradford technique determined total protein concentration. Aliquots of 15 µg of total hippocampal protein were used and separated by sodium dodecyl sulfate-polyAcrylamide Gel Electrolisis (SDS-PAGE) (8–20%) and transferred into polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Burlington, MA, USA) for 2 h. The membranes were blocked in 5% non-fat milk in TRIS-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1h at room temperature. And then, overnight incubation at 4 °C with primary antibodies listed in Table S1 was carried out. On the next day, membranes were washed with TBS-T 3 times for 5 min and incubated with secondary antibodies for 1h at room temperature. Immunoreactive protein was viewed with a Chemiluminiscence-based detection kit, following the manufacturer's protocol (ECL Kit, Millipore, Burlington, MA, USA), and digital images were acquired using a ChemiDoc XRS+ System (BioRad, Hercules, CA, USA). Semi-quantitative analyses were done using ImageLab Software (BioRad), and results were expressed in Arbitrary Units (AU)

considering control protein levels as 100%. Protein loading was routinely monitored by immunodetection of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH).

- RNA Extraction and Gene Expression Determination by q-PCR

Total RNA isolation from hippocampal tissue was carried out using TRIsure™ reagent following the manufacturer's instructions (Bioline Reagent, Memphis, TN, USA). The yield, purity, and quality of RNA were determined spectrophotometrically with a NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) apparatus and an Agilent 2100B Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). RNAs with 260/280 ratios and RIN higher than 7.5, respectively, were selected. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed as follows: 2 µg of messenger RNA (mRNA) was reverse-transcribed using the High-capacity cDNA reverse transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time quantitative PCR (qPCR) was used to quantify mRNA expression of chromatin-modifying, inflammatory, and synaptic plasticity genes listed in Table S2.

Real-time PCR was performed by using Step One Plus Detection System (Applied-Biosystems,) employing SYBR® Green PCR Master Mix (Applied-Biosystems). Each reaction mixture contained 6.75 µL of complementary DNA (cDNA) (which concentration was 2 µg/µL), 0.75 µL of each primer (which concentration was 100 nM), and 6.75 µL of SYBR® Green PCR Master Mix (2X).

Data were analyzed utilizing the comparative Cycle threshold (Ct) method ($\Delta\Delta Ct$), where the housekeeping gene level was used to normalize differences in sample loading and preparation. Normalization of expression levels was performed with β -actin for SYBR® Green-based real-time PCR results. Each sample was

analyzed in duplicate, and the results represent the n-fold difference of the transcript levels among different groups.

- Global DNA Methylation Determination

Briefly, isolation of genomic DNA from hippocampal tissue was conducted using the FitAmp™ Blood and Cultured Cell DNA Extraction Kit, according to the manufacturer's instructions. Then, Methylflash Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek, Farmingdale, NY, USA) was used to detect methylated DNA. Specifically, this kit is based on the antibody detection of 5-mC residues that allows colorimetric quantification by reading absorbance at 450 nm using a Microplate Photometer. The absolute amount of methylated DNA (proportional to the Optical Density [OD] intensity) was measured and quantified using a standard curve plotting OD values vs. five serial dilutions of a control methylated DNA (0.5–10 ng).

- m⁶A RNA Methylation Quantification

To determine m⁶A RNA methylation status from hippocampal tissue, we used the EpiQuik™ m⁶A Quantification Kit according to the manufacturer's instructions (Epigentek, Farmingdale, NY, USA) using total RNA isolated from mice. The kit is based on specific antibody detection of m⁶A residues, which trigger an ELISA-like reaction that allows colorimetric quantification by reading absorbance at 450 nm using a Microplate Photometer. The absolute amount of m⁶A (proportional to the Optical Density [OD] intensity) was measured and quantified using a standard curve plotting OD values vs. six serial dilutions of a control m⁶A (0.01–0.5 ng).

Data Analysis

The statistical analysis was conducted using GraphPad Prism ver. 8 statistical software. Data are expressed as the mean ± Standard Error of the Mean (SEM) of at

least 7 samples per group for behavioral tests and 3-5 samples per group for molecular analysis. Means were compared by One-way Analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post-hoc analysis or two-tail Student's t-test when it was necessary. Correlations among different parameters were analyzed with Pearson's correlation. Statistical significance was considered when p-values were <0.05. The Statistical outliers were determined with Grubbs' test and subsequently removed from the analysis.

Results

Body Weight Progression in SAMP8 HFD + RSV and its Offspring

Body weight evolution was measured starting from 1 month of age, and then we monitored for 14 weeks. All mice groups increased body weight along with the experiment. Furthermore, no differences between HFD and HFD + RSV groups were found (Figure 1B). Next, we measured the triglycerides (TG) and leptin plasma levels of SAMP8 mice to determine the induction of the MeS after HFD. We found a significant decreased TG levels in HFD SAMP8 mice directly supplemented with RSV (HFD +R SV group), and its offspring, compared to HFD mice in F1 (Figure 1C). Remarkably, we found a significant decrease in leptin plasma levels in HFD+RSV groups in comparison with the HFD group. (Figure 1D).

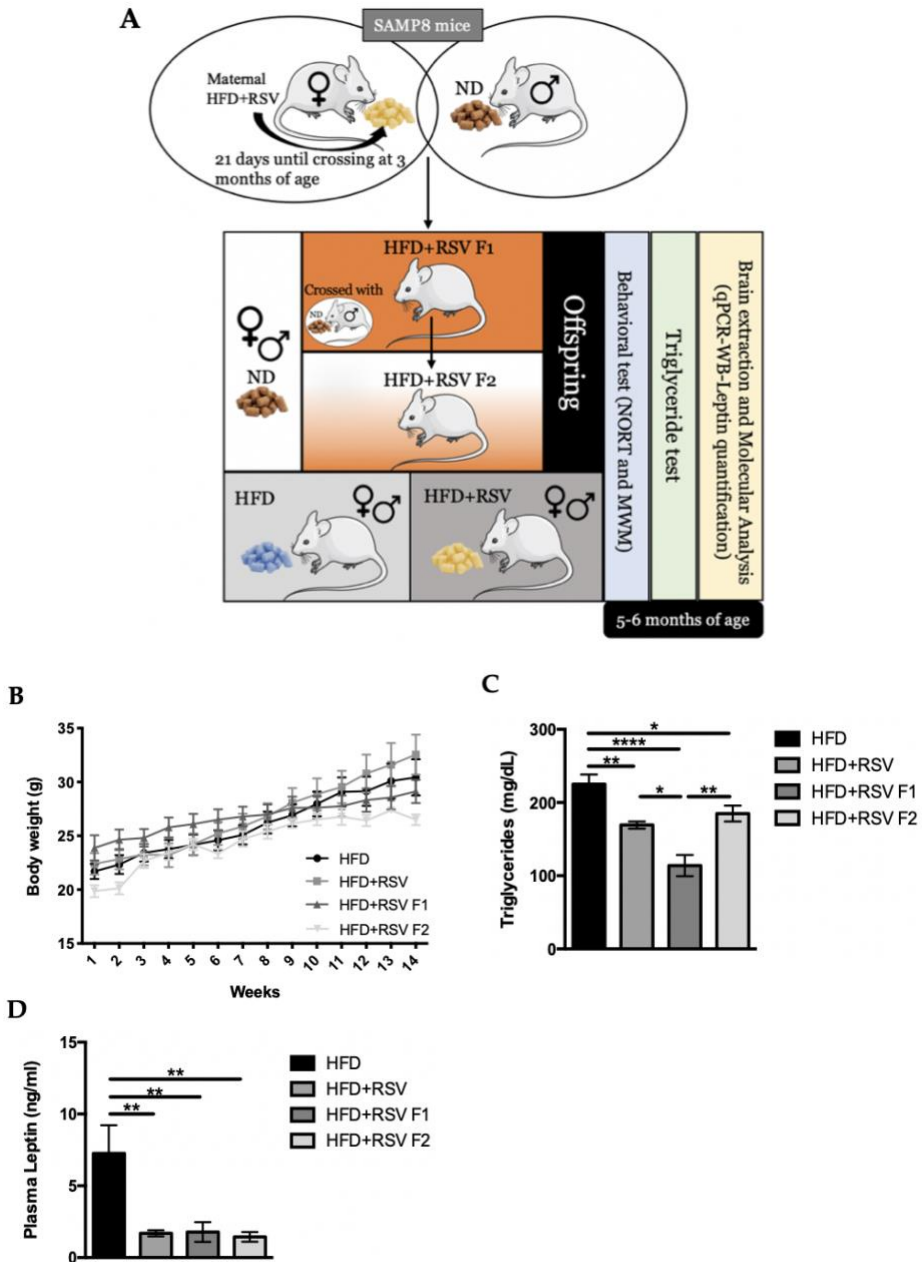


Figure 1. Overview of the experimental design and procedure to obtain the offspring of HFD+RSV (direct exposed parental group), HFD + RSV F1 (direct exposed generation - intergenerational inheritance), HFD + RSV F2 (indirect exposed generation - transgenerational

inheritance). Mice performed the behavioral test that measured memory state, later euthanized, and brain extraction was performed for the subsequent molecular analysis at 6 months of age (A). Results of body weight from each week (B). Results of TG (mg/dL) in blood (C). Results of plasma leptin levels (ng/mL) (D). Values represented are mean \pm Standard error of the mean (SEM); n = 60 (HFD n = 14, HFD + RSV n = 15, HFD + RSV F1 n = 14, HFD + RSV F2 n = 15; for each group). Statistics: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

RSV Prevented Cognitive Impairment Induced by HFD in SAMP8 Mice Across Generations

Mice cognitive state was evaluated by the novel object recognition test (NORT) and morris water maze (MWM). The HFD group showed an impaired short-term memory in comparison with HFD+RSV and HFD + RSV F1 groups. Also, we found an improvement of discrimination index (DI) between HFD and HFD + RSV F2 group, but a lower extend than for F1, demonstrating the efficacy of the RSV dietary supplementation, including over generations (Figure 2A). Furthermore, a clear improvement in the long-term memory in all HDF+RSV groups was found, being only significantly increased in the HDF + RSV directly exposed parental group (Figure 2B). We also found an improvement in cognition regarding the spatial memory tested by MWM. Namely, every mouse reduced the latency to platform the test day in comparison with the first day of learning with no effect of RSV supplementation (Figure 2C). However, we observed that the HFD + RSV F1 group showed a significant decrease in the latency to reach the target compared to the other groups (Figure 2D). Likewise, the HFD + RSV F1 was the unique group that had a significant decrease in distance to the target, confirming the RSV's effect on cognition in the offspring (Figure 2E).

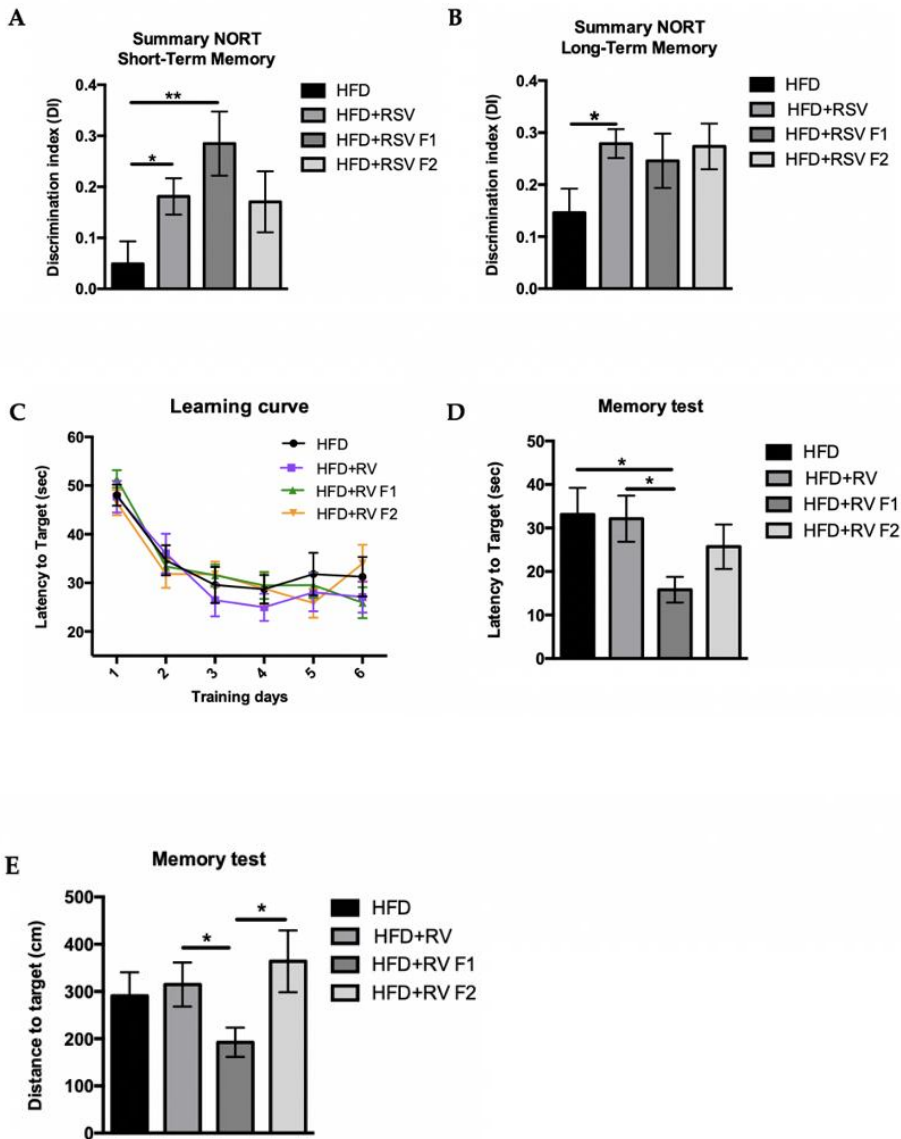


Figure 2. Results of Discrimination index (DI) of short-term memory (A) and long-term memory (B) from NORT of SAMP8 at 6 months of age for all. Results of Morris Water Maze (MWM) in SAMP8 mice at 6 months of age for all groups. The learning curve of the memory test for 6 days (C). Latency to the target in time at day 7 (spatial memory test) (D), and distance traveled at day 7 (spatial memory test) (E). Values represented are mean ± Standard error of the mean (SEM); n = 60 (HFD n = 14, HFD + RSV n = 17, HFD + RSV F1 n = 14, HFD + RSV F2 n = 15; for each group, same sample size of females and males). Statistics: *p < 0.05; **p < 0.01.

Adult Offspring of SAMP8 Mice Showed Global Changes in Methylation Patterns and Its Machinery After Maternal HFD + RSV Diet, As Well as a Correlation with Cognitive Improvement

We studied the 5-mC and m⁶A levels in the hippocampus of SAMP8 mice at 6 months of age after the HFD exposure and RSV supplementation. On one hand, we only found that 5-mC levels were significantly increased in HFD + RSV F1 mice compared to the HFD group (Figure 3A). In the same way, we studied the gene expression of several methyltransferases, which modulate this epigenetic mark (Figure 3B). Results showed a significantly increased gene expression of *DNA methyltransferase 1 (Dnmt1)* and *DNA methyltransferase 3 alpha (Dnmt3a)* in the HFD + RSV F1 group in comparison with the other groups, confirming the epigenetic inheritance in the next generation directly exposed to RSV and losing the pattern maintenance in the F2 generation the indirectly exposed (Figure 3B). Then, the m⁶A levels were measured. We found that the HFD + RSV F1 group showed significantly increased levels compared to the other groups (Figure 3C). In parallel, there was a significantly reduced gene expression of the enzymes *Methyltransferase like 3 (Mettl3)* and *FTO alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase (Fto)* in HFD + RSV and HFD + RSV F1 compared to the HFD group (Figure 3D), as well as increased m⁶A levels in the HFD + RSV F2 group in comparison with the HFD + RSV F1. Next, we only found a significantly increased gene expression of *Fto* in the HFD + RSV F2 group (Figure 3D). By last, we found a positive correlation between 5-mC levels and the DI evaluated in NORT [$r = 0.6972$, $p = 0.0464$], showing that increased 5-mC levels is associated with cognitive improvement (Figure 3E). Likewise, a clear tendency of a positive correlation between m⁶A levels and the DI was evaluated [$r^2 = 0.3643$, $p = 0.0801$], suggesting that increased m⁶A levels are associated with cognitive improvement (Figure 3F).

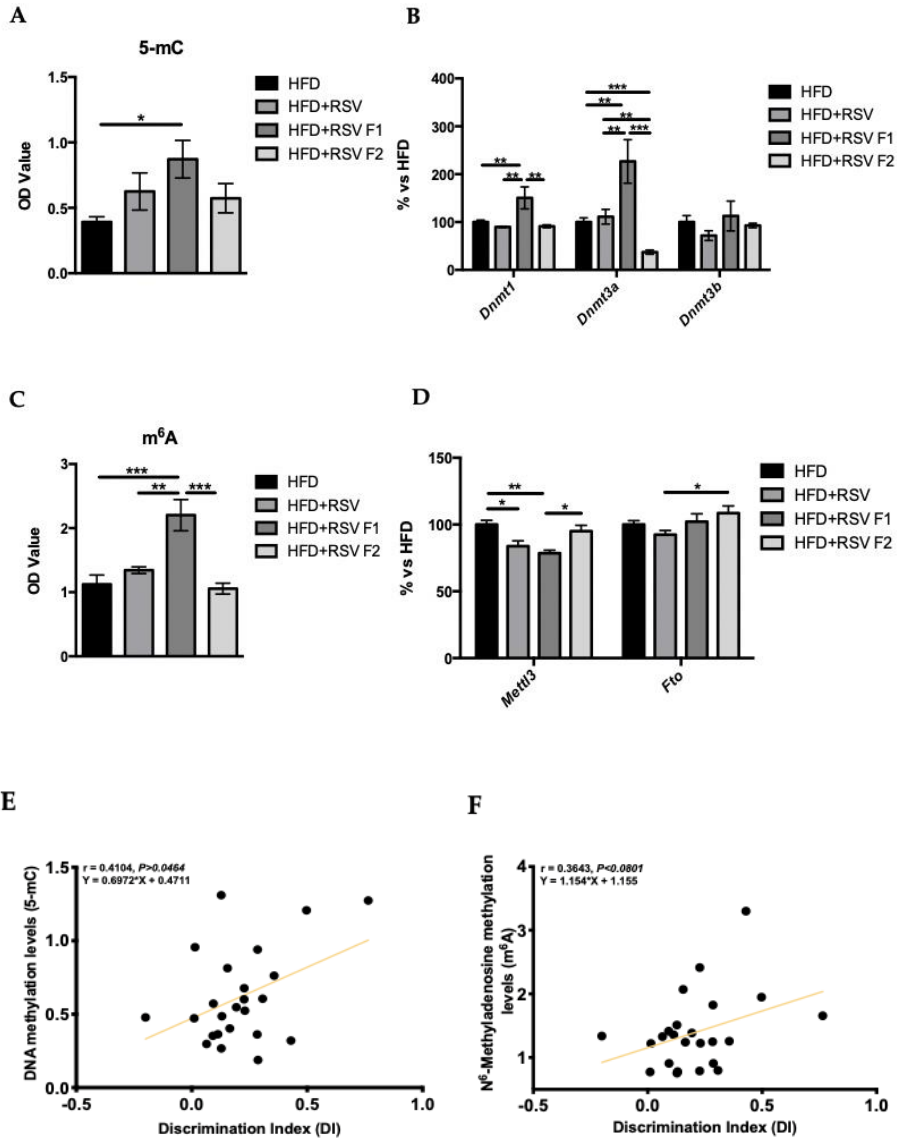
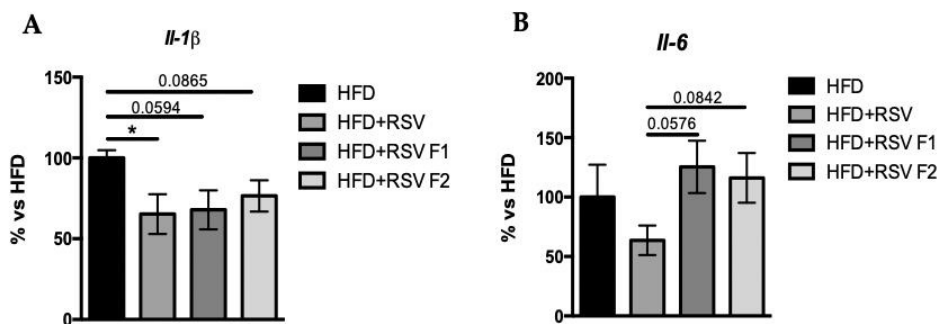


Figure 3. 5-mC levels in the hippocampus of SAMP8 mice at 6 months of age for all groups (A). Relative gene expression of *Dnmt1*, *Dnmt3a*, and *Dnmt3b* (B). m⁶A levels from the hippocampus of SAMP8 mice at 6 months of age for all groups (C). Relative gene expression for *Mettl3* and *Fto* (D). Correlations between 5-mC levels (E), m⁶A (F) with discrimination index (DI). Gene expression levels were measured by real-time PCR from hippocampal tissue. Gene expression data from each RSV group were compared to the HFD group (set at 100%); n = 16-24 (HFD n = 4-6, HFD + RSV n = 4-6, HFD +

RSV F1 n = 4-6, HFD + RSV F2 n = 4-6; for each group, females n = 3-4, males n = 3-4). Statistics: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Person correlations were performed between the behavioral test and molecular parameters for each group (n = 6). R and p-values were indicated on graphs. The level of significance was p < 0.05.

RSV Diet Modified the Inflammatory Markers in the Hippocampus of SAMP8 and Its Offspring Under HFD.

One of the main effects of RSV is its anti-inflammatory effect. For this reason, we studied the gene expression of some pro-inflammatory markers in the hippocampus of SAMP8 mice. Firstly, we found a significantly decreased gene expression for *Il1-β*, *Il-6*, *C-X-C motif chemokine ligand 10 (Cxcl-10)*, the pro-inflammatory factors *monocyte chemoattractant protein 1 (Mcp-1)*, *Transforming growth factor beta 1 (Tgf-β1)*, and a significantly decreased for *Tnf-α* in the HFD + RSV compared to the HFD group (Figure 4A-F). Moreover, the HFD + RSV F1 and HFD + RSV F2 groups showed mainly the same gene expression pattern for pro-inflammatory markers *Il1-β*, *Il-6*, and *Mcp-1* and *Tgf-β1* suggesting the multigenerational effects of RSV. However, *Cxcl-10* gene expression changes were lost in F2 (Figure 4C).



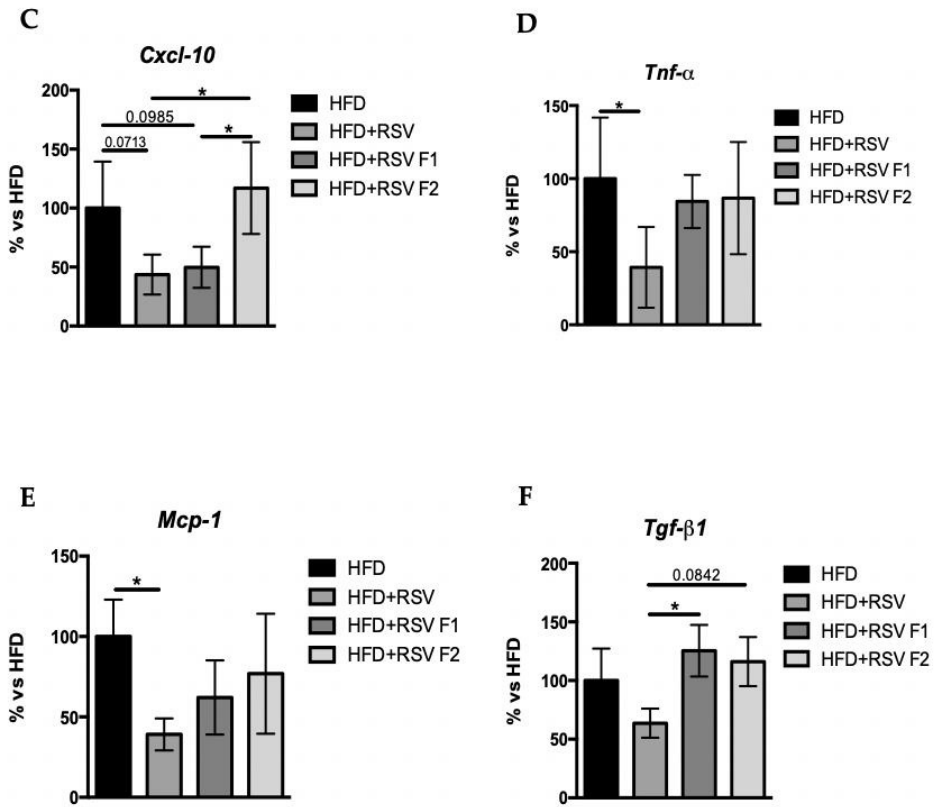
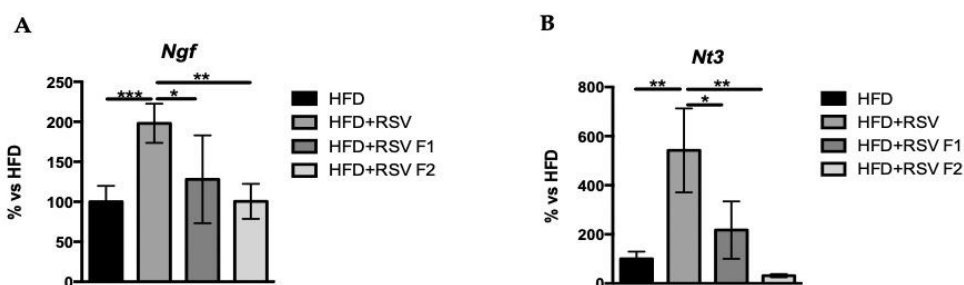


Figure 4. Results of gene expression of inflammatory markers for *Il1-β* (A), *Il-6* (B), *Cxcl-10* (C), *Tnf-α* (D), *Mcp-1* (E), and *Tgf-β1* (F) in the hippocampus of SAMP8 mice at 6 months of age. Gene expression levels were measured by real-time PCR from hippocampal tissue. Gene expression data from each RSV group were compared to the HFD group (set at 100%); n = 16-24 (HFD n = 4-6, HFD + RSV n = 4-6, HFD + RSV F1 n = 4-6, HFD + RSV F2 n = 4-6; for each group, females n = 3-4, males n = 3-4). Statistics: *p < 0.05.

RSV Diet Rescued Synaptic Dysfunction, Reverting the Effects of HFD in the Hippocampus of SAMP8 Mice and Its Offspring

To evaluate the synaptic dysfunction, we investigated several neurotrophins that modulate this process. Our findings were that the HFD + RSV group showed a statistically significant increased gene expression in neurotrophins such as *Nerve growth factor (Ngf)* and *Neurotrophin-3 (Nt3)* in comparison with the other groups (Figure 5A, 5B). Likewise, we evaluated the gene expression levels of its receptors, and we found that the *Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2 (TrkB)* had a significant increase in the HFD+RSV F1 group in comparison with the other groups (Figure 5C). However, we obtained a significant decrease in gene expression of *Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1 (TrkA)* (Figure 5C) despite the increased *Ngf* expression levels. Next, the WB analysis revealed a significant increase in BDNF protein levels in the HFD+RSV F1, but no change was found in the HFD+RSV (directly exposed parental group) and HFD+RSV F2 (indirectly exposed generation) groups compared to the HFD group (Figure 5D). Moreover, the ratio of phosphorylated protein kinase B (p-Akt) and total protein levels (p-Akt/Akt total) was measured, and we found a significant increase in HFD + RSV group in comparison with HFD as well as a tendency to maintain the same pattern protein levels of p-Akt in the next generation, suggesting, in this case, the intergenerational inheritance of RSV (Figure 5E).



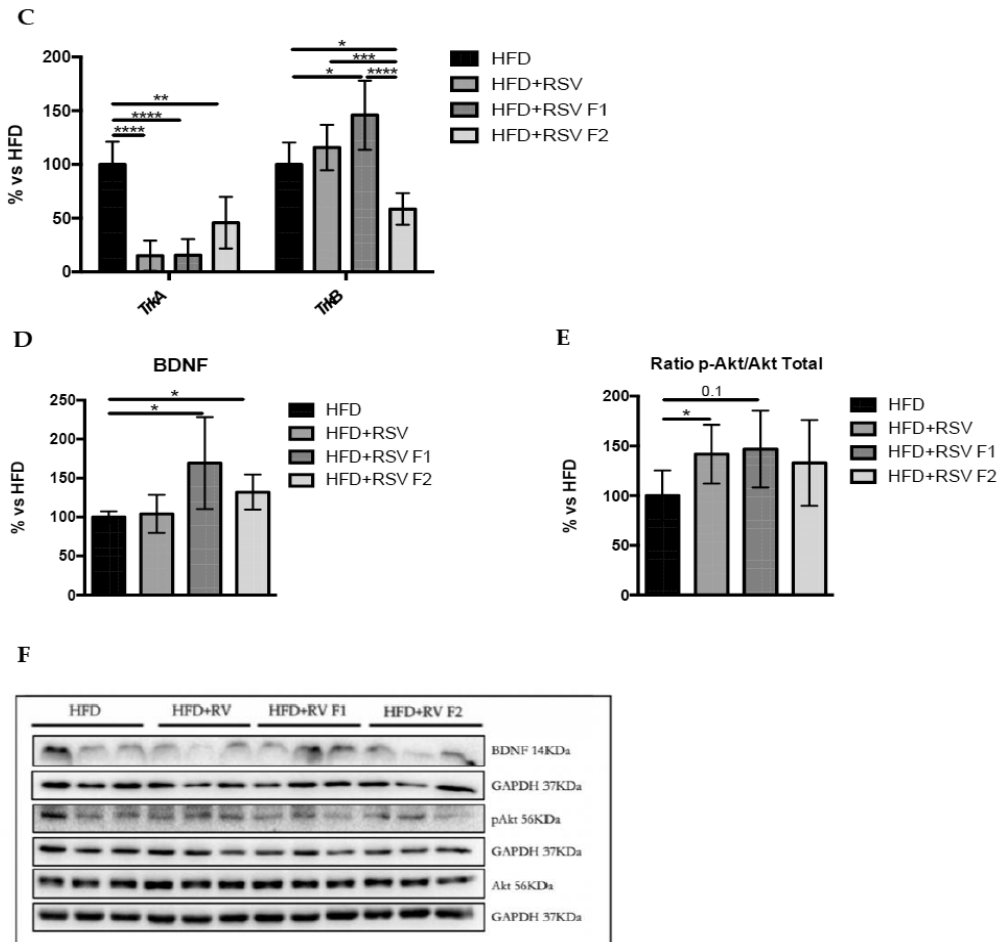


Figure 5. Synaptic plasticity markers in the hippocampus of SAMP8 mice at 6 months of age. Results of gene expression of *Ngf* (A), *Nt3* (B), and their receptors *TrkA* and *TrkB* (C). Quantifications (D, E) and representative results by WB of BDNF and p-Akt (F). Gene expression levels were measured by real-time PCR from hippocampal tissue. Data from each group were compared to the HFD group (set at 100%). Mean \pm Standard error of the mean (SEM) in bar graphs are adjusted to 100% for each gene of HFD group; n = 16–24 (HFD n = 4–6, HFD + RSV n = 4–6, HFD + RSV F1 n = 4–6, HFD + RSV F2 n = 4–6; for each group, females n = 3–4, males n = 3–4). Statistics: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Discussion

The global increase in life expectancy can be associated with cognitive impairment and AD through lifestyle changes [41]. The nutrition as a key factor involved in cognitive decline onset is clear [42]. Indeed, animal and human studies have highlighted the link between alterations in life environment and increased risk of cognitive decline in later life, including effects on the offspring [43,44]. A growing body of evidence demonstrates that HFD promotes MeS associated with impaired glucose tolerance, hypertriglyceridemia, increased leptin levels, among others, being relevant for the progression of age-related cognitive decline and AD [45,46]. However, although some knowledge exists the mechanisms by which environmental insults can have long-term effects on offspring are relatively unclear. To date, no definitive mechanisms have been demonstrated that could explain multigenerational inheritance after diet or supplementation exposure. However, there have been reports of epigenetic modification following HFD intervention within the next generation, including RSV interventions. Thus, in the present study, we showed that maternal RSV supplementation not only recovers some of the key events presented in neurodegeneration such as epigenetic modifications, neuroinflammation, synaptic dysfunction as well as cognitive impairment, but we also demonstrated the maintenance on the offspring. Our previous data demonstrated that RSV intake supplementation promoted changes in the cognitive state and molecular pathways in the hippocampus of SAMP8 transmitted to the offspring [32].

On the one hand, as mentioned, HFD is considered as a main cause to the onset of MeS in animal models. Importantly, SAMP8 mice have a particular response to HFD. For instance, weight gain or glucose tolerance was not impaired after HFD, probably because SAMP8 demonstrates increased insulin sensitivity in

normal diet conditions [47]. On the other hand, it is well described that maternal HFD sensitizes offspring to metabolic dysregulation and that RSV dietary supplementation improved most of the altered metabolic dysregulation [48]. Here, we reported that body weight is unchanged among groups, suggesting the same effect of the HFD across generations, and confirming the previous studies in which we did not observe changes in body weight and caloric intake in SAMP8 fed with HFD or HFD+RSV [49,50]. Interestingly, we found that RSV alleviates some MeS traits induced by HFD by reducing triglycerides and leptin plasma levels in all HFD+RSV groups compared to the HFD group, suggesting that RSV can promote peripheral effects regarding the hypertriglyceridemia and leptin resistance induced by HFD. In the same line, a recent report described that RSV diet after weaning could alleviate leptin resistance induced by HFD [51].

Considering the well-demonstrated beneficial effects of RSV regarding cognition [32], we examined cognition by NORT and MWM. Results revealed HFD-fed mice supplemented with RSV displayed better cognitive performance than mice not supplemented, showing higher DI in short- and long-term memories. The novelty was identified for F1 and F2 mice after 24 h of the first trial, indicating a beneficial effect of maternal RSV in offspring, albeit not direct RSV contact with individuals. In spatial memory analysis, some discrepancies were found among HFD+RSV groups, although a better spatial memory was determined in the F1 generation, these improvements disappear in the F2 generation.

As mentioned, RSV has pleiotropic actions in the organism modifying several molecular pathways starting with its antioxidant action or anti-inflammatory, furthermore to activation of NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1 (SIRT1), then RSV can affect epigenetic marks [52–56]. Regarding the intervention with HFD, RSV protective role against HFD has been described [57,58] as well as its

neuroprotective effects can be transmitted across generations by epigenetic modifications in parents [59,60]. In this regard, in addition to improvements in cognition, changes in epigenetic patterns induced by RSV have been found, including in their offspring. 5-mC has been demonstrated as essential for learning and memory, cognitive function [28], age-related alterations, as well as synaptic plasticity [61]. Remarkably, we found a higher degree of 5-mC levels in all HFD+RSV groups, being statistically significant in the F1 generation. Accordingly, we showed changes in the methylation enzymatic machinery (*Dnmt1* and *Dnmt3a*) gene expression profile in the HFD + RSV F1 group, suggesting these two enzymes' requirements to promote changes in 5-mC pattern modifications. Similarly, several reports have been shown the modification of 5-mC patterns in the offspring after maternal supplementation of other compounds, such as folate [62], methionine [63], choline [64] or restrictive diet [65]. Likewise, in our study, we found a significant correlation between the increased 5-mC levels and cognitive improvement, suggesting the association of these two parameters in SAMP8. Hence, those reports and our results pointed out the 5-mC as a potential epigenetic target for cognitive decline in ageing and AD onset. Next, we evaluated the m⁶A an epigenetic mark, the most abundant modification in eukaryotic RNA. m⁶A RNA methylation and gene expression changes are determined in development and related to AD onset [66,67]. Nevertheless, few studies focused on the association between m⁶A and cognitive impairment and, until now, no in vivo study has demonstrated the participation of the m⁶A in cognitive decline in aging and AD. In this regard, abnormalities in m⁶A levels, including the *Mettl3* and *Fto* gene expression, was reported in the cortex and hippocampus of double transgenic mice of amyloid precursor protein and presenilin 1 (APP/PS1) mice, a model of AD, in comparison with the healthy control [66]. Thus, our results provide the first evidence in which RSV consumption induced changes in the hippocampus of SAMP8, a model of accelerated senescence and early-onset AD, in the offspring for

this epigenetic marker. Strikingly, the highest levels of m⁶A appear in the HFD + RSV F1 group, but this epigenetic mark was lost in F2. These results can be explained, in part, by underlying germline effects promoted by RSV. Those effects were not found in the F2 generation due to is the indirectly RSV exposed generation group. As it is well-known, some epigenetic marks are erased in each generation. In parallel, the expression of *Mettl3* in the hippocampus of HFD+RSV in the F1 generation was lower than the HFD group and HFD + RSV F2, suggesting the intergenerational inheritance, but not transgenerational effect. In the *Fto* expression case, we only found changes between the HFD+RSV and HFD + RSV F2 groups, confirming the loss of the inheritance effect promoted by RSV in the hippocampus of SAMP8 for this epigenetic mark. Furthermore, we found a tendency to correlate the m⁶A levels and cognitive improvement, suggesting the participation of this epigenetic mark in cognition.

Neuroinflammation has been linked with the risk of developing cognitive impairment [68,69]. At the same time, it is well established the anti-inflammatory effect of RSV by different mechanisms such as SIRT1 activation, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) down-regulation, including the modulation of microglial activation, thereby promoting a reduction of pro-inflammatory cytokines already mentioned [70,71]. A diminished gene expression of several pro-inflammatory cytokines in HFD + RSV groups was found in the current work, demonstrating the transmission across generations of the anti-inflammatory effect. However, the HFD + RSV F2 group's anti-inflammatory pattern was bizarre (inconsistent), suggesting the low transmission across generations (transgenerational epigenetic inheritance), losing beneficial RSV effect when undirect action was evaluated. Indeed, previous findings which demonstrate the anti-inflammatory effects induced by maternal RSV supplementation showed the same discrepancies regarding its transgenerational effect [32]. The fact that

inflammation and oxidative stress processes can be activated in different ways could explain the loss of effect in offspring [72–74].

Given the synaptic disruption is the higher correlate of cognitive loss, alterations in the synaptic plasticity process are considered one of the most critical mechanisms of age-related cognitive decline [75] and AD [76]. Thus, it is well known the role of neurotrophins in the impaired memory formation and neuronal degeneration [77,78]. For instance, long term potentiation (LTP) is necessary for memory formation and is maintained by BDNF and NT3 at TrkB receptor [77], resulting in structural changes at the synapse [78]. Likewise, NGF and its neurotrophin receptor TrkA promote the same effect in the synaptic contact between neurons [79]. In this study, we found robust changes for some of the neurotrophins and receptors in the HFD + RSV groups. In line with our results, some studies have been described that RSV induces the expression of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), BDNF, and NT3 under different interventions in the brain, confirming our data [80–82]. Moreover, little has been published on transgenerational changes in neurotrophins after maternal RSV supplementation. Here, we found subtle changes in HFD + RSV F1 group and the HFD + RSV F2 groups, demonstrating the reduced capacity of RSV to modify epigenetic marks that are maintained in the indirectly exposed generation, and consequently facilitate changes in the expression of neurotrophic pathways across generations, that are related to molecular neuroprotective effects observed in F1 and F2. The increased p-Akt ratio in HFD+RSV groups in comparison with the HFD group was found, confirming the neuroprotective effect of RSV by promoting synaptic plasticity.

Taken together, the new data presented above demonstrated that maternal RSV supplementation mediated several modifications under HFD through reduction of hypertriglyceridemia and leptin resistance, epigenetic alterations,

neuroinflammation, and synaptic dysfunction for maintaining better cognitive performance in SAMP8 and its offspring (Figure 6). Therefore, this study shows new important insights of the beneficial effects and mechanisms promoted by RSV after maternal supplementation on inheritance, reinforcing the importance of lifestyle interventions in preventing cognitive decline and neurodegenerative diseases through strategies based on a healthy diet or food intake supplementation.

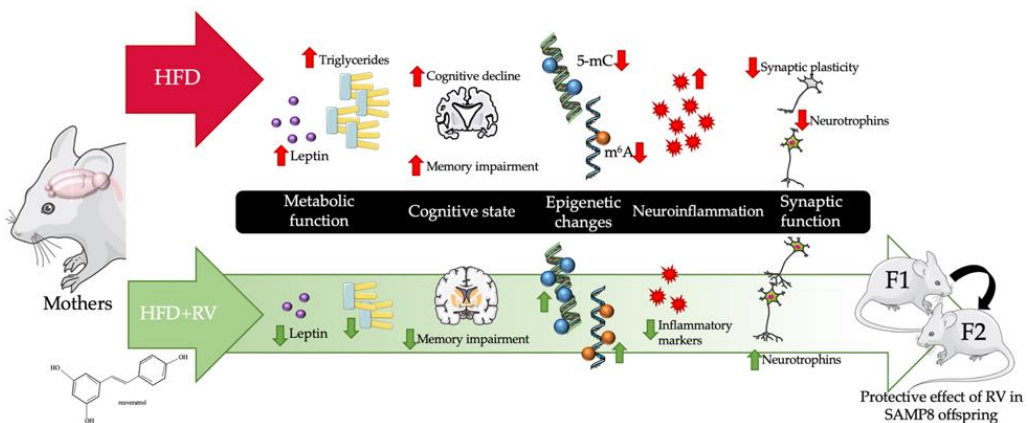


Figure 6. Schematic representation of the neuroprotective effects observed of maternal RSV intake under HFD across generations in SAMP8.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/xxx/s1. **Table S1.** Antibodies used in Western blot studies. **Table S2.** Primers used in qPCR.

Author Contributions: M. P., and C. G.-F. designed the study. V.I., V.P.-A., and C. G.- carried out the behavior and cognition studies and molecular parameters determination. V.I., V.P.-A., C.G.-F., and M.P. contributed to writing the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding: This study was funded by Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain and FEDER funds (PID2019-106285RB). V.I., C.G.-F. and M.P. belong to 2017SGR106 (AGAUR,

Catalonia). Financial support for F.V. (University of Barcelona, APIF_2017), and V.P.-Á. (University of Guadalajara, V/2014/2016).

Conflicts of Interest: The authors of this manuscript have no conflict of interest to declare.

Abbreviations

AD	Alzheimer's disease
Akt	Protein kinase B
ANOVA	One-way analysis of variance
APP/PS1 mice	Double transgenic mice of amyloid precursor protein and presenilin 1
BDNF	Bran-derived neurotrophic factor
cDNA	Complementary DNA
CNS	Central nervous system
Ct	Cycle threshold
Cxcl-10	C-X-C motif chemokine ligand 10
DI	Discrimination index
DNA	Desoxyribonucleic acid
5-hmC	Hydroxymethylation
5-mC	DNA methylation
Dnmt1	DNA methyltransferase 1
Dnmt3a	DNA methyltransferase 3 alpha
Dnmt3b	DNA methyltransferase 3 beta
Fto	Alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor
HFD	High fat diet
HFD+RSV	High fat diet with resveratrol parental group
HFD+RSV F1	High fat diet with resveratrol first generation
HFD+RSV F2	High fat diet with resveratrol second generation
Il-6	Interleukin 6
Il-1β	Interleukin 1 beta
LTP	Long term potentiation
m⁶A	N ⁶ -methyladenosine
Mcp-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MeS	Metabolic syndrome
Mettl3	Methyltransferase like 3
mRNA	Mature messenger RNA
MWM	Morris water maze
ND	Normal diet
NF-$\kappa$$\beta$	Nuclear factor NF-kappa-B
NGF	Nerve growth factor
NORT	Novel object recognition test
NT3	Neurotrophin-3
OD	Optical density
OS	Oxidative stress
p-Akt	Phosphorylated RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidene difluoride
qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcriptional-polymerase chain reaction

RSV	Resveratrol
SAMP8	Senescence-accelerated mouse prone 8
SAMR1	Senescence-accelerated mouse resistant 1
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard error of the mean
SIRT1	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1
TBS	Tris-buffer saline
TBS-T	Tris-buffer saline tween 20
TG	Triglycerides
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
TN	Time with new object
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
TO	Time with old object
TrkA	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1
TrkB	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2
WB	Western blot

References

1. López-Otín, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **2013**, *153*, 1194–1217.
2. Association, A. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* **2018**, *14*, 367–429.
3. Sugiura, M. Functional neuroimaging of normal aging: Declining brain, adapting brain. *Ageing Res. Rev.* **2016**, *30*, 61–72.
4. Chernoff, R. The symbiotic relationship between oral health, nutrition, and aging. *Generations* **2016**, *40*, 32–38.

5. Bhatti, G.K.; Reddy, A.P.; Reddy, P.H.; Bhatti, J.S. Lifestyle Modifications and Nutritional Interventions in Aging-Associated Cognitive Decline and Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2020**, *11*, 1–15.
6. Spencer, S.J.; D'Angelo, H.; Soch, A.; Watkins, L.R.; Maier, S.F.; Barrientos, R.M. High-fat diet and aging interact to produce neuroinflammation and impair hippocampal-and amygdalar-dependent memory. *Neurobiol. Aging* **2017**, *58*, 88–101.
7. Wang, Z.; Ge, Q.; Wu, Y.; Zhang, J.; Gu, Q.; Han, J. Impairment of Long-term Memory by a Short-term High-fat Diet via Hippocampal Oxidative Stress and Alterations in Synaptic Plasticity. *Neuroscience* **2020**, *424*, 24–33.
8. Griñan-Ferré, C.; Palomera-Ávalos, V.; Puigoriol-Illamola, D.; Camins, A.; Porquet, D.; Plá, V.; Aguado, F.; Pallàs, M. Behaviour and cognitive changes correlated with hippocampal neuroinflammation and neuronal markers in female SAMP8, a model of accelerated senescence. *Exp. Gerontol.* **2016**, *80*, 57–69.
9. Mottahedin, A.; Ardalan, M.; Chumak, T.; Riebe, I.; Ek, J.; Mallard, C. Effect of neuroinflammation on synaptic organization and function in the developing brain: Implications for neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 190.
10. Di Benedetto, S.; Müller, L.; Wenger, E.; Düzel, S.; Pawelec, G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2017**, *75*, 114–128.
11. Gibon, J.; Barker, P.A. Neurotrophins and proneurotrophins: Focus on synaptic activity and plasticity in the brain. *Neuroscientist* **2017**, *23*, 587–604.
12. Leal, G.; Bramham, C.R.; Duarte, C.B. BDNF and hippocampal synaptic plasticity. In *Vitamins and Hormones*; Edited by Gerald Litwack. Elsevier: 2017; Volume 104, pp. 153–195. Amsterdam, [Netherlands] : Academic Press. ISBN 0083-6729.
13. Ren, H.L.; Lv, C.N.; Xing, Y.; Geng, Y.; Zhang, F.; Bu, W.; Wang, M.W. Downregulated nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) aggravates cognitive impairments via neuroinflammation and synaptic plasticity in the senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mouse: A model of accelerated senescence. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2018**, *24*, 1132.
14. Berson, A.; Nativio, R.; Berger, S.L.; Bonini, N.M. Epigenetic regulation in neurodegenerative diseases. *Trends. Neurosci.* **2018**, *41*, 587–598.
15. Li, K.; Wei, Q.; Liu, F.-F.; Hu, F.; Xie, A.; Zhu, L.-Q.; Liu, D. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: a β , tau, and epigenetic alterations. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 3021–3032.
16. Gangisetty, O.; Cabrera, M.A.; Murugan, S. Impact of epigenetics in aging and age related neurodegenerative diseases. *Front. Biosci.* **2018**, *23*, 1445–1464.

17. Griñán-Ferré, C.; Corpas, R.; Puigoriol-Illamola, D.; Palomera-Ávalos, V.; Sanfeliu, C.; Pallàs, M. Understanding epigenetics in the neurodegeneration of Alzheimer's disease: SAMP8 mouse model. *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, *62*, 943–963.
18. Zhang, W.; Song, M.; Qu, J.; Liu, G.-H. Epigenetic modifications in cardiovascular aging and diseases. *Circ. Res.* **2018**, *123*, 773–786.
19. Rosen, E.D.; Kaestner, K.H.; Natarajan, R.; Patti, M.-E.; Sallari, R.; Sander, M.; Susztak, K. Epigenetics and epigenomics: Implications for diabetes and obesity. *Diabetes* **2018**, *67*, 1923–1931.
20. Seki, Y.; Suzuki, M.; Guo, X.; Glenn, A.S.; Vuguin, P.M.; Fiallo, A.; Du, Q.; Ko, Y.-A.; Yu, Y.; Susztak, K. In utero exposure to a high-fat diet programs hepatic hypermethylation and gene dysregulation and development of metabolic syndrome in male mice. *Endocrinology* **2017**, *158*, 2860–2872.
21. Wang, D.; Yan, J.; Teng, M.; Yan, S.; Zhou, Z.; Zhu, W. In utero and lactational exposure to BDE-47 promotes obesity development in mouse offspring fed a high-fat diet: Impaired lipid metabolism and intestinal dysbiosis. *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, 1847–1860.
22. Yang, J.L.; Jiang, H.; Pan, F.; Ho, C.S.H.; Ho, R.C.M. The effects of high-fat-diet combined with chronic unpredictable mild stress on depression-like behavior and leptin/leprb in male rats. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35239.
23. Almeida, M.M.; Dias-Rocha, C.P.; Reis-Gomes, C.F.; Wang, H.; Atella, G.C.; Cordeiro, A.; Pazos-Moura, C.C.; Joss-Moore, L.; Trevenzoli, I.H. Maternal high-fat diet impairs leptin signaling and up-regulates type-1 cannabinoid receptor with sex-specific epigenetic changes in the hypothalamus of newborn rats. *Psychoneuroendocrinology* **2019**, *103*, 306–315.
24. Masuyama, H.; Mitsui, T.; Eguchi, T.; Tamada, S.; Hiramatsu, Y. The effects of paternal high-fat diet exposure on offspring metabolism with epigenetic changes in the mouse adiponectin and leptin gene promoters. *Am. J. Physiol. Metab.* **2016**, *311*, E236–E245.
25. Gomes, R.M.; Bueno, F.G.; Chamber, C.R.; de Mello, J.C.P.; de Oliveira, J.C.; Francisco, F.A.; Moreira, V.M.; Junior, M.D.F.; Pedrino, G.R.; de Freitas Mathias, P.C. Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *61*, 24–32.
26. Zhang, Q.; Xiao, X.; Zheng, J.; Li, M.; Yu, M.; Ping, F.; Wang, T.; Wang, X. A Maternal High-Fat Diet Induces DNA Methylation Changes That Contribute to Glucose Intolerance in Offspring. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2019**, *10*, 1–13.
27. Li, J.; Zhang, C.-X.; Liu, Y.-M.; Chen, K.-L.; Chen, G. A comparative study of anti-aging properties and mechanism: Resveratrol and caloric restriction. *Oncotarget* **2017**, *8*, 65717.

28. Costa, D.; Scognamiglio, M.; Fiorito, C.; Benincasa, G.; Napoli, C. Genetic background, epigenetic factors and dietary interventions which influence human longevity. *Biogerontology* **2019**, *20*, 605–626.
29. Lange, K.W. Red wine, resveratrol, and Alzheimer's disease. *Mov. Nutr. Heal. Dis.* **2018**, *2*, doi:10.5283/mnhd.11.
30. Szkudelski, T.; Szkudelska, K. Potential of resveratrol in mitigating metabolic disturbances induced by ethanol. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *101*, 579–584.
31. Pineda-Ramírez, N.; Gutiérrez Aguilar, G.F.; Espinoza-Rojo, M.; Aguilera, P. Current evidence for AMPK activation involvement on resveratrol-induced neuroprotection in cerebral ischemia. *Nutr. Neurosci.* **2018**, *21*, 229–247.
32. Izquierdo, V.; Palomera-Ávalos, V.; López-Ruiz, S.; Canudas, A.-M.; Pallàs, M.; Griñan-Ferré, C. Maternal resveratrol supplementation prevents cognitive decline in senescent mice offspring. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1134.
33. Zheng, S.; Feng, Q.; Cheng, J.; Zheng, J. Maternal resveratrol consumption and its programming effects on metabolic health in offspring mechanisms and potential implications. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20171741.
34. Hsu, M.-H.; Sheen, J.-M.; Lin, I.; Yu, H.-R.; Tiao, M.-M.; Tain, Y.-L.; Huang, L.-T. Effects of Maternal Resveratrol on Maternal High-Fat Diet/Obesity with or without Postnatal High-Fat Diet. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3428.
35. Akiguchi, I.; Pallàs, M.; Budka, H.; Akiyama, H.; Ueno, M.; Han, J.; Yagi, H.; Nishikawa, T.; Chiba, Y.; Sugiyama, H. SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology* **2017**, *37*, 293–305.
36. Liu, B.; Liu, J.; Shi, J.-S. SAMP8 mice as a model of age-related cognition decline with underlying mechanisms in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2020**, *75*, 385–395.
37. Pan, W.; Han, S.; Kang, L.; Li, S.; Du, J.; Cui, H. Effects of dihydrotestosterone on synaptic plasticity of the hippocampus in mild cognitive impairment male SAMP8 mice. *Exp. Ther. Med.* **2016**, *12*, 1455–1463.
38. Cosín-Tomás, M.; Álvarez-López, M.J.; Companys-Aleman, J.; Kaliman, P.; González-Castillo, C.; Ortuño-Sahagún, D.; Pallàs, M.; Griñan-Ferré, C. Temporal integrative analysis of mRNA and microRNAs expression profiles and epigenetic alterations in female SAMP8, a model of age-related cognitive decline. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 596.
39. Griñan-Ferré, C.; Pérez-Cáceres, D.; Gutiérrez-Zetina, S.M.; Camins, A.; Palomera-Avalos, V.; Ortuño-Sahagún, D.; Rodrigo, M.T.; Pallàs, M. Environmental enrichment improves behavior, cognition,

- and brain functional markers in young senescence-accelerated prone mice (SAMP8). *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 2435–2450.
40. Griñan-Ferré, C.; Puigoriol-Illamola, D.; Palomera-Ávalos, V.; Pérez-Cáceres, D.; Companys-Aleman, J.; Camins, A.; Ortuño-Sahagún, D.; Rodrigo, M.T.; Pallàs, M. Environmental enrichment modified epigenetic mechanisms in SAMP8 mouse hippocampus by reducing oxidative stress and inflammaging and achieving neuroprotection. *Front. Aging Neurosci.* **2016**, *8*, 241.
 41. Zhao, C.; Noble, J.M.; Marder, K.; Hartman, J.S.; Gu, Y.; Scarmeas, N. Dietary patterns, physical activity, sleep, and risk for dementia and cognitive decline. *Curr. Nutr. Rep.* **2018**, *7*, 335–345.
 42. Gardener, S.L.; Rainey-Smith, S.R. The role of nutrition in cognitive function and brain ageing in the elderly. *Curr. Nutr. Rep.* **2018**, *7*, 139–149.
 43. Klein, C.P.; Hoppe, J.B.; Saccomori, A.B.; Dos Santos, B.G.; Sagini, J.P.; Crestani, M.S.; August, P.M.; Hözer, R.M.; Grings, M.; Parmeggiani, B. Physical exercise during pregnancy prevents cognitive impairment induced by amyloid- β in adult offspring rats. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 2022–2038.
 44. Kusuyama, J.; Alves-Wagner, A.B.; Makarewicz, N.S.; Goodyear, L.J. Effects of maternal and paternal exercise on offspring metabolism. *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 858–872.
 45. Jha, S.K.; Jha, N.K.; Kumar, D.; Ambasta, R.K.; Kumar, P. Linking mitochondrial dysfunction, metabolic syndrome and stress signaling in Neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2017**, *1863*, 1132–1146.
 46. de Boleti, A.P.A.; Almeida, J.A.; Migliolo, L. Impact of the metabolic syndrome on the evolution of neurodegenerative diseases. *Neural Regen. Res.* **2020**, *16*, 688.
 47. Rui, Y.; Cheng, J.; Qin, L.; Shan, C.; Chang, J.; Wang, G.; Wan, Z. Effects of vitamin D and resveratrol on metabolic associated markers in liver and adipose tissue from SAMP8 mice. *Exp. Gerontol.* **2017**, *93*, 16–28.
 48. Huang, Y.-C.; Huang, L.-T.; Sheen, J.-M.; Hou, C.-Y.; Yeh, Y.-T.; Chiang, C.-P.; Lin, I.-C.; Tiao, M.-M.; Tsai, C.-C.; Lin, Y.-J. Resveratrol treatment improves the altered metabolism and related dysbiosis of gut programmed by prenatal high-fat diet and postnatal high-fat diet exposure. *J. Nutr. Biochem.* **2020**, *75*, 108260.
 49. Palomera-Ávalos, V.; Griñán-Ferré, C.; Izquierdo, V.; Camins, A.; Sanfeliu, C.; Canudas, A.M.; Pallàs, M. Resveratrol modulates response against acute inflammatory stimuli in aged mouse brain. *Exp. Gerontol.* **2018**, *102*, 3–11.
 50. Palomera-Avalos, V.; Griñán-Ferré, C.; Izquierdo, V.; Camins, A.; Sanfeliu, C.; Pallàs, M. Metabolic stress induces cognitive disturbances and inflammation in aged mice: Protective role of resveratrol. *Rejuvenation Res.* **2017**, *20*, 202–217.

51. Yu, H.; Sheen, J.; Tiao, M.; Tain, Y.; Chen, C.; Lin, I.; Lai, Y.; Tsai, C.; Lin, Y.; Tsai, C. Resveratrol Treatment Ameliorates Leptin Resistance and Adiposity Programed by the Combined Effect of Maternal and Post-Weaning High-Fat Diet. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*, 1801385.
52. Ford, D.; Ions, L.J.; Alatawi, F.; Wakeling, L.A. The potential role of epigenetic responses to diet in ageing. *Proc. Nutr. Soc.* **2011**, *70*, 374–384.
53. Vanden Berghe, W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: Lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacol. Res.* **2012**, *65*, 565–576.
54. Komorowska, J.; Wątroba, M.; Szukiewicz, D. Review of beneficial effects of resveratrol in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. *Adv. Med. Sci.* **2020**, *65*, 415–423.
55. Huang, J.; Huang, N.; Xu, S.; Luo, Y.; Li, Y.; Jin, H.; Yu, C.; Shi, J.; Jin, F. Signaling mechanisms underlying inhibition of neuroinflammation by resveratrol in neurodegenerative diseases. *J. Nutr. Biochem.* **2020**, *88*, 108552.
56. Ramos-Lopez, O.; Milagro, F.I.; Riezu-Boj, J.I.; Martinez, J.A. Epigenetic signatures underlying inflammation: An interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* **2020**, 1–21, doi:10.1007/s00011-020-01425-y.
57. Zhang, N.; Li, Z.; Xu, K.; Wang, Y.; Wang, Z. Resveratrol protects against high-fat diet induced renal pathological damage and cell senescence by activating SIRT1. *Biol. Pharm. Bull.* **2016**, *39*, 1448–1454.
58. Ding, S.; Jiang, J.; Zhang, G.; Bu, Y.; Zhang, G.; Zhao, X. Resveratrol and caloric restriction prevent hepatic steatosis by regulating SIRT1-autophagy pathway and alleviating endoplasmic reticulum stress in high-fat diet-fed rats. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0183541.
59. Zou, T.; Chen, D.; Yang, Q.; Wang, B.; Zhu, M.; Nathanielsz, P.W.; Du, M. Resveratrol supplementation of high-fat diet-fed pregnant mice promotes brown and beige adipocyte development and prevents obesity in male offspring. *J. Physiol.* **2017**, *595*, 1547–1562.
60. Tsai, T.-A.; Tsai, C.-K.; Huang, L.-T.; Sheen, J.-M.; Tiao, M.-M.; Tain, Y.-L.; Chen, C.-C.; Lin, I.; Lai, Y.-J.; Tsai, C.-C. Maternal Resveratrol Treatment Re-Programs and Maternal High-Fat Diet-Induced Retroperitoneal Adiposity in Male Offspring. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 2780.
61. Karpova, N.N.; Sales, A.J.; Joca, S.R. Epigenetic basis of neuronal and synaptic plasticity. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 771–793.
62. Pauwels, S.; Ghosh, M.; Duca, R.C.; Bekaert, B.; Freson, K.; Huybrechts, I.; Langie, S.A.S.; Koppen, G.; Devlieger, R.; Godderis, L. Maternal intake of methyl-group donors affects DNA methylation of metabolic genes in infants. *Clin. Epigenetics* **2017**, *9*, 16.

63. Velazquez, M.R.; Batistel, F.; Rodriguez, J.M.P.; Relling, A.E. Effects of maternal dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and methionine during late gestation on fetal growth, DNA methylation, and mRNA relative expression of genes associated with the inflammatory response, lipid metabolism and DNA methylation in placenta and offspring's liver in sheep. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2020**, *11*, 1–15.
64. Kwan, S.T.C.; King, J.H.; Grenier, J.K.; Yan, J.; Jiang, X.; Roberson, M.S.; Caudill, M.A. Maternal choline supplementation during normal murine pregnancy alters the placental epigenome: Results of an exploratory study. *Nutrients* **2018**, *10*, 417.
65. Nowacka-Wozuk, J.; Madeja, Z.E.; Chmurzynska, A. Prenatal caloric restriction alters lipid metabolism but not hepatic Fasn gene expression and methylation profiles in rats. *BMC Genet.* **2017**, *18*, 78.
66. Han, M.; Liu, Z.; Xu, Y.; Liu, X.; Wang, D.; Li, F.; Wang, Y.; Bi, J. Abnormality of m6A mRNA methylation is involved in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 98.
67. Huang, H.; Camats-Perna, J.; Medeiros, R.; Anggono, V.; Widagdo, J. Altered Expression of the m6A Methyltransferase METTL3 in Alzheimer's Disease. *Eneuro* **2020**, doi:10.1523/ENEURO.0125-20.2020.
68. Miyanohara, J.; Kakaie, M.; Nagayasu, K.; Nakagawa, T.; Mori, Y.; Arai, K.; Shirakawa, H.; Kaneko, S. TRPM2 channel aggravates CNS inflammation and cognitive impairment via activation of microglia in chronic cerebral hypoperfusion. *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 3520–3533.
69. Sharma, V.; Bryant, C.; Montero, M.; Creegan, M.; Slike, B.; Krebs, S.J.; Ratto-Kim, S.; Valcour, V.; Sithinamsuwan, P.; Chalermchai, T. Monocyte and CD4+ T-cell antiviral and innate responses associated with HIV-1 inflammation and cognitive impairment. *Aids* **2020**, *34*, 1289–1301.
70. Pan, W.; Yu, H.; Huang, S.; Zhu, P. Resveratrol protects against TNF- α -induced injury in human umbilical endothelial cells through promoting sirtuin-1-induced repression of NF-KB and p38 MAPK. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147034.
71. Devi, S.A.; Chamoli, A. Polyphenols as an Effective Therapeutic Intervention Against Cognitive Decline During Normal and Pathological Brain Aging. In *Reviews on New Drug Targets in Age-Related Disorders*; Springer Nature Switzerland AG. **2020**; pp. 159–174. ISBN 978-3-030-42667-5.
72. Gessner, D.K.; Ringseis, R.; Eder, K. Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2017**, *101*, 605–628.
73. Lu, H.; Wang, B.; Cui, N.; Zhang, Y. Artesunate suppresses oxidative and inflammatory processes by activating Nrf2 and ROS-dependent p38 MAPK and protects against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 6639–6646.

74. Wang, H.; Zhang, Y.; Han, Q.; Xu, Y.; Hu, G.; Xing, H. The inflammatory injury of heart caused by ammonia is realized by oxidative stress and abnormal energy metabolism activating inflammatory pathway. *Sci. Total Environ.* **2020**, *742*, 140532.
75. Tian, X.; Liu, Y.; Ren, G.; Yin, L.; Liang, X.; Geng, T.; Dang, H.; An, R. Resveratrol limits diabetes-associated cognitive decline in rats by preventing oxidative stress and inflammation and modulating hippocampal structural synaptic plasticity. *Brain Res.* **2016**, *1650*, 1–9.
76. Tang, J.; Oliveros, A.; Jang, M.-H. Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and synaptic degeneration in Alzheimer disease. *Int. Neurol.* **2019**, *23*, S5.
77. Miranda, M.; Morici, J.F.; Zanoni, M.B.; Bekinschtein, P. Brain-derived neurotrophic factor: A key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 363.
78. Heisz, J.J.; Clark, I.B.; Bonin, K.; Paolucci, E.M.; Michalski, B.; Becker, S.; Fahnstock, M. The effects of physical exercise and cognitive training on memory and neurotrophic factors. *J. Cogn. Neurosci.* **2017**, *29*, 1895–1907.
79. Canu, N.; Amadoro, G.; Triaca, V.; Latina, V.; Sposato, V.; Corsetti, V.; Severini, C.; Ciotti, M.T.; Calissano, P. The intersection of NGF/TrkA signaling and amyloid precursor protein processing in Alzheimer's disease neuropathology. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1319.
80. Wang, X.; Xie, Y.; Zhang, T.; Bo, S.; Bai, X.; Liu, H.; Li, T.; Liu, S.; Zhou, Y.; Cong, X. Resveratrol reverses chronic restraint stress-induced depression-like behaviour: Involvement of BDNF level, ERK phosphorylation and expression of Bcl-2 and Bax in rats. *Brain Res. Bull.* **2016**, *125*, 134–143.
81. Rosa, P.M.; Martins, L.A.M.; Souza, D.O.; Quincozes-Santos, A. Glioprotective effect of resveratrol: An emerging therapeutic role for oligodendroglial cells. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 2967–2978.
82. Wang, X.; Ma, S.; Yang, B.; Huang, T.; Meng, N.; Xu, L.; Xing, Q.; Zhang, Y.; Zhang, K.; Li, Q. Resveratrol promotes hUC-MSCs engraftment and neural repair in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* **2018**, *339*, 297–304.

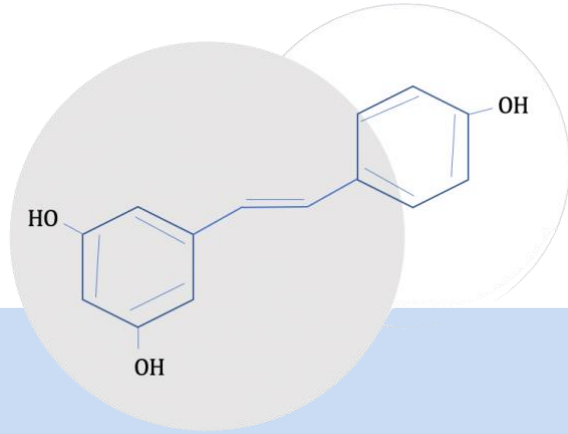
Supplementary materials

Table 1. Antibodies used in Western blot studies.

Antibody	Host	Source/Catalog	WB dilution
BDNF	Rabbit	Santa Cruz/sc-20981	1:1000
p-Akt (S473) (D9E)	Rabbit	Cell signaling/#4060	1:1000
Akt	Rabbit	Cell signaling/#9272	1:1000
GAPDH	Mouse	Millipore/MAB374	1:2000
Goat-anti-mouse HRP conjugated		BioRad/170-5047	1:2000
Goat-anti-rabbit HRP conjugated		BioRad/170-6515	1:2000

Table 2. Primers used in qPCR studies.

Target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Cxcl-10</i>	GGCTAGTCCTAATGCCCTTGG	TTGTCTCAGGACCATGGCTTG
<i>Dnmt1</i>	ACCTGGAGAGCAGAAATGGC	TGAAAGGGTGTCACGTGCCG
<i>Dnmt3a</i>	GAGCCGCCTGAAGCCC	TCTTCCTTGCCACGGTCTC
<i>Dnmt3b</i>	TGCCAGACCTTGGAAACCTC	GCTGGCACCTCTTCTTCAT
<i>Fto</i>	GACACTTGGCTTCCTTACCTG	CTCACCACGTCCCGAAACAA
<i>Mett13</i>	TTAGCATCTGGTCTGGCCTCTT	TGACCTTCTTGCTCTGCTGTTC
<i>Mcp1</i>	CCCACCTACCTGCTGCTACT	TCTGGACCCATTCCTTCTTG
<i>Ngf</i>	GGAGCGCATCGAGTACTT	CCTCACTGCGGCCACTATAG
<i>Nt3</i>	CAGGGTGAAGGGGAAAACCT	AGTTCGGTCATTCAGTCTCGC
<i>Il-1β</i>	ACAGAATATCAACCAACAAGTGATATTCTC	GATTCTTTCCTTTGAGGCCCA
<i>Il-6</i>	ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
<i>Tgf-β1</i>	CAGTGGCTGAACCAAAGGAGACGG	CCCCGACGTTTGGGGCTGATC
<i>Tnf-α</i>	TCGGGGTGATCGGTCCCAA	TGGTTTGCTACGACGTGGGCT
<i>TrkA</i>	CTCCTTCTCGCCAGTGGAC	TGCCCTCAGTAGGGGAAAGA
<i>TrkB</i>	CGTCACTTCGCCAGCCAGCAGTAG	CTATACGCCAGGCACCACTC
<i>β-actin</i>	CAACGAGCGGTTCCGAT	GCCACAGGTTCCATACCCA



4. Discusión

4.1. El efecto de la dieta materna en la descendencia: herencia epigenética

Durante las últimas décadas ha aumentado la esperanza de vida de la población, por lo que ha aumentado al mismo tiempo las personas mayores de 65 años. Al mismo tiempo, ha incrementado la prevalencia de las enfermedades asociadas al envejecimiento como la EA (Binotti et al., 2009). Concretamente, el envejecimiento es un proceso caracterizado por el deterioro progresivo e irreversible, tanto a nivel fisiológico como cognitivo, a lo largo del tiempo por una pérdida de homeostasis celular, así como de alteraciones en la expresión génica (Lemoine, 2020). Por lo que, es factor de riesgo de patologías cardiovasculares, metabólicas y cognitivas (Booth & Brunet, 2016). Por este motivo, la investigación de los mecanismos que subyacen al proceso de envejecimiento relacionados con el deterioro cognitivo es crucial para la prevención de este tipo de patologías (Bettio et al., 2017).

Como se ha expuesto anteriormente, el proceso de envejecimiento y deterioro cognitivo es de etiología multifactorial, en el que, juegan un papel importante los mecanismos epigenéticos (Vinicius et al., 2019; Skvortsova et al., 2018). Éstos interactúan con factores ambientales como, la dieta materna, la cual es relevante en los procesos neuropatológicos, tales como, el EO, neuroinflamación, entre otros (Skvortsova et al., 2018). Con el tiempo, producen daño celular y tisular, iniciando procesos de neurodegeneración en la edad adulta (Skvortsova et al., 2018). Además, pueden transmitirse a través de las generaciones mediante los mecanismos de herencia epigenética. (Skvortsova et al., 2018). Tal y como se explicó en la introducción un ambiente subóptimo intrauterino puede predisponer a enfermedades en la vida adulta (Carpinello et al., 2018). Una de las características

más interesantes de la programación del desarrollo es la evidencia de que las consecuencias adversas del ambiente intrauterino alterado se mantienen a través de las generaciones (Fernandez-Twinn et al., 2019; Carpinello et al., 2018). Por ejemplo, la exposición de los progenitores a tóxicos, una HFD, o exposición al estrés repercutirá en los mecanismos epigenéticos que se mantendrá en las siguientes generaciones a través de la línea germinal directamente expuestos (HEI) o indirectamente expuesto al factor causante de dichos cambios (HET) (Gomez-Verjan et al., 2020; Nilsson et al., 2018; Blake & Watson, 2016).

Además, en la heredabilidad de las enfermedades asociadas al envejecimiento se deben tener en cuenta los factores protectores que pueden llegar a revertir el proceso de neurodegeneración. Por el ejemplo, el consumo de una dieta rica en RSV, un polifenol natural, se asocia con la prevención del deterioro cognitivo a través de mecanismos epigenéticos, que pueden ser heredados (Griñán-Ferré et al., 2021; Pannu & Bhatnagar, 2019).

Resultados previos de nuestro grupo de investigación sobre el efecto beneficioso, por un lado, del enriquecimiento ambiental sobre la cognición (Griñán-Ferré et al., 2016; Griñan-Ferré, Palomera-Ávalos, et al., 2016; Griñan-Ferré, Pérez-Cáceres, et al., 2016; Griñan-Ferré, Puigoriol-Illamola, et al., 2016) y, por otro lado, del RSV sobre el deterioro cognitivo y HFD (V. Palomera-Avalos et al., 2017; V. Palomera-Ávalos et al., 2018; Verónica Palomera-Ávalos et al., 2017), ambos factores asociados con el estilo de vida, promovieron cambios epigenéticos en el modelo SAMP8. A partir de estos resultados se formularon los objetivos que dirigieron esta investigación.

Por consiguiente, en esta tesis doctoral nos centramos en investigar: 1) los mecanismos de la herencia epigenética implicados en el deterioro cognitivo

asociado al envejecimiento, 2) el efecto neuroprotector de una dieta materna rica en RSV y 3) la su capacidad de revertir el efecto de una HFD. Todo esto a lo largo de las generaciones. Para ello se realizaron dos estudios con el modelo de envejecimiento acelerado SAMP8 a los 6 meses de edad.

La dieta materna rica en RSV revierte el deterioro cognitivo en la descendencia del modelo murino SAMP8

En este sentido, se investigó el efecto neuroprotector de la dieta materna rica en RSV expuestas durante dos meses, desde el destete (21 días de edad) hasta el momento antes de la fecundación, en las generaciones F1 y F2 en el ratón SAMP8. El motivo de este diseño experimental fue obtener el efecto transgeneracional una generación antes, es decir, en la F2 en vez de la F3, exponiéndola indirectamente a las dietas. Esto fue posible al alimentar a las madres con ambas dietas (RSV y HFD) antes de la gestación (F0) para no exponer directamente la F2 (gametos de la F1) durante el desarrollo embrionario de la F1 (esta explicación se encuentra de forma más detallada en la introducción figura 9). Mientras que si la exposición al factor ambiental continua durante el periodo de gestación, el efecto transgeneracional no ocurre hasta la F3, que es lo que sucede de manera estándar en los mamíferos (King & Skinner, 2020). Este diseño experimental permitió obtener el efecto transgeneracional y las muestras en menos tiempo. Además, permitió reducir la variabilidad de las condiciones ambientales en el estabulario y de los marcadores a evaluar, tanto cognitivos como moleculares, ya que, se requirió de unos 22-24 meses para la obtención de las muestras. Asimismo, evitamos el uso de más animales siguiendo el principio de reducción de las 3R para una investigación más eficiente.

En primer lugar, evaluamos el peso de hembras y machos SAMP8 semanalmente durante 18 semanas (a partir del destete a los 21 días de edad).

Todos los ratones aumentaron progresivamente el peso, demostrando un correcto desarrollo. Aunque hubo diferencias significativas de peso entre machos y hembras, el promedio de incremento de peso fue similar entre los grupos (entre 11.109g a los 12.305g), demostrando que el efecto del RSV fue homogéneo. Además, no se observaron diferencias significativas de peso en la descendencia respecto al grupo CT de su mismo sexo. Por un lado, nuestros resultados van en consonancia con otros estudios en los que tampoco hubo efecto del RSV sobre el peso de los individuos (Kang et al., 2012; Zare Javid et al., 2017). Un aspecto a tener en cuenta es que el ratón SAMP8 no es un modelo de obesidad, por lo que esperamos que el consumo de una dieta rica en RSV no modifique el peso. Para investigar esta condición, expusimos a las madres SAMP8 a un ambiente obesogénico a través de una HFD al 60% durante 8 semanas para evaluar el efecto del RSV bajo un inductor de estrés metabólico y acelerador del envejecimiento. La HFD estaba compuesta por aceite de coco hidrogenado, con un alto contenido de ácidos grasos saturados (90%), lo que hace que a temperatura ambiente sea sólida y sea más perjudicial para la salud, ya que, favorece la aparición de alteraciones cardiovasculares (trombos), acumulación de β A y alteraciones metabólicas (resistencia a la insulina, hiperglucemia), además de aumentar el peso de una manera más rápida. En este estudio no hubo diferencias significativas de peso entre los grupos HFD+RSV respecto al grupo HFD, es decir, ni por el consumo directo (grupo HFD+RSV) ni indirecto a través de la descendencia (F1 y F2). Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron resultados similares donde el ratón SAMP8 alimentado con una HFD y RSV durante 8 semanas no bajó de peso en comparación con los ratones alimentados con HFD (Palomera-Avalos et al., 2017). En cambio, otros estudios realizados con el modelo de rata Sprague Dawley, el RSV produjo una disminución del peso tras el consumo de una dieta hipercalórica (Aubin et al., 2008; Lagouge et al., 2006). Dichas discrepancias se encuentran por

diferencias en el diseño experimental como, por ejemplo, el modelo animal utilizado, la edad de los animales, el porcentaje de grasa, el tipo de grasa usada, la edad de los animales o el tiempo de exposición a la misma.

Factores asociados al SM como la hipertriglicémia o la hiperleptemia están estrechamente relacionados con enfermedades como la obesidad, diabetes o enfermedades cardiovasculares que aumentan considerablemente el riesgo de manifestar deterioro cognitivo y EA (Salvestrini et al., 2019). La HFD se asocia con la alteración de estas variables, promoviendo un estado de salud que promueve el envejecimiento prematuro (Tan & Norhaizan, 2019). Nuestros resultados confirmaron una disminución estadísticamente significativa en los grupos de HFD+RSV en los niveles de triglicéridos (TG) en sangre y niveles de leptina en plasma. Así demostramos el efecto del RSV sobre marcadores implicados en el metabolismo energético y su capacidad para modularlos tras una HFD (grupo HFD+RSV). Destacar que dichos efectos se mantuvieron en las siguientes generaciones (F1 y F2), demostrando la participación de los mecanismos de HET promovidos por el RSV en el modelo murino SAMP8. Los resultados obtenidos vienen a reforzar otros estudios que mostraron una reducción de la grasa corporal tras el consumo de una dieta obesogénica y RSV durante 6 semanas a través de la activación de marcadores asociados a la lipólisis e inhibición de la lipogénesis (Gracia et al., 2016). Incluso, han demostrado que el RSV incrementa la oxidación de ácidos grasos, reduce la acumulación de TG y aumenta la eficiencia energética en los adipocitos a través de la activación de SIRT1, Pgc-1 α y PPAR γ (Asgary et al., 2019; Imamura et al., 2017; Zortea et al., 2016; Lasa et al., 2012). Además, se ha publicado el efecto antiobesidad en animales por su acción en la microbiota intestinal (P. Wang et al., 2020), cultivos celulares de preadipocitos (Carpéné et al., 2019) y tejido adiposo en humanos (Aguirre et al., 2014; Konings et al., 2014; Korsholm et al., 2017).

En cuanto a los niveles de leptina, se ha registrado en personas con obesidad niveles elevados en sangre de forma crónica, llevando a un estado de resistencia a la leptina y dislipidemia (Gruzdeva et al., 2019; Jimoh et al., 2018). También se ha evidenciado que esta hormona anorexigénica tiene un efecto proinflamatorio ligado a su similitud estructural con citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-12 e IL-15, lo que explicaría el estado de inflamación crónica asociada a la obesidad y el riesgo de presentar enfermedades asociadas con el deterioro cognitivo (Gruzdeva et al., 2019). En cuanto a la relación de la dieta rica en RSV y los niveles de leptina, Jimoh y colaboradores demostraron que la dieta rica en RSV reducía los niveles de leptina e insulina en sangre, al mismo tiempo que produjo un aumento de la adiponectina, induciendo procesos de termogénesis en conejos alimentados con una dieta alta en colesterol (Jimoh et al., 2018). Por tanto, una dieta materna rica en RSV tuvo un efecto antiobesidad del RSV en la descendencia del modelo murino SAMP8, protegiendo del desbalance energético y el deterioro cognitivo producido por una HFD de manera transgeneracional.

Al mismo tiempo, se ha demostrado en diferentes investigaciones que la dieta rica en RSV previene el deterioro de la memoria y aprendizaje en modelos animales de la EA (Ma et al., 2020; Lin et al., 2018; Palomera-Ávalos et al., 2018; Liu et al., 2017; Veronica Palomera-Avalos et al., 2017) y en humanos (Zaw et al., 2020; Cicero et al., 2019). Por ejemplo, Wang y colaboradores demostraron que el pretratamiento con RSV previno el deterioro de la memoria espacial y aprendizaje en un modelo de rata de βA_{1-42} evaluada a través del MWM (Wang et al., 2017). En otro estudio administraron durante 60 días una alta concentración de RSV, que evitó la acumulación de βA en el cerebro, junto con una mejora en la ejecución de pruebas de comportamiento asociadas al aprendizaje y la memoria (MWM y el laberinto en Y) con un modelo transgénico de EA (Chen et al., 2019). Nuestros

resultados de comportamiento animal van en el mismo sentido que dichas evidencias. Concretamente, la dieta materna rica en RSV preservó la memoria a corto y largo plazo en la descendencia F1 y F2, evaluada a través de la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NORT), ya que, ambas generaciones mostraron un índice de discriminación (ID) significativamente superior en comparación con el grupo control (CT). Además, la descendencia mostró una mejor memoria espacial que el grupo CT, ya que, redujo significativamente el tiempo de llegada a la zona de la plataforma en la prueba MWM. Por lo que se demostró la importancia de la dieta materna en el funcionamiento cognitivo de la descendencia. Estas pruebas se realizaron cuando los animales tenían 6 meses de edad, ya que, está descrito que el modelo con senescencia acelerada SAMP8 presenta alteraciones graves de la memoria y aprendizaje en dicha edad (Griñán-Ferré et al., 2018a; Morley et al., 2012). Hay que destacar que no se observaron diferencias de sexo en la ejecución de las pruebas de comportamiento. Por este motivo, avanzamos la investigación de los mecanismos moleculares asociados al deterioro cognitivo de manera conjunta, con el objetivo de explicar los mecanismos subyacentes a este tipo de alteraciones independientemente del sexo. Este hecho también nos facilitó la obtención del tamaño muestral idóneo para la obtención de resultados estadísticamente significativos, ya que, no discriminamos por sexo y usamos todos los ratones obtenidos en cada cruce, favoreciendo el uso eficiente de los animales.

Teniendo en cuenta estos resultados obtenidos en el primer estudio, el siguiente paso fue ir aún más allá y estudiar la posible participación de la HFD en el proceso neurodegenerativo de la descendencia y el posible efecto neuroprotector del RSV a lo largo de las generaciones en el modelo murino SAMP8. En este sentido, el RSV protegió significativamente la memoria a corto y largo plazo de forma directa (grupo HFD+RSV), en la F1 y una tendencia en la F2 respecto al grupo HFD.

Por tanto, se demostró el efecto de la dieta materna rica en RSV ante el deterioro cognitivo inducido por una HFD en la descendencia. También se evaluó el estado de la memoria espacial, que junto con la memoria a corto y largo plazo son dependientes de hipocampo (Jeffery, 2018; Sawangjit et al., 2018). El estudio del hipocampo es relevante debido a que es de las primeras áreas cerebrales en mostrar un declive en su funcionamiento durante el envejecimiento y que presenta marcadores neuropatológicos asociados a la EA (Ginsberg et al., 2019; Knight et al., 2019; Horgusluoglu-Moloch et al., 2017). Incluso, se ha reportado como el consumo de una HFD empeora el estado de la memoria de los animales iniciando un deterioro prematuro del hipocampo (Alzoubi et al., 2018; Sah et al., 2017). En esta investigación se encontró que todos los grupos de ratones SAMP8 redujeron el tiempo de llegada a la plataforma durante los días de entrenamiento (6 días), demostrando que todos aprendieron a localizar la plataforma independientemente de la dieta. No obstante, el último día de la prueba MWM, en el que se evalúa el estado de la memoria espacial, se observó una disminución, tanto del tiempo de llegada a la zona de la plataforma como de la distancia recorrida hacia esta, en la descendencia F1 respecto a los grupos que se alimentaron directamente con las dietas HFD y HFD+RSV. Por tanto, se demostró el efecto neuroprotector del RSV hasta la F1, por lo que, no hubo un efecto transgeneracional. Como se mencionó en la introducción, estos resultados se explican por los mecanismos de reprogramación del epigenoma durante la formación del embrión. Este proceso es importante para garantizar, por una parte, que aquellas marcas epigenéticas activadas por factores nocivos de los antecesores no pasen a las siguientes generaciones, previniéndolas de posibles enfermedades. Debido a que el modelo de ratón SAMP8 es un modelo seleccionado fenotípicamente, estos mecanismos tienen mayor impacto sobre el epigenoma de la descendencia haciendo que, de forma natural, el ratón SAMP8 vuelva a la línea base de neurodegeneración. Tras estas

evidencias, se confirma que bajo el efecto de una HFD materna, se mantuvo el estado cognitivo en ambas pruebas de comportamiento de manera significativa hasta la F1 y cierta tendencia en la F2, destacando el efecto intergeneracional del RSV bajo una HFD. Este efecto de HEI reafirma los resultados obtenidos en los marcadores periféricos (TG y leptina). En otras palabras, la dieta materna rica en RSV, además de ser capaz de mejorar el funcionamiento cognitivo en dos generaciones posteriores, revirtió el efecto de una HFD, regulando marcadores asociados a la obesidad y deterioro cognitivo en dos generaciones del modelo murino SAMP8. Más aún, estudios demuestran la relación entre el SM, la HFD y la memoria (Borshchev et al., 2019; Cheng et al., 2017). Se ha observado en animales alimentados con HFD resistencia a la leptina junto a alteraciones cognitivas dependientes de hipocampo (Van Doorn et al., 2017; Boitard et al., 2014). Es más, animales con mutaciones en el gen de leptina (ratones *ob/ob*) mostraron alteraciones en la memoria espacial en la prueba MWM (Stranahan et al., 2008; Van Doorn et al., 2017).

Demostrado el efecto de la dieta materna rica en RSV sobre el estado cognitivo y metabolismo energético en la descendencia SAMP8, evaluamos los mecanismos epigenéticos de la dieta materna con RSV que fueron transmitidos a la descendencia. Como se ha expuesto en la introducción, existen numerosas evidencias sobre el efecto pleiotrópico de esta molécula a través de la modulación de mecanismos epigenéticos (Griñan-Ferré et al., 2021). Al igual que lo hacen otros factores ambientales como el ejercicio (Denham, 2018) o el enriquecimiento ambiental (Griñan-Ferré, Pérez-Cáceres, et al., 2016; Griñan-Ferré, Puigoriol-Illamola, et al., 2016). Además, diversos experimentos con animales evidencian cómo la dieta es capaz de producir cambios en la maquinaria epigenética y transmitirlo a las siguientes generaciones (Bautista et al., 2020; Klastrup et al., 2019; Zhou et al., 2018). También, se conoce que durante el proceso de

envejecimiento se producen múltiples alteraciones en los patrones de 5-mC e 5-hmC (Michalak et al., 2019). Por ejemplo, el estado de hipometilación global del ADN se considera un marcador de envejecimiento junto con la inestabilidad de la cromatina (Michalak et al., 2019). Sin embargo, los mecanismos epigenéticos globales del ADN son complejos de estudiar, ya que, durante el envejecimiento se da una hipometilación de determinados genes y al mismo tiempo, una hipermetilación de otros (Michalak et al., 2019). Por un lado, se ha demostrado que el RSV modifica estas dos marcas epigenéticas revirtiendo el proceso de envejecimiento (Xiao et al., 2019; Field et al., 2018; Xiong et al., 2015). Por otro lado, el consumo de una HFD induce estrés metabólico desencadenando una serie de eventos moleculares que provocan envejecimiento prematuro. Además, es capaz de producir alteraciones en la maquinaria epigenética y transmitir las alteraciones generación tras generación (Johnson et al., 2017; Winther et al., 2018). En nuestro estudio demostramos que la dieta materna rica en RSV aumentó la 5-mC global del ADN y redujo los niveles de 5-hmC en la descendencia SAMP8. Incluso, bajo una HFD mantuvo los niveles aumentados de 5-mC en la F1 y una tendencia en F2 en comparación con el grupo HFD. Por tanto, el RSV, es capaz de revertir los principales eventos moleculares implicados en el envejecimiento acelerado del ratón SAMP8, también fue capaz de revertir las alteraciones epigenéticas que produce la HFD, retardando los procesos de envejecimiento prematuro en ambas generaciones, principalmente en la F1.

Además de la disminución de la 5-mC global del ADN, un estudio demostró la correlación existente entre su disminución en el hipocampo de ratones viejos, junto a la disminución de la expresión de la *Dnmt3a* y el deterioro de la memoria dependiente de hipocampo, ya que, es de las estructuras más afectadas en el envejecimiento (Remely et al., 2015). Es más, la sobreexpresión de la *Dnmt3a* en el

hipocampo de los ratones viejos recupera el estado de memoria de reconocimiento a largo plazo, al mismo tiempo que aumentan los niveles de 5-mC (Remely et al., 2015). Asimismo, la disminución de la expresión de las *DNMTs* está asociada al envejecimiento y deterioro cognitivo (Uysal & Ozturk, 2020). Reforzando estos resultados, obtuvimos que la dieta materna rica en RSV reguló las enzimas epigenéticas mejorando la cognición en la descendencia SAMP8. De forma específica, obtuvimos un aumento significativo de los niveles de expresión génica de las enzimas *Dnmt3a* y *Dnmt3b*, una tendencia en *Tet1* a disminuir (al igual que los niveles de 5-hmC) y una tendencia opuesta en *Tet2* en la descendencia de madres con RSV respecto al grupo CT, demostrando el efecto transgeneracional del RSV. Al mismo tiempo, la descendencia de las madres alimentadas con HFD aumentó los niveles de expresión génica de *Dnmt1* y *Dnmt3a* en la F1, demostrando el efecto intergeneracional del RSV bajo el efecto de HFD en el modelo murino SAMP8. Finalmente, la mejora en la memoria de la descendencia SAMP8 (ID) correlacionó positivamente con los niveles de 5-mC en la descendencia SAMP8.

Por consiguiente, nuestros resultados confirmaron que modificando un factor ambiental para favorecer los mecanismos neurodegenerativos (HFD) en un modelo animal que ya presenta este tipo de deterioro (SAMP8), el RSV revirtió estos procesos a través de la maquinaria epigenética a lo largo de las generaciones. Esto es relevante, ya que, podemos ver el alcance de este tipo de intervención a lo largo de las generaciones en dos condiciones diferentes. De hecho, es importante destacar la idoneidad del modelo SAMP8 en el estudio de los mecanismos epigenéticos asociados con el proceso de envejecimiento. El ratón SAMP8 es seleccionado fenotípicamente, por lo que, muestra estas características debido a cruces endogámicos de varias generaciones, hasta mostrar el fenotipo de envejecimiento acelerado. Por tanto, los factores epigenéticos adquieren una

especial relevancia en este modelo murino (a diferencia de un modelo transgénico) y en el estudio del envejecimiento patológico.

Con el objetivo de demostrar como el RSV modula la expresión de genes implicados en el proceso de envejecimiento, investigamos los niveles de 5-mC de las islas CpG situadas los promotores de genes implicados en procesos de neurodegeneración. Por un lado, evaluamos los niveles de 5-mC del promotor del gen *Nrf2*, el cual es un factor de transcripción que regula la expresión de numerosos genes relacionados con la respuesta antioxidante, como por ejemplo *Hmox1*, *Aox1* o *Keap1* (Xiao et al., 2019). Xiao y colaboradores demostraron que el aumento de la expresión de *Nrf2* se asocia con la disminución de la expresión de *Bace1* y β A, junto con la reducción del deterioro cognitivo en modelos animales de la EA, por lo que juega un papel importante en la neurodegeneración (Xiao et al., 2019). Nuestros resultados confirmaron que la dieta materna rica en RSV produjo una tendencia a reducir la 5-mC de *Nrf2* en la F2 respecto al grupo CT (aumento de la expresión génica). Además, reguló los niveles de ERO, concretamente, de H_2O_2 en el hipocampo, demostrando su efecto transgeneracional, junto con un aumento de la expresión génica de la enzima antioxidante *Hmox1* en la F1 y una tendencia en la F2 respecto al grupo CT. Por tanto, el efecto antioxidante del RSV se mantuvo a través de los mecanismos de reprogramación intrauterina, protegiendo del deterioro cognitivo dos generaciones más del modelo murino SAMP8. La manifestación temprana de deterioro cognitivo y alteraciones moleculares asociadas al envejecimiento en el ratón SAMP8 es un aspecto importante para la obtención de resultados de manera eficiente en esta tesis doctoral, ya que, presenta estos marcadores de forma temprana (3-4 meses de edad) lo que hace que estemos seguros de encontrar un estado de neurodegeneración avanzado a los 6 meses.

Asociado al aumento del EO se produce un proceso inflamatorio en cerebro envejecido. Por ejemplo, el factor de transcripción NF-kB es de los principales marcadores inflamatorios, regulando la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias, tales como *Il-6*, *Il-1β* y *Cxcl-10* (Tan & Norhaizan, 2019; Li et al., 2018). Su sobreexpresión está asociada al envejecimiento, deterioro cognitivo asociado al hipocampo y la HFD induce su sobreexpresión (Seyedaghamiri et al., 2021; Tan & Norhaizan, 2019; Song et al., 2017). Se ha demostrado que el RSV regula su expresión y juegan un papel neuroprotector ante el proceso de neurodegeneración (Silva et al., 2019; Sarubbo et al., 2017; Li et al., 2018). Además, se ha demostrado que el RSV reduce el EO e inflamación mediante la disminución de los niveles de expresión de *Tnf-α* y *Nf-kB* inducido por una HFD. Consecuentemente, reduce la expresión de genes dianas implicados en la respuesta inflamatoria en cerebro humano (Salvestrini et al., 2019). Incluso, estudios anteriores de nuestro laboratorio demostraron que una dieta rica en RSV regula marcadores con un efecto antiinflamatorio tras el consumo de una HFD (Palomera-Avalos et al., 2017; Palomera-Ávalos et al., 2018). Todos estos resultados se confirman en esta investigación, ya que, la dieta materna rica en RSV aumentó los niveles de 5-mC del promotor del gen *Nf-kB* significativamente en la descendencia en comparación con el grupo CT, demostrando los mecanismos de la HET del RSV. Es más, el RSV redujo los niveles de expresión génica de *Il-1β*, *Il-6*, *Cxcl-10*, *Tnf-α*, *Mcp-1* y *Tgf-β1* en el grupo HFD+RSV respecto al grupo HFD y una tendencia a disminuir los marcadores *IL1-β*, *Cxcl-10* y *Mcp-1* en la F1 respecto al grupo HFD, perdiendo su efecto en la generación F2. Dichos resultados se pueden explicar, en parte, por el efecto de la HFD, dado que, empeoró aún más el estado inflamatorio y de EO que el modelo SAMP8 presenta a temprana edad, lo que impidió que el RSV revirtiera este efecto en su totalidad a través de las generaciones. Por otra parte, por los mecanismos de reprogramación epigenética, que hace que algunas de las marcas epigenéticas se eliminen y no se transmitan a las siguientes generaciones.

En este caso, vemos una potenciación de la transmisión de las modificaciones epigenéticas asociadas a la HFD que no han podido ser revertidos en su totalidad por el RSV en la F2. Estos resultados deben entenderse paralelamente al tipo de intervención que se está dando. Debido a que realizamos una intervención de tipo nutricional, que, a diferencia de la farmacológica, es una intervención que promueve cambios de forma más sutil, ya que, a los ratones se les administra una dieta con una concentración de RSV 1g/Kg de acceso libre en la comida. Por lo que la dieta genera un efecto molecular sutil en los individuos alimentados directamente, que es aún más sutil, el efecto transmitido en las siguientes generaciones. Destacar que, nuestros resultados confirman que una dieta rica en RSV tiene un efecto transgeneracional, que, bajo el efecto de una HFD, revierte algunos marcadores asociados a la neurodegeneración hasta la F2. Debido a esto, la mayoría de los estudios de herencia epigenética se centran en investigar el efecto hasta la F1 (Baeta-Corral et al., 2018; Loche et al., 2018).

Otro mecanismo epigenético crucial para el funcionamiento del SNC es la m⁶A siendo especialmente abundante en el cerebro de los mamíferos (Livneh et al., 2020; Widagdo & Anggono, 2018). En esta tesis cuantificamos los niveles de m⁶A en el hipocampo de la descendencia SAMP8 y se obtuvo una tendencia a aumentar sus niveles en la generación F1 en comparación con el grupo HFD, aunque, se perdió su efecto transgeneracional en la F2. En cuanto a las enzimas que la regulan se obtuvo una disminución significativa en los niveles de expresión génica de la *Mettl3* en el grupo expuesto a las dietas (HFD+RSV) y la F1 respecto al grupo HFD. De nuevo, se pierde el efecto en la F2, lo cual se explica por los mecanismos de reprogramación mencionados anteriormente (Skvortsova et al., 2018). Wu y colaboradores evidenciaron que los niveles de m⁶A en el cerebro disminuyen con el envejecimiento (Wu et al., 2020). Además, el m⁶A está asociado a procesos de

plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria (Han et al., 2020). Nuestros resultados refuerzan todas estas evidencias, pues, la mejora cognitiva (ID en el NORT) mostró una tendencia a correlacionar positivamente con el aumento de los niveles de m⁶A en la descendencia de ratones SAMP8 a los 6 meses de edad.

Está demostrada la importancia de los mecanismos epigenéticos sobre los procesos cognitivos, el desarrollo del SNC y de las patologías asociadas. No obstante, su estudio es más complejo que el de los factores genéticos dada su naturaleza dinámica y reversible. Como hemos visto en los resultados de esta tesis, un marcador epigenético no implica que los otros vayan en el mismo sentido, incluso, en el caso de la herencia epigenética, que los cambios sean contrarios dependiendo de la generación, dándose un efecto en la F1 y otro en la F2. Esto hace que su estudio y su uso como diana terapéutica sea más complejo. Esta cualidad radica en la variabilidad de estos según el periodo del desarrollo, el tejido, el tipo celular, entre individuos de una misma especie, incluso en un mismo individuo a lo largo de la vida. Esto hace que la aplicación terapéutica sobre los mecanismos epigenéticos implicados en patologías sea única en cada individuo. Esto nos lleva a la terapia individualizada de enfermedades complejas como las enfermedades neurodegenerativas.

Demostrados los principales efectos del RSV a través de la dieta materna en las siguientes generaciones de SAMP8 continuamos investigando su efecto en otros mecanismos asociados con el EO e inflamación implicados en el proceso de envejecimiento. Por ejemplo, se conoce que el aumento del EO, juntamente con la inflamación generan alteraciones del funcionamiento mitocondria y autofagia provocando muerte neuronal (Liguori et al., 2018; Guillaumet-Adkins et al., 2017). Por este motivo investigamos la vía de AMPK/mTOR que juegan un papel importante en la detección de nutrientes y en la regulación del balance energético

de las células (Russo et al., 2020). Esta vía se encuentra alterada en el envejecimiento y está implicada en el proceso de neurodegeneración (Russo et al., 2020). en una investigación, Wang y colaboradores encontraron que ratas tratadas con RSV mantenían inhibida la vía de señalización de Akt/mTOR en corteza e hipocampo, aumentando los mecanismos de autofagia y una mejora cognitiva en los animales (Wang et al., 2019). Corroborando estos resultados, en nuestro estudio demostramos que el RSV tuvo un efecto neuroprotector, ya que, reguló marcadores asociados al funcionamiento mitocondrial y balance energético como p-AMPK, aumentando los niveles proteicos significativamente en el hipocampo de la F2 y mostrando una tendencia en la F1 respecto al grupo CT. Asociado a este marcador estudiamos la expresión génica de *Pgc-1 α* , el cual es un marcador de biogénesis mitocondrial junto con SIRT1 (Zhao et al., 2020). Encontramos que paralelamente al aumento de p-AMPK, la expresión génica de *Pgc-1 α* estaba aumentada en ambas generaciones de SAMP8 en comparación con el grupo CT. En el mismo sentido, Zhao y colaboradores demostraron que el RSV aumentó los niveles de p-AMPK e inhibió p-mTOR, lo cual facilitó procesos de autofagia en cultivos celulares de células cancerosas (Zhao et al., 2020). Al mismo tiempo, en nuestro estudio, los descendientes de las madres alimentadas con RSV mostraron una disminución estadísticamente significativa de los niveles proteicos de p-mTOR y un aumento significativo del marcador de autofagia Beclina 1 en comparación al grupo CT, favoreciendo los mecanismos de autofagia en la descendencia SAMP8. Finalmente, nuestros resultados concuerdan con otros estudios publicados sobre el efecto de una dieta rica en RSV en procesos moleculares como, el balance energético, biogénesis mitocondrial y autofagia, favoreciendo un envejecimiento saludable y retardando la neurodegeneración presente en el modelo murino SAMP8, en las generaciones F1 y F2. Por consiguiente, se demuestra el efecto antienvjecimiento

y el papel que juega la dieta materna rica en RSV en la herencia transgeneracional y el proceso de envejecimiento saludable.

Relacionado con todos estos mecanismos está la respuesta al ERE. La dieta rica en RSV está asociada con la regulación de las vías del RE. Por ejemplo, Wang y colaboradores demostraron que el pretratamiento con RSV atenuó el ERE a través de la disminución de los marcadores implicados en la UPR en el hipocampo de ratones envejecidos (Wang et al., 2019). El ERE se da en respuesta al EO e inflamación, junto con la acumulación β A en cerebro envejecido (Cheon et al., 2019). También, el ERE está asociado a la disfunción mitocondrial, alteraciones en la proteostasis, metabolismo energético y alteraciones epigenéticas que se van acumulando con el tiempo y causando daño celular durante el proceso de envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (Muñoz-Carvajal & Sanhueza, 2020; Wang et al., 2017). También se ha documentado que la resistencia a la leptina, en animales obesos, está asociada al incremento del ERE, ambos implicados en el envejecimiento patológico (Ozcan et al., 2009), por lo que el equilibrio del funcionamiento del RE junto con la disminución de los niveles de proteínas mal plegadas en el SNC esta asociado a una regulación de la sensibilidad a la leptina (Izquierdo, A et al., 2019). Nosotros verificamos que una disminución de marcadores asociados a la respuesta de ERE, más concretamente de Bip, p-PERK y p-eIF2a en hipocampo de la descendencia de madres que consumieron RSV en comparación con el grupo CT. Por lo que la dieta materna con RSV previno el deterioro cognitivo a través de la regulación de las vías implicadas en el ERE, junto con EO, inflamación y marcadores asociados al metabolismo energético en la en la descendencia a través de la HET.

Hemos demostrado con en esta tesis que todos estos cambios moleculares producidos por la dieta materna con RSV en la descendencia se traducen en un

mejor estado cognitivo, pero también es relevante el estudio de marcadores asociados con la plasticidad sináptica con el objetivo de dilucidar si los cambios observados se traducen en una mejora estructural y funcional en las neuronas del hipocampo en las generaciones del modelo murino SAMP8. En este sentido, existe evidencia científica de que el RSV aumenta la neurogénesis y plasticidad sináptica, incrementando las interconexiones neuronales, gracias a su potente efecto antioxidante y antiinflamatorio (inhibiendo NF- κ B y citoquinas proinflamatorias). Además, regula la vía amiloidogénica, lo cual permite la reducción de procesos apoptóticos y aumenta la supervivencia neuronal a través de la activación de SIRT1, AMPK y Akt en las neuronas (Cicero et al., 2019). La alteración de la plasticidad sináptica es uno de los marcadores más asociados al envejecimiento (Tan & Norhaizan, 2019; Apple et al., 2017). Asimismo, el consumo de una HFD contribuye al daño neuronal y alteración de la plasticidad sináptica, acelerando aún más el proceso de deterioro cognitivo (Tan & Norhaizan, 2019). Las neurotrofinas tienen la función de mantener la actividad sináptica y de formar nuevas conexiones neuronales en la edad adulta (Gulyaeva, 2017). Li y colaboradores demostraron que el consumo de RSV en niños que sufrieron hipoxia neonatal incrementó la neurogénesis hipocámpal a través del aumento de BDNF (Li et al., 2019). En este estudio se demostró el efecto transgeneracional de la dieta materna con RSV, ya que, se observó un aumento significativo de la proteína BDNF en ambas generaciones respecto al grupo HFD. También, obtuvimos un aumento significativo de los niveles proteicos de p-Akt en el grupo HFD+RSV y una tendencia a aumentar en la F1 en comparación con el grupo HFD. No obstante, aumentaron de forma significativa los niveles proteicos de las neurotrofinas NGF y NT3 en el grupo alimentado con HFD+RSV respecto al grupo HFD evidenciando que el consumo de una dieta rica en RSV aumenta estos marcadores asociados a neurogénesis en hipocampo adulto de ratones SAMP8, aunque no hubo efecto en la descendencia.

Además, este aumento de las neurotrofinas se asocia con la mejora de la memoria (Borczyk et al., 2019; Thomazeau et al., 2020). También, estudiamos los receptores implicados en la señalización de dichas neurotrofinas y obtuvimos una disminución significativa de los niveles de expresión génica del receptor *TrkA* en todos los grupos HFD+RSV en comparación con el grupo HFD y un aumento significativo del receptor *TrkB* en la F1 respecto al grupo HFD. No obstante, los niveles de expresión del mismo receptor disminuyeron significativamente en la F2 en comparación al grupo HFD y la generación anterior F1, demostrando que el RSV promueve de forma muy sutil la expresión génica de estos receptores implicados en procesos de neurogénesis y plasticidad sináptica a través de las generaciones.

Discusión integrada de los resultados obtenidos: deterioro cognitivo y herencia epigenética

La heredabilidad de los mecanismos epigenéticos se ha determinado como factor causal del proceso de neurodegeneración, regulando procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje en la descendencia. Por este motivo, es de gran interés determinar los mecanismos epigenéticos implicados en la heredabilidad de las enfermedades que cursan con deterioro cognitivo. No obstante, destaca la complejidad de las enfermedades del SNC, ya que, factores, tanto genéticos, como ambientales (no genéticos) juegan un papel importante en las enfermedades multifactoriales. Los mecanismos epigenéticos son el punto de unión entre ambos, determinando la expresión génica y múltiples procesos biológicos en los seres vivos, entre ellos el envejecimiento. Factores ambientales como la dieta están directamente implicados en la modulación de los mecanismos epigenéticos y su transmisión a las siguientes generaciones. Estos mecanismos son de elevada complejidad por su naturaleza dinámica y reversible, por lo que hace que su aplicabilidad terapéutica sea dificultosa, ya que, depende de múltiples variables

(tejido, edad, ciclo vital, tiempo de exposición al factor ambiental, etc). Por lo que cada patología y cada individuo presenta un patrón epigenético distinto y único.

Por estas razones, los resultados aportados en esta tesis doctoral muestran un punto de vista holístico, en el que se describe la herencia del proceso de envejecimiento patológico y el declive cognitivo, teniendo en cuenta el contexto de los individuos. Por tanto, la heredabilidad de las enfermedades del SNC deben entenderse como un conjunto de factores de diferente naturaleza, interaccionando entre sí. Este punto de vista nos permite entender qué factores predisponen a los individuos generación tras generación, asentando las bases, desde el desarrollo intrauterino, hasta la edad adulta. Es más, conocer los factores susceptibles de cambio con el objetivo de prevenir patologías que cursan durante el envejecimiento.

A partir de esta idea, esta investigación ha demostrado la importancia de la dieta materna en la cognición de la descendencia en ratones con envejecimiento acelerado. Concretamente, ha destacado la relevancia de los mecanismos epigenéticos modulados por la exposición a una dieta rica en RSV, implicados en diferentes mecanismos moleculares, como el EO, la neuroinflamación o ERE, relacionados en el deterioro cognitivo a través de las generaciones. Además, hemos demostrado que el consumo de una dieta HFD empeora el estado de neurodegeneración del modelo de ratón SAMP8 y que predispone a un mayor deterioro transgeneracionalmente. Incluso, que el consumo de RSV revierte este daño, regulando alteraciones del metabolismo energético, neuroinflamación y plasticidad neuronal, a través de los mecanismos epigenéticos, principalmente en la F1, disipándose en la F2.

Por tanto, se ha evidenciado la importancia de la dieta materna en la cognición de generaciones posteriores y de la importancia de los mecanismos epigenéticos en la regulación de marcadores implicados en procesos de envejecimiento en la descendencia (Figura 18). Estos resultados están en consonancia con otros estudios en animales y en humanos que demuestran la importancia del estilo de vida, el ambiente intrauterino y la herencia epigenética en el origen de las enfermedades asociadas al envejecimiento. Sobre todo, con la idea de abrir un nuevo horizonte en la comprensión de los mecanismos que subyacen a dichas patologías y encontrar nuevas intervenciones terapéuticas que promuevan una sociedad más saludable.

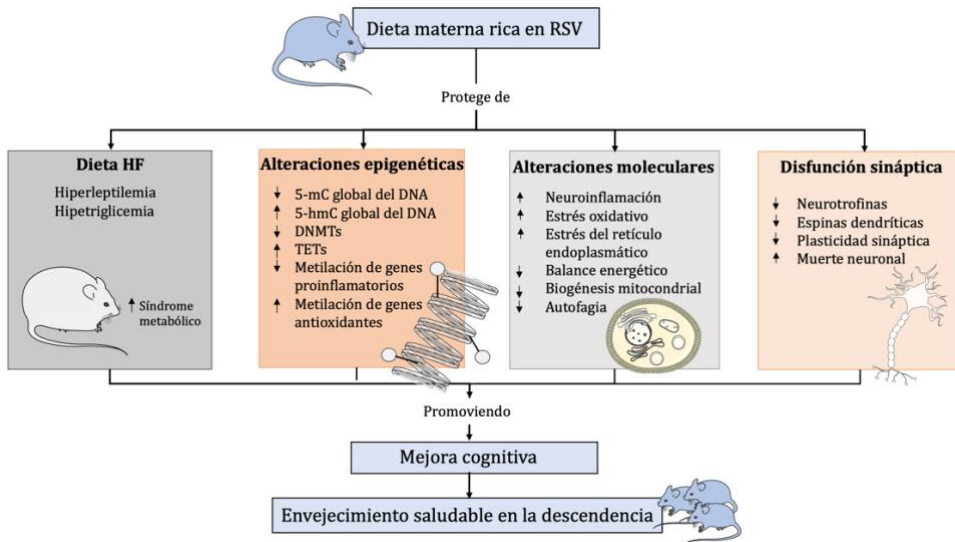


Figura 18. Esquema general sobre los mecanismos implicados en la heredabilidad del RSV y su efecto antienviejimiento en la descendencia. Efecto materno del RSV sobre mecanismos implicados en el deterioro cognitivo (factores epigenéticos, dieta HFD y mecanismos moleculares) que promueven un envejecimiento saludable en la descendencia adulta del ratón SAMP8 (efecto intergeneracional y transgeneracional).

5. Conclusiones



La conclusión general de esta tesis es que una dieta materna rica en RSV participa en la modulación de los mecanismos de herencia epigenética implicados en el deterioro cognitivo e inducido por una HFD en el modelo de ratón SAMP8.

De esta conclusión general se derivan las siguientes conclusiones específicas:

1. El consumo de una dieta materna rica en RSV no produce cambios en el peso de la descendencia del modelo murino SAMP8.
2. La dieta materna rica en RSV protege del deterioro cognitivo, así como, del incremento de la neurodegeneración que provoca la HFD en la descendencia del modelo de ratón SAMP8, a través de la modulación del metabolismo energético, reduciendo los niveles de leptina y TG.
3. La ingesta materna de RSV revierte el deterioro cognitivo del ratón SAMP8 transgeneracionalmente mientras que, bajo el efecto de la HFD, revierte el proceso de envejecimiento de manera intergeneracional.
4. La dieta materna rica en RSV tiene un efecto antienvjecimiento, a través de la regulación del balance energético y proteostasis en la descendencia del modelo SAMP8, reduciendo el EO, el ERE y la autofagia.
5. El consumo de una dieta materna rica en RSV mejora el estado de la memoria, incluso el daño producido por una HFD a través de las generaciones del modelo murino SAMP8, mediante la regulación de mecanismos epigenéticos.

6. El RSV consumido por las madres revierte el proceso de neurodegeneración en las generaciones F1 y F2 del modelo de ratón SAMP8, modificando los niveles de 5-mC de genes implicados en la respuesta antioxidante e inflamatoria.

7. La dieta materna rica en RSV previene el deterioro cognitivo bajo el efecto de una HFD reduciendo la inflamación y EO a través de las generaciones del ratón SAMP8.

8. El consumo de una dieta materna rica en RSV regula mecanismos de neurogénesis y conectividad sináptica, modulando marcadores implicados en la función y plasticidad neuronal en la descendencia del modelo murino SAMP8.

6. Bibliografía



- Abdul, Q. A., Yu, B. P., Chung, H. Y., Jung, H. A., & Choi, J. S. (2017). Epigenetic modifications of gene expression by lifestyle and environment. *Archives of Pharmacal Research*, *40*(11), 1219–1237.
- Agarwal, P., Morriseau, T. S., Kereliuk, S. M., Doucette, C. A., Wicklow, B. A., & Dolinsky, V. W. (2018). Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, *55*(2), 71–101. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1422109>
- Aguirre, L., Fernández-Quintela, A., Arias, N., & Portillo, M. P. (2014). Resveratrol: anti-obesity mechanisms of action. *Molecules*, *19*(11), 18632–18655.
- Akiguchi, I., Pallàs, M., Budka, H., Akiyama, H., Ueno, M., Han, J., Yagi, H., Nishikawa, T., Chiba, Y., & Sugiyama, H. (2017). SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology*, *37*(4), 293–305.
- Albasanz, J. L., Castillo, C. A., Barrachina, M., Ferrer, I., & Martín, M. (2011). Modulation of Signal Transduction Pathways in Senescence-Accelerated Mice P8 Strain : A Useful Tool for Alzheimer 's Disease Research. In S. D. La Monte (Ed.), *The Clinical Spectrum of Alzheimer's Disease* (p. 297). InTech.
- Alzoubi, K. H., Mayyas, F. A., Mahafzah, R., & Khabour, O. F. (2018). Melatonin prevents memory impairment induced by high-fat diet: role of oxidative stress. *Behavioural Brain Research*, *336*, 93–98.
- Ambeskovic, M., Roseboom, T. J., & Metz, G. A. S. (2020). Transgenerational effects of early environmental insults on aging and disease incidence. *Neuroscience*

- and *Biobehavioral Reviews*, 117(November 2016), 297–316.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.08.002>
- Andrews, S. J., Fulton-Howard, B., & Goate, A. (2020). Interpretation of risk loci from genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 19(4), 326–335. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30435-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30435-1)
- Apple, D. M., Solano-Fonseca, R., & Kokovay, E. (2017). Neurogenesis in the aging brain. *Biochemical Pharmacology*, 141, 77–85.
- Asgary, S., Karimi, R., Momtaz, S., Naseri, R., & Farzaei, M. H. (2019). Effect of resveratrol on metabolic syndrome components: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 20(2), 173–186. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09494-z>
- Ashe, K. H., & Zahs, K. R. (2010). Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron*, 66(5), 631–645.
- Athanasopoulos, D., Karagiannis, G., & Tsolaki, M. (2016). Recent findings in Alzheimer disease and nutrition focusing on epigenetics. *Advances in Nutrition*, 7(5), 917–927.
- Aubin, M.-C., Lajoie, C., Clement, R., Gosselin, H., Calderone, A., & Perrault, L. P. (2008). Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: therapeutic potential of resveratrol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(3), 961–968.
- Baeta-Corral, R., Johansson, B., & Giménez-Llort, L. (2018). Long-term treatment with low-dose caffeine worsens BPSD-like profile in 3xTg-AD mice model of Alzheimer's disease and affects mice with normal aging. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 79.

- Bariani, M. V., Correa, F., Domínguez Rubio, A. P., Marvaldi, C., Schander, J. A., Beltrame, J. S., Cella, M., Silberman, D. M., Aisemberg, J., & Franchi, A. M. (2020). Maternal obesogenic diet combined with postnatal exposure to high-fat diet induces metabolic alterations in offspring. *Journal of Cellular Physiology*, 235(11), 8260–8269.
- Bautista, N. M., Crespel, A., Crossley, J., Padilla, P., & Burggren, W. (2020). Parental transgenerational epigenetic inheritance related to dietary crude oil exposure in *Danio rerio*. *Journal of Experimental Biology*, 223(16).
- Bellenguez, C., Grenier-Boley, B., & Lambert, J. C. (2020). Genetics of Alzheimer's disease: where we are, and where we are going. *Current Opinion in Neurobiology*, 61, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.11.024>
- Berson, A., Nativio, R., Berger, S. L., & Bonini, N. M. (2018). Epigenetic regulation in neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences*, 41(9), 587–598.
- Bertogliat, M. J., Morris-Blanco, K. C., & Vemuganti, R. (2020). Epigenetic mechanisms of neurodegenerative diseases and acute brain injury. *Neurochemistry International*, 133(October 2019), 104642. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104642>
- Bettio, L. E. B., Rajendran, L., & Gil-Mohapel, J. (2017). The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 79(March), 66–86. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.030>
- Binotti, P., Spina, D., de la Barrera, M. L., & Donolo, D. (2009). Funciones ejecutivas y aprendizaje en el envejecimiento normal. Estimulación cognitiva desde una mirada psicopedagógica. *Revista Chilena de Neuropsicología*, 4(2), 119–126.
- Blake, G. E. T., & Watson, E. D. (2016). Unravelling the complex mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Current Opinion in Chemical Biology*, 33(October 2017), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.008>

- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5), 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauvant, J., Aubert, A., Castanon, N., Layé, S., & Ferreira, G. (2014). Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 40, 9–17.
- Booth, L. N., & Brunet, A. (2016). The aging epigenome. *Molecular Cell*, 62(5), 728–744.
- Borczyk, M., Śliwińska, M. A., Caly, A., Bernas, T., & Radwanska, K. (2019). Neuronal plasticity affects correlation between the size of dendritic spine and its postsynaptic density. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.
- Borshchev, Y. Y., Uspensky, Y. P., & Galagudza, M. M. (2019). Pathogenetic pathways of cognitive dysfunction and dementia in metabolic syndrome. *Life Sciences*, 237, 116932.
- Brown, V. A., Patel, K. R., Viskaduraski, M., Crowell, J. A., Perloff, M., Booth, T. D., Vasilinin, G., Sen, A., Schinas, A. M., Pichirilli, G., Brown, K., Steward, W. P., Gescher, A. J., & Brenner, D. (2010). Repeat Dose Study of the Cancer Chemopreventive Agent Resveratrol in Healthy Volunteers: Safety, Pharmacokinetics and Effect on the Insulin-like Growth Factor Axis. *Cancer Res*, 70(22), 9003–9011. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2364.Repeat>
- Cao, W., Dou, Y., & Li, A. (2018). Resveratrol Boosts Cognitive Function by Targeting SIRT1. *Neurochemical Research*, 43(9), 1705–1713. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2586-8>
- Carpéné, C., Les, F., Cásedas, G., Peiro, C., Fontaine, J., Chaplin, A., Mercader, J., &

- López, V. (2019). Resveratrol anti-obesity effects: Rapid inhibition of adipocyte glucose utilization. *Antioxidants*, *8*(3), 74.
- Carpinello, O. J., Decherney, A. H., & Hill, M. J. (2018). Developmental Origins of Health and Disease: The History of the Barker Hypothesis and Assisted Reproductive Technology. *Seminars in Reproductive Medicine*, *36*(3–4), 177–182. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1675779>
- Carrizzo, A., Forte, M., Damato, A., Trimarco, V., Salzano, F., Bartolo, M., Maciag, A., Puca, A. A., & Vecchione, C. (2013). Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, *61*, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.021>
- Casavilca-Zambrano, S., Cancino-Maldonado, K., Jaramillo-Valverde, L., & Guio, H. (2019). Epigenética: la relación del medio ambiente con el genoma y su influencia en la salud mental. *Revista de Neuro-Psiquiatria*, *82*(4), 266–273. <https://doi.org/10.20453/rnp.v82i4.3648>
- Cassilhas, R. C., Tufik, S., & De Mello, M. T. (2016). Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(5), 975–983. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2102-0>
- Chai, W. J., Abd Hamid, A. I., & Abdullah, J. M. (2018). Working memory from the psychological and neurosciences perspectives: A review. *Frontiers in Psychology*, *9*(MAR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00401>
- Chaplin, A., Carpené, C., & Mercader, J. (2018). Resveratrol, metabolic syndrome, and gut microbiota. *Nutrients*, *10*(11), 1–29. <https://doi.org/10.3390/nu10111651>
- Chen, Y., Shi, G., Liang, Z., Sheng, S., Shi, Y., Peng, L., Wang, Y., Wang, F., & Zhang, X. (2019). Resveratrol improves cognition and decreases amyloid plaque formation in Tg6799 mice. *Molecular Medicine Reports*, *19*(5), 3783–3790.

- Cheng, H. S., Ton, S. H., Phang, S. C. W., Tan, J. B. L., & Kadir, K. A. (2017). Increased susceptibility of post-weaning rats on high-fat diet to metabolic syndrome. *Journal of Advanced Research*, 8(6), 743–752.
- Cheng, X. (2013). Nodes and biological processes identified on the basis of network analysis in the brain of the senescence accelerated mice as an Alzheimer's disease animal model. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 65.
- Cheng, Y. W., Chen, T. F., & Chiu, M. J. (2017). From mild cognitive impairment to subjective cognitive decline: Conceptual and methodological evolution. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 13, 491–498. <https://doi.org/10.2147/NDT.S123428>
- Cheon, S. Y., Kim, H., Rubinsztein, D. C., & Lee, J. E. (2019). Autophagy, cellular aging and age-related human diseases. *Experimental Neurobiology*, 28(6), 643.
- Cicero, A. F. G., Ruscica, M., & Banach, M. (2019). Resveratrol and cognitive decline: a clinician perspective. *Archives of Medical Science: AMS*, 15(4), 936.
- Clare, L., Wu, Y.-T., Teale, J. C., MacLeod, C., Matthews, F., Brayne, C., Woods, B., & Team, C.-W. S. (2017). Potentially modifiable lifestyle factors, cognitive reserve, and cognitive function in later life: A cross-sectional study. *PLoS Medicine*, 14(3), e1002259.
- Cloak, N., & Al Khalili, Y. (2020). Behavioral And Psychological Symptoms In Dementia. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Cosín-Tomás, M., Álvarez-López, M. J., Companys-Alemany, J., Kaliman, P., González-Castillo, C., Ortuño-Sahagún, D., Pallàs, M., & Griñán-Ferré, C. (2018). Temporal integrative analysis of mRNA and microRNAs expression profiles and epigenetic alterations in female SAMP8, a model of age-related cognitive decline. *Frontiers in Genetics*, 9, 596.

- Creighton, S. D., Stefanelli, G., Reda, A., & Zovkic, I. B. (2020). Epigenetic mechanisms of learning and memory: Implications for aging. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms21186918>
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M., & Zhong, K. (2019). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, *5*, 272–293.
- Dashorst, P., Mooren, T. M., Kleber, R. J., de Jong, P. J., & Huntjens, R. J. C. (2019). Intergenerational consequences of the Holocaust on offspring mental health: a systematic review of associated factors and mechanisms. *European Journal of Psychotraumatology*, *10*(1), 1654065.
- Day, J. J., & Sweatt, J. D. (2011). Epigenetic Mechanisms in Cognition. *Neuron*, *70*(5), 813–829. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.019>
- de Haan, G., & Lazare, S. S. (2018). Aging of hematopoietic stem cells. *Blood*, *131*(5), 479–487.
- de la Fuente Alonso, A. (2019). *Enfermedad de Alzheimer y epigenética: una revisión bibliográfica*.
- Delerue, F., Sjollem, G., Whittle, B., Krüger, S., Andrews, D., & Götz, J. (2013). Single nucleotide variants (SNVs) define senescence-accelerated SAMP8 mice, a model of a geriatric condition. *Journal of Alzheimer's Disease*, *36*(2), 349–363. <https://doi.org/10.3233/JAD-130089>
- Denham, J. (2018). Exercise and epigenetic inheritance of disease risk. *Acta Physiologica*, *222*(1), e12881.
- Di Spiezio, A., Sandin, E. S., Dore, R., Müller-Fielitz, H., Storck, S. E., Bernau, M., Mier, W., Oster, H., Jöhren, O., Pietrzik, C. U., Lehnert, H., & Schwaninger, M. (2018). The LepR-mediated leptin transport across brain barriers controls food

- reward. *Molecular Metabolism*, 8(December 2017), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.12.001>
- Dodig, S., Čepelak, I., & Pavić, I. (2019). Hallmarks of senescence and aging. *Biochemia Medica*, 29(3), 1–15. <https://doi.org/10.11613/BM.2019.030501>
- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>
- Erkkinen, M. G., Kim, M. O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4), 1–44. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>
- Falcón, P., Escandón, M., Brito, Á., & Matus, S. (2019). Nutrient sensing and redox balance: GCN2 as a new integrator in aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 8–10. <https://doi.org/10.1155/2019/5730532>
- Faragher, R. G. A., McArdle, A., Willows, A., & Ostler, E. L. (2017). Senescence in the aging process. *F1000Research*, 6.
- Fatima, M., Srivastav, S., & Mondal, A. C. (2017). Prenatal stress and depression associated neuronal development in neonates. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 60, 1–7.
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S. L., Le, T., Li, E., Sweatt, J. D., Silva, A. J., & Fan, G. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nature Neuroscience*, 13(4), 423.
- Fernandes, J., Arida, R. M., & Gomez-Pinilla, F. (2017). Physical exercise as an epigenetic modulator of brain plasticity and cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 80, 443–456.

- Fernandez-Twinn, D. S., Hjort, L., Novakovic, B., Ozanne, S. E., & Saffery, R. (2019). Intrauterine programming of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, *62*(10), 1789–1801. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4951-9>
- Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., & Adams, P. D. (2018). DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Molecular Cell*, *71*(6), 882–895. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.008>
- Fîlfan, M., Sandu, R. E., Zăvăleanu, A.-D., Greșiță, A., Glăvan, D.-G., Olaru, D.-G., & Popa-Wagner, A. (2017). Autophagy in aging and disease. *Rom J Morphol Embryol*, *58*(1), 27–31.
- Finicelli, M., Squillaro, T., Di Cristo, F., Di Salle, A., Melone, M. A. B., Galderisi, U., & Peluso, G. (2019). Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: Evidence and perspectives. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(5), 5807–5826. <https://doi.org/10.1002/jcp.27506>
- Fleck, J. I., Arnold, M., Dykstra, B., Casario, K., Douglas, E., & Morris, O. (2019). Distinct functional connectivity patterns are associated with social and cognitive lifestyle factors: pathways to cognitive reserve. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *11*, 310.
- Flores-Dorantes, M. T., Díaz-López, Y. E., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2020). Environment and Gene Association With Obesity and Their Impact on Neurodegenerative and Neurodevelopmental Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, *14*(August). <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00863>
- Folch, J., Busquets, O., Ettcheto, M., Sánchez-López, E., Pallàs, M., Beas-Zarate, C., Marin, M., Casadesus, G., Olloquequi, J., Auladell, C., & Camins, A. (2017). Experimental Models for Aging and their Potential for Novel Drug Discovery. *Current Neuropharmacology*, *16*(10), 1466–1483.

<https://doi.org/10.2174/1570159x15666170707155345>

- Foster, H. M. E., Celis-Morales, C. A., Nicholl, B. I., Petermann-Rocha, F., Pell, J. P., Gill, J. M. R., O'Donnell, C. A., & Mair, F. S. (2018). The effect of socioeconomic deprivation on the association between an extended measurement of unhealthy lifestyle factors and health outcomes: a prospective analysis of the UK Biobank cohort. *The Lancet Public Health*, 3(12), e576–e585. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(18\)30200-7](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30200-7)
- Gabbianelli, R., & Damiani, E. (2018). Epigenetics and neurodegeneration: role of early-life nutrition. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 57, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.01.014>
- Galiniak, S., Aebisher, D., & Bartusik-Aebisher, D. (2019). Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochimica Polonica*, 66(1), 13–21. https://doi.org/10.18388/abp.2018_2749
- Gapp, K., & Bohacek, J. (2018). Epigenetic germline inheritance in mammals: looking to the past to understand the future. *Genes, Brain and Behavior*, 17(3), 1–12. <https://doi.org/10.1111/gbb.12407>
- Ghosh, R., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington disease. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 147). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00017-8>
- Ginsberg, S. D., Malek-Ahmadi, M. H., Alldred, M. J., Che, S., Elarova, I., Chen, Y., Jeanneteau, F., Kranz, T. M., Chao, M. V., & Counts, S. E. (2019). Selective decline of neurotrophin and neurotrophin receptor genes within CA1 pyramidal neurons and hippocampus proper: correlation with cognitive performance and neuropathology in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 29(5), 422–439.
- Gomes, B. A. Q., Silva, J. P. B., Romeiro, C. F. R., Dos Santos, S. M., Rodrigues, C. A.,

- Gonçalves, P. R., Sakai, J. T., Mendes, P. F. S., Varela, E. L. P., & Monteiro, M. C. (2018). Neuroprotective mechanisms of resveratrol in Alzheimer's disease: role of SIRT1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
- Gomez-Verjan, J. C., Barrera-Vázquez, O. S., García-Velázquez, L., Samper-Ternent, R., & Arroyo, P. (2020). Epigenetic variations due to nutritional status in early-life and its later impact on aging and disease. *Clinical Genetics*, 98(4), 313–321. <https://doi.org/10.1111/cge.13748>
- Gracia, A., Miranda, J., Fernández-Quintela, A., Eseberri, I., Garcia-Lacarte, M., Milagro, F. I., Martínez, J. A., Aguirre, L., & Portillo, M. P. (2016). Involvement of miR-539-5p in the inhibition of de novo lipogenesis induced by resveratrol in white adipose tissue. *Food & Function*, 7(3), 1680–1688.
- Grande, G., Qiu, C., & Fratiglioni, L. (2020). Prevention of dementia in an ageing world: Evidence and biological rationale. *Ageing Research Reviews*, 64(March), 101045. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101045>
- Greaves, C. V., & Rohrer, J. D. (2019). An update on genetic frontotemporal dementia. *Journal of Neurology*, 266(8), 2075–2086. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09363-4>
- Griñán-Ferré, C., Bellver-Sanchis, A., Izquierdo, V., Corpas, R., Roig-Soriano, J., Chillón, M., Andres-Lacueva, C., Somogyvári, M., Sóti, C., Sanfeliu, C., & Pallàs, M. (2021). The pleiotropic neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: from antioxidant to epigenetic therapy. *Ageing Research Reviews*, 67(February 2020), 101271. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101271>
- Griñán-Ferré, C., Corpas, R., Puigoriol-Illamola, D., Palomera-Ávalos, V., Sanfeliu, C., & Pallàs, M. (2018a). Understanding epigenetics in the neurodegeneration of Alzheimer's disease: SAMP8 mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease*,

62(3), 943–963.

Griñán-Ferré, C., Corpas, R., Puigoriol-Illamola, D., Palomera-Ávalos, V., Sanfeliu, C., & Pallàs, M. (2018b). Understanding Epigenetics in the Neurodegeneration of Alzheimer's Disease: SAMP8 Mouse Model. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(3), 943–963. <https://doi.org/10.3233/JAD-170664>

Griñán-Ferré, C., Izquierdo, V., Otero, E., Puigoriol-Illamola, D., Corpas, R., Sanfeliu, C., Ortuño-Sahagún, D., & Pallàs, M. (2018). Environmental enrichment improves cognitive deficits, AD hallmarks and epigenetic alterations presented in 5xFAD mouse model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 224.

Griñán-Ferré, C., Izquierdo, V., & Pallàs, M. (2020). Dietary antioxidants, epigenetics, and brain aging: A focus on resveratrol. In *Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases* (pp. 343–357). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817780-8.00022-0>

Griñán-Ferré, C., Palomera-Ávalos, V., Puigoriol-Illamola, D., Camins, A., Porquet, D., Plá, V., Aguado, F., & Pallàs, M. (2016). Behaviour and cognitive changes correlated with hippocampal neuroinflammation and neuronal markers in female SAMP8, a model of accelerated senescence. *Experimental Gerontology*, 80, 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.03.014>

Griñán-Ferré, C., Pérez-Cáceres, D., Gutiérrez-Zetina, S. M., Camins, A., Palomera-Ávalos, V., Ortuño-Sahagún, D., Rodrigo, M. T., & Pallàs, M. (2016). Environmental enrichment improves behavior, cognition, and brain functional markers in young senescence-accelerated prone mice (SAMP8). *Molecular Neurobiology*, 53(4), 2435–2450.

Griñán-Ferré, C., Puigoriol-Illamola, D., Palomera-Ávalos, V., Pérez-Cáceres, D., Companys-Aleman, J., Camins, A., Ortuño-Sahagún, D., Rodrigo, M. T., & Pallàs, M. (2016). Environmental enrichment modified epigenetic mechanisms in

- SAMP8 mouse hippocampus by reducing oxidative stress and inflammaging and achieving neuroprotection. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, 241.
- Griñán-Ferré, C., Sarroca, S., Ivanova, A., Puigoriol-Illamola, D., Aguado, F., Camins, A., Sanfeliu, C., & Pallàs, M. (2016). Epigenetic mechanisms underlying cognitive impairment and Alzheimer disease hallmarks in 5XFAD mice. *Aging*, 8(4), 664–684. <https://doi.org/10.18632/aging.100906>
- Gruzdeva, O., Borodkina, D., Uchasova, E., Dyleva, Y., & Barbarash, O. (2019). Leptin resistance: Underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 12, 191–198. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S182406>
- Guerville, F., Barreto, P. D. S., Ader, I., Andrieu, S., Casteilla, L., Dray, C., Fazilleau, N., Guyonnet, S., Langin, D., Liblau, R., Parini, A., Valet, P., Vergnolle, N., Rolland, Y., & Vellas, B. (2020). Revisiting the Hallmarks of Aging to Identify Markers of Biological Age. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 7(1).
- Guidi, N., Sacma, M., Ständker, L., Soller, K., Marka, G., Eiwen, K., Weiss, J. M., Kirchhoff, F., Weil, T., & Cancelas, J. A. (2017). Osteopontin attenuates aging-associated phenotypes of hematopoietic stem cells. *The EMBO Journal*, 36(7), 840–853.
- Guillaumet-Adkins, A., Yañez, Y., Peris-Diaz, M. D., Calabria, I., Palanca-Ballester, C., & Sandoval, J. (2017). Epigenetics and Oxidative Stress in Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9175806>
- Gulyaeva, N. V. (2017). Molecular Mechanisms of Neuroplasticity : An Expanding Universe. *Biochemistry (Moscow)*, 82(3), 237–242.
- Gustafson, P., Ladyman, S. R., & Brown, R. S. E. (2019). Suppression of leptin transport into the brain contributes to leptin resistance during pregnancy in

- the mouse. *Endocrinology*, 160(4), 880–890.
- Haines, J. L. (2018). Alzheimer disease: perspectives from epidemiology and genetics. *The Journal of Law, Medicine & Ethics*, 46(3), 694–698.
- Hajj, N. El, Schneider, E., Lehnen, H., & Haaf, T. (2014). Epigenetics and life-long consequences of an adverse nutritional and diabetic intrauterine environment. *Reproduction*, 148(6), R111–R120. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0334>
- Han, M., Liu, Z., Xu, Y., Liu, X., Wang, D., Li, F., Wang, Y., & Bi, J. (2020). Abnormality of m6A mRNA methylation is involved in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 98.
- Harman, M. F., & Martín, M. G. (2019). Epigenetic mechanisms related to cognitive decline during aging. *Journal of Neuroscience Research*, 98(2), 234–246. <https://doi.org/10.1002/jnr.24436>
- Horgusluoglu-Moloch, E., Nho, K., Risacher, S. L., Kim, S., Foroud, T., Shaw, L. M., Trojanowski, J. Q., Aisen, P. S., Petersen, R. C., & Jack Jr, C. R. (2017). Targeted neurogenesis pathway-based gene analysis identifies ADORA2A associated with hippocampal volume in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 60, 92–103.
- Horsthemke, B. (2018). A critical view on transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Nature Communications*, 9(1), 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05445-5>
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(10), 565–581.
- Huang, B., Ding, C., Zou, Q., Wang, W., & Li, H. (2019). Cyclophosphamide regulates

- N6-methyladenosine and m6A RNA enzyme levels in human granulosa cells and in ovaries of a premature ovarian aging mouse model. *Frontiers in Endocrinology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00415>
- Huang, D. D., Shi, G., Jiang, Y., Yao, C., & Zhu, C. (2020). A review on the potential of Resveratrol in prevention and therapy of diabetes and diabetic complications. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 125(October 2019), 109767. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109767>
- Illum, L. R. H., Bak, S. T., Lund, S., & Nielsen, A. L. (2018). DNA methylation in epigenetic inheritance of metabolic diseases through the male germ line. *Journal of Molecular Endocrinology*, 60(2), R39–R56.
- Imamura, H., Nagayama, D., Ishihara, N., Tanaka, S., Watanabe, R., Watanabe, Y., Sato, Y., Yamaguchi, T., Ban, N., & Kawana, H. (2017). Resveratrol attenuates triglyceride accumulation associated with upregulation of Sirt1 and lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 12, 44–50.
- Irier, H. A., & Jin, P. (2012). Dynamics of DNA methylation in aging and Alzheimer's disease. *DNA and Cell Biology*, 31(SUPPL. 1), 42–48. <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1565>
- Isaev, N. K., Genrikhs, E. E., Oborina, M. V., & Stelmashook, E. V. (2018). Accelerated aging and aging process in the brain. *Reviews in the Neurosciences*, 29(3), 233–240.
- Izquierdo, A. G., Crujeiras, A. B., Casanueva, F. F., & Carreira, M. C. (2019). Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? *Nutrients*, 11(11), 1–11. <https://doi.org/10.3390/nu11112704>
- Jablonka, E., & Noble, D. (2019). Systemic integration of different inheritance systems. *Current Opinion in Systems Biology*, 13, 52–58.

<https://doi.org/10.1016/j.coisb.2018.10.002>

Janssens, G. E., & Veenhoff, L. M. (2016). Evidence for the hallmarks of human aging in replicatively aging yeast. *Microbial Cell*, 3(7), 263–274. <https://doi.org/10.15698/mic2016.07.510>

Jeffery, K. J. (2018). The hippocampus: from memory, to map, to memory map. *Trends in Neurosciences*, 41(2), 64–66.

Jessen, F., Amariglio, R. E., Buckley, R. F., van der Flier, W. M., Han, Y., Molinuevo, J. L., Rabin, L., Rentz, D. M., Rodriguez-Gomez, O., & Saykin, A. J. (2020). The characterisation of subjective cognitive decline. *The Lancet Neurology*, 19(3), 271–278.

Jimoh, A., Tanko, Y., Ayo, J. O., Ahmed, A., & Mohammed, A. (2018). Resveratrol increases serum adiponectin level and decreases leptin and insulin level in an experimental model of hypercholesterolemia. *Pathophysiology*, 25(4), 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2018.08.005>

Johnson, S. A., Javurek, A. B., Painter, M. S., Murphy, C. R., Conard, C. M., Gant, K. L., Howald, E. C., Eilersieck, M. R., Wiedmeyer, C. E., & Vieira-Potter, V. J. (2017). Effects of a maternal high-fat diet on offspring behavioral and metabolic parameters in a rodent model. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(1), 75–88.

Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12(JAN). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>

Kanasi, E., Ayilavarapu, S., & Jones, J. (2016). The aging population: demographics and the biology of aging. *Periodontology 2000*, 72(1), 13–18.

Kandlur, A., Satyamoorthy, K., & Gangadharan, G. (2020). Oxidative Stress in

- Cognitive and Epigenetic Aging: A Retrospective Glance. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13(March). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00041>
- Kang, W., Hong, H. J., Guan, J., Kim, D. G., Yang, E.-J., Koh, G., Park, D., Han, C. H., Lee, Y.-J., & Lee, D.-H. (2012). Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under insulin-resistant conditions only: in vitro and in vivo experiments in rodents. *Metabolism*, 61(3), 424–433.
- Kaspar, D., Hastreiter, S., Irmeler, M., Hrabé de Angelis, M., & Beckers, J. (2020). Nutrition and its role in epigenetic inheritance of obesity and diabetes across generations. *Mammalian Genome*, 31(5–6), 119–133. <https://doi.org/10.1007/s00335-020-09839-z>
- Khalaf, O., & Gräff, J. (2016). Structural, synaptic, and epigenetic dynamics of enduring memories. *Neural Plasticity*, 2016.
- Khokhar, E. S., Borikar, S., Eudy, E., Stearns, T., Young, K., & Trowbridge, J. J. (2020). Aging-associated decrease in the histone acetyltransferase KAT6B is linked to altered hematopoietic stem cell differentiation. *Experimental Hematology*, 82, 43-52.e4. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.01.014>
- Kim, S., & Kaang, B.-K. (2017a). Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(1), e281–e281.
- Kim, S., & Kaang, B. K. (2017b). Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(1), e281-8. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.140>
- King, S. E., & Skinner, M. K. (2020). Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity Susceptibility. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 31(7), 478–494. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.02.009>
- Kinser, H. E., & Pincus, Z. (2020). MicroRNAs as modulators of longevity and the

- aging process. *Human Genetics*, 139(3), 291–308. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02046-0>
- Klastrup, L. K., Bak, S. T., & Nielsen, A. L. (2019). The influence of paternal diet on sncRNA-mediated epigenetic inheritance. *Molecular Genetics and Genomics*, 294(1), 1–11.
- Knight, M. J., Wearn, A., Coulthard, E., & Kauppinen, R. A. (2019). T2 Relaxometry and diffusion tensor indices of the hippocampus and entorhinal cortex improve sensitivity and specificity of MRI to detect amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease dementia. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 49(2), 445–455.
- Konings, E., Timmers, S., Boekschoten, M. V., Goossens, G. H., Jocken, J. W., Afman, L. A., Müller, M., Schrauwen, P., Mariman, E. C., & Blaak, E. E. (2014). The effects of 30 days resveratrol supplementation on adipose tissue morphology and gene expression patterns in obese men. *International Journal of Obesity*, 38(3), 470–473.
- Korsholm, A. S., Kjær, T. N., Ornstrup, M. J., & Pedersen, S. B. (2017). Comprehensive metabolomic analysis in blood, urine, fat, and muscle in men with metabolic syndrome: a randomized, placebo-controlled clinical trial on the effects of resveratrol after four months' treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 554.
- Kovacs, G. G. (2018). Tauopathies. *Handbook of Clinical Neurology*, 145, 355–368. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00025-0>
- Kulashekar, M., Stom, S. M., & Peuler, J. D. (2018). Resveratrol's potential in the adjunctive management of cardiovascular disease, obesity, diabetes, Alzheimer disease, and cancer. *Journal of the American Osteopathic Association*, 118(9), 596–605. <https://doi.org/10.7556/jaoa.2018.133>

- Kumar, R., Jain, V., Kushwah, N., Dheer, A., Mishra, K. P., Prasad, D., & Singh, S. B. (2018). Role of DNA methylation in hypobaric hypoxia-induced neurodegeneration and spatial memory impairment. *Annals of Neurosciences*, 25, 191–200.
- Kumar, S., Vijayan, M., Bhatti, J. S., & Reddy, P. H. (2017). MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 146). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.013>
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., & Meziane, H. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, 127, 1109–1122.
- Lasa, A., Schweiger, M., Kotzbeck, P., Churruca, I., Simón, E., Zechner, R., & del Puy Portillo, M. (2012). Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(4), 379–384.
- Law, C.-K., Lam, F. M. H., Chung, R. C. K., & Pang, M. Y. C. (2020). Physical exercise attenuates cognitive decline and reduces behavioural problems in people with mild cognitive impairment and dementia: a systematic review. *Journal of Physiotherapy*, 66(1), 9–18.
- Lee, S. H., Lee, J. H., Lee, H. Y., & Min, K. J. (2019). Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Reports*, 52(1), 24–34. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.1.290>
- Leins, H., Mulaw, M., Eiwien, K., Sakk, V., Liang, Y., Denking, M., Geiger, H., & Schirmbeck, R. (2018). Aged murine hematopoietic stem cells drive aging-associated immune remodeling. *Blood*, 132(6), 565–576.
- Lemoine, M. (2020). Defining aging. *Biology & Philosophy*, 35(5), 1–30.

- Li, H., Li, X., Liu, Z., Wu, S., Guo, J., Shi, R., Sun, Y., Wang, Y., & Yin, H. (2019). Resveratrol reserved hypoxia-ischemia induced childhood hippocampal dysfunction and neurogenesis via improving mitochondrial dynamics. *Neuroscience Research*.
- Li, Y. R., Li, S., & Lin, C. C. (2018). Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. *BioFactors*, *44*(1), 69–82. <https://doi.org/10.1002/biof.1400>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, *13*, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Limonta, P., Moretti, R. M., Marzagalli, M., Fontana, F., Raimondi, M., & Marelli, M. M. (2019). Role of endoplasmic reticulum stress in the anticancer activity of natural compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms20040961>
- Lin, Y.-T., Wu, Y.-C., Sun, G.-C., Ho, C.-Y., Wong, T.-Y., Lin, C.-H., Chen, H.-H., Yeh, T.-C., Li, C.-J., Tseng, C.-J., & Cheng, P.-W. (2018). Effect of Resveratrol on Reactive Oxygen Species-Induced Cognitive Impairment in Rats with Angiotensin II-Induced Early Alzheimer's Disease †. *Journal of Clinical Medicine*, *7*(10), 329. <https://doi.org/10.3390/jcm7100329>
- Liu, B., Liu, J., & Shi, J.-S. (2020). SAMP8 mice as a model of age-related cognition decline with underlying mechanisms in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease, Preprint*, 1–11.
- Liu, W., Liu, C., Yin, B., & Peng, X.-Z. (2015). Functions of miR-9 and miR-9* during Aging in SAMP8 Mice and Their Possible Mechanisms. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*, *37*(3), 253–258.
- Liu, W., Liu, C., Zhu, J., Shu, P., Yin, B., Gong, Y., Qiang, B., Yuan, J., & Peng, X. (2012).

- MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiology of Aging*, 33(3), 522–534.
- Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S. G., Huntley, J., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Larson, E. B., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E. L., ... Mukadam, N. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet*, 390(10113), 2673–2734. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31363-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31363-6)
- Livneh, I., Moshitch-Moshkovitz, S., Amariglio, N., Rechavi, G., & Dominissini, D. (2020). The m6A epitranscriptome: transcriptome plasticity in brain development and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(1), 36–51. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0244-z>
- Loche, E., Blackmore, H. L., Carpenter, A. A., Beeson, J. H., Pinnock, A., Ashmore, T. J., Aiken, C. E., de Almeida-Faria, J., Schoonejans, J. M., & Giussani, D. A. (2018). Maternal diet-induced obesity programmes cardiac dysfunction in male mice independently of post-weaning diet. *Cardiovascular Research*, 114(10), 1372–1384.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013a). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013b). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- López-Otín, C., Galluzzi, L., Freije, J. M. P., Madeo, F., & Kroemer, G. (2016). Metabolic Control of Longevity. *Cell*, 166(4), 802–821. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.031>

- López Gutiérrez, J. A. (2017). Capítulo 5: Factores de riesgo para la enfermedad de Alzheimer. *Genética y Enfermedad de Alzheimer*. In *Entendiendo el Alzheimer. Una guía para el cuidador* (pp. 33–36).
- Lopez, O. L., & Kuller, L. H. (2019). Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 167). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00009-1>
- Lotankar, S., Prabhavalkar, K. S., & Bhatt, L. K. (2017). Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neuroscience Bulletin*, 33(5), 585–597. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0183-5>
- Ma, X. R., Sun, Z. K., Han, X., Li, S., Jiang, X., Chen, S., Zhang, J., & Lu, H. (2020). Neuroprotective Effect of Resveratrol via Activation of Sirt1 Signaling in a Rat Model of Combined Diabetes and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01400>
- Manta-Vogli, P. D., Schulpis, K. H., Dotsikas, Y., & Loukas, Y. L. (2020). The significant role of amino acids during pregnancy: nutritional support. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 33(2), 334–340.
- Martin-Herranz, D. E., Aref-Eshghi, E., Bonder, M. J., Stubbs, T. M., Stegle, O., Sadikovic, B., Reik, W., & Thornton, J. M. (2019). Screening for genes that accelerate the epigenetic ageing clock in humans reveals a role for the H3K36 methyltransferase NSD1. *Genome Biology*, 20(146), 1–19. <https://doi.org/10.1101/545830>
- Mazzeo, S., Padiglioni, S., Bagnoli, S., Bracco, L., Nacmias, B., Sorbi, S., & Bessi, V. (2019). The dual role of cognitive reserve in subjective cognitive decline and mild cognitive impairment: a 7-year follow-up study. *Journal of Neurology*, 266(2), 487–497. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9164-5>

- McColgan, P., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *European Journal of Neurology*, 25(1), 24–34. <https://doi.org/10.1111/ene.13413>
- Mendoza-Velásquez, J. J., Flores-Vázquez, J. F., Barrón-Velázquez, E., Sosa-Ortiz, A. L., Illigens, B. M. W., & Siepmann, T. (2019). Autonomic dysfunction in α -synucleinopathies. *Frontiers in Neurology*, 10(APR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00363>
- Michalak, E. M., Burr, M. L., Bannister, A. J., & Dawson, M. A. (2019). The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(10), 573–589. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0143-1>
- Moody, L., Chen, H., & Pan, Y.-X. (2017a). Early-life nutritional programming of cognition—the fundamental role of epigenetic mechanisms in mediating the relation between early-life environment and learning and memory process. *Advances in Nutrition*, 8(2), 337–350.
- Moody, L., Chen, H., & Pan, Y. X. (2017b). Early-life nutritional programming of cognition—the fundamental role of epigenetic mechanisms in mediating the relation between early-life environment and learning and memory process. *Advances in Nutrition*, 8(2), 337–350. <https://doi.org/10.3945/an.116.014209>
- Morley, J. E., Armbrecht, H. J., Farr, S. A., & Kumar, V. B. (2012). The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 650–656.
- Morley, J. E., Kumar, V. B., Bernardo, A. E., Farr, S. A., Uezu, K., Tumosa, N., & Flood, J. F. (2000). β -Amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning

- and memory. *Peptides*, 21(12), 1761–1767.
- Mu, X., Zhang, Y., Li, J., Xia, J., Chen, X., Jing, P., Song, X., Wang, L., & Wang, Y. (2017). Angelica sinensis polysaccharide prevents hematopoietic stem cells senescence in D-galactose-induced aging mouse model. *Stem Cells International*, 2017.
- Muñoz-Carvajal, F., & Sanhueza, M. (2020). The Mitochondrial Unfolded Protein Response: A Hinge Between Healthy and Pathological Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 300.
- Nagarajan, P., Agudelo Garcia, P. A., Iyer, C. C., Popova, L. V., Arnold, W. D., & Parthun, M. R. (2019). Early-onset aging and mitochondrial defects associated with loss of histone acetyltransferase 1 (Hat1). *Aging Cell*, 18(5), 1–17. <https://doi.org/10.1111/accel.12992>
- Nilsson, E. E., Sadler-Riggleman, I., & Skinner, M. K. (2018). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environmental Epigenetics*, 4(2), 1–13. <https://doi.org/10.1093/eep/dvy016>
- Ou, X., Zhu, C., & Sun, S. (2019). Effects of obesity and diabetes on the epigenetic modification of mammalian gametes. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 7847–7855.
- Ozcan, L., Ergin, A. S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Myers Jr, M. G., & Ozcan, U. (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metabolism*, 9(1), 35–51.
- Pallas, M., Camins, A., Smith, M. A., Perry, G., Lee, H. G., & Casadesus, G. (2008). From aging to Alzheimer's disease: Unveiling "The switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *Journal of Alzheimer's Disease*, 15(4), 615–624. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-15408>

- Palomera-Ávalos, V., Griñán-Ferré, C., Izquierdo, V., Camins, A., Sanfeliu, C., Canudas, A. M., & Pallàs, M. (2018). Resveratrol modulates response against acute inflammatory stimuli in aged mouse brain. *Experimental Gerontology*, *102*(November 2017), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.11.014>
- Palomera-Avalos, V., Griñán-Ferré, C., Puigoriol-Illamola, D., Camins, A., Sanfeliu, C., Canudas, A. M., & Pallàs, M. (2017). Resveratrol Protects SAMP8 Brain Under Metabolic Stress: Focus on Mitochondrial Function and Wnt Pathway. *Molecular Neurobiology*, *54*(3), 1661–1676. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9770-0>
- Palomera-Ávalos, Verónica, Griñán-Ferré, C., Izquierdo, V., Camins, A., Sanfeliu, C., Canudas, A. M., & Pallàs, M. (2018). Resveratrol modulates response against acute inflammatory stimuli in aged mouse brain. *Experimental Gerontology*, *102*, 3–11.
- Palomera-Avalos, Veronica, Griñán-Ferré, C., Izquierdo, V., Camins, A., Sanfeliu, C., & Pallàs, M. (2017). Metabolic stress induces cognitive disturbances and inflammation in aged mice: protective role of resveratrol. *Rejuvenation Research*, *20*(3), 202–217.
- Palomera-Ávalos, Verónica, Griñán-Ferré, C., Izquierdo, V., Camins, A., Sanfeliu, C., & Pallàs, M. (2017). Metabolic stress induces cognitive disturbances and inflammation in age mice. protective role of resveratrol. *Rejuvenation Research*, *XX*(XX).
- Palomera-Avalos, Verónica, Griñán-Ferré, C., Puigoriol-Illamola, D., Camins, A., Sanfeliu, C., Canudas, A. M., & Pallàs, M. (2017). Resveratrol protects SAMP8 brain under metabolic stress: focus on mitochondrial function and Wnt pathway. *Molecular Neurobiology*, *54*(3), 1661–1676.
- Pannu, N., & Bhatnagar, A. (2019). Resveratrol: from enhanced biosynthesis and

- bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109(November 2018), 2237–2251. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.075>
- Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., & Imbimbo, B. P. (2019). A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(2), 73–88.
- Park, J. H., Yoo, Y., & Park, Y. J. (2017). Epigenetics: Linking nutrition to molecular mechanisms in aging. *Preventive Nutrition and Food Science*, 22(2), 81–89. <https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.2.81>
- Pearce, K., Cai, D., Roberts, A. C., & Glanzman, D. L. (2017). Role of protein synthesis and DNA methylation in the consolidation and maintenance of long-term memory in *Aplysia*. *Elife*, 6, e18299.
- Porquet, D., Andrés-Benito, P., Griñán-Ferré, C., Camins, A., Ferrer, I., Canudas, A. M., Del Valle, J., & Pallàs, M. (2015). Amyloid and tau pathology of familial Alzheimer's disease APP/PS1 mouse model in a senescence phenotype background (SAMP8). *Age*, 37(1). <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9747-3>
- Psiquiatría, A. E. de. (2014). Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-5). In *Editorial Médica Panamericana: Vol. Quinta edi* (Issue Madrid). <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1923.02190230091015>
- Puigoriol-Illamola, D., Griñán-Ferré, C., Vasilopoulou, F., Leiva, R., Vázquez, S., & Pallàs, M. (2018). 11 β -HSD1 Inhibition by RL-118 Promotes Autophagy and Correlates with Reduced Oxidative Stress and Inflammation, Enhancing Cognitive Performance in SAMP8 Mouse Model. *Molecular Neurobiology*, 55(12), 8904–8915. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1026-8>
- Puigoriol-Illamola, D., Martínez-Damas, M., Griñán-Ferré, C., & Pallàs, M. (2020).

- Chronic Mild Stress Modified Epigenetic Mechanisms Leading to Accelerated Senescence and Impaired Cognitive Performance in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1154.
- Qazi, T. J., Quan, Z., Mir, A., & Qing, H. (2018). Epigenetics in Alzheimer's Disease: Perspective of DNA Methylation. *Molecular Neurobiology*, 55(2), 1026–1044. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0357-6>
- Quadros Gomes, B. A., Bastos Silva, J. P., Rodrigues Romeiro, C. F., dos Santos, S. M., Rodrigues, C. A., Gonçalves, P. R., Sakai, J. T., Santos Mendes, P. F., Pompeu Varela, E. L., & Monteiro, M. C. (2018). Neuroprotective mechanisms of resveratrol in Alzheimer's disease: Role of SIRT1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8152373>
- Rahman, M. A., Rahman, M. S., Uddin, M. J., Mamun-Or-Rashid, A. N. M., Pang, M. G., & Rhim, H. (2020). Emerging risk of environmental factors: insight mechanisms of Alzheimer's diseases. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(36), 44659–44672. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08243-z>
- Ramaiyan, B., & Talahalli, R. R. (2018). Dietary Unsaturated Fatty Acids Modulate Maternal Dyslipidemia-Induced DNA Methylation and Histone Acetylation in Placenta and Fetal Liver in Rats. *Lipids*, 53(6), 581–588.
- Reddy, P. H., Williams, J., Smith, F., Bhatti, J. S., Kumar, S., Vijayan, M., Kandimalla, R., Kuruva, C. S., Wang, R., Manczak, M., Yin, X., & Reddy, A. P. (2017). MicroRNAs, Aging, Cellular Senescence, and Alzheimer's Disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 146). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.009>
- Regitz, C., Fitzenberger, E., Mahn, F. L., Dußling, L. M., & Wenzel, U. (2016). Resveratrol reduces amyloid-beta (A β 1–42)-induced paralysis through

- targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Nutrition*, 55(2), 741–747. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0894-1>
- Remely, M., Stefanska, B., Lovrecic, L., Magnet, U., & Haslberger, A. G. (2015). Nutriepigenomics: The role of nutrition in epigenetic control of human diseases. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(4), 328–333. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000180>
- Reuben, A. (2018). Childhood lead exposure and adult neurodegenerative disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(1), 17–42.
- Ricker, T. J., Nieuwenstein, M. R., Bayliss, D. M., & Barrouillet, P. (2018). Working memory consolidation: Insights from studies on attention and working memory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1424(1), 8–18. <https://doi.org/10.1111/nyas.13633>
- Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A., & Parthasarathy, S. (2020). Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Advances in Nutrition*, 11(1), 77–91. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz061>
- Russo, G. L., Spagnuolo, C., Russo, M., Tedesco, I., Moccia, S., & Cervellera, C. (2020). Mechanisms of aging and potential role of selected polyphenols in extending healthspan. *Biochemical Pharmacology*, 173(November 2019), 113719. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113719>
- Sachdev, P. S., Blacker, D., Blazer, D. G., Ganguli, M., Jeste, D. V., Paulsen, J. S., & Petersen, R. C. (2014). Classifying neurocognitive disorders: the DSM - 5 approach. *Nature Publishing Group*, 10(November). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.181>
- Sah, S. K., Lee, C., Jang, J.-H., & Park, G. H. (2017). Effect of high-fat diet on cognitive

- impairment in triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(1), 731–736.
- Salvestrini, V., Sell, C., & Lorenzini, A. (2019). Obesity may accelerate the aging process. *Frontiers in Endocrinology*, 10(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00266>
- Sarubbo, F., Esteban, S., Miralles, A., & Moranta, D. (2017). Effects of Resveratrol and other Polyphenols on Sirt1: Relevance to Brain Function During Aging. *Current Neuropharmacology*, 16(2), 126–136. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170703113212>
- Sarubbo, Fiorella, Moranta, D., Asensio, V. J., Miralles, A., & Esteban, S. (2017). Effects of resveratrol and other polyphenols on the most common brain age-related diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 24(38), 4245–4266.
- Sawangjit, A., Oyanedel, C. N., Niethard, N., Salazar, C., Born, J., & Inostroza, M. (2018). The hippocampus is crucial for forming non-hippocampal long-term memory during sleep. *Nature*, 564(7734), 109–113.
- Sengoku, R. (2020). Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology*, 40(1), 22–29. <https://doi.org/10.1111/neup.12626>
- Seyedaghamiri, F., Farajdokht, F., Vatandoust, S. M., Mahmoudi, J., Khabbaz, A., & Sadigh-Eteghad, S. (2021). Sericin modulates learning and memory behaviors by tuning of antioxidant, inflammatory, and apoptotic markers in the hippocampus of aged mice. *Molecular Biology Reports*, 1–12.
- Sezgin, M., Bilgic, B., Tinaz, S., & Emre, M. (2019). Parkinson's Disease Dementia and Lewy Body Disease. *Seminars in Neurology*, 39(2), 274–282. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678579>
- Shafik, A. M., Zhang, F., Guo, Z., Dai, Q., Pajdzik, K., Li, Y., Kang, Y., Yao, B., Wu, H., He,

- C., Allen, E. G., Duan, R., & Jin, P. (2021). N6-methyladenosine dynamics in neurodevelopment and aging, and its potential role in Alzheimer's disease. *Genome Biology*, 22(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02249-z>
- Silva, P., Sureda, A., Tur, J. A., Andreoletti, P., Cherkaoui-Malki, M., & Latruffe, N. (2019). How efficient is resveratrol as an antioxidant of the Mediterranean diet, towards alterations during the aging process? *Free Radical Research*, 53(sup1), 1101–1112.
- Skvortsova, K., Iovino, N., & Bogdanović, O. (2018). Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(12), 774–790. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0074-2>
- Smith, E. E. (2017). Clinical presentations and epidemiology of vascular dementia. *Clinical Science*, 131(11), 1059–1068. <https://doi.org/10.1042/CS20160607>
- Solari, N., & Hangya, B. (2018). Cholinergic modulation of spatial learning, memory and navigation. *European Journal of Neuroscience*, 48(5), 2199–2230. <https://doi.org/10.1111/ejn.14089>
- Song, L., Zhang, C., Wang, T., Liu, Z., Han, G., Yuan, D., & Zhao, H. (2017). Total flavonoids of *Epimedium attenuate* aging-related inflammation in rat brain by inhibiting MAPK/NF- κ B signaling pathway. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 33(1), 84–89.
- Soria Lopez, J. A., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 167, 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
- Spiegler, E., Kim, Y.-K., Hoyos, B., Narayanasamy, S., Jiang, H., Savio, N., Curley, R. W., Harrison, E. H., Hammerling, U., & Quadro, L. (2018). β -apo-10'-carotenoids support normal embryonic development during vitamin A deficiency. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14.

- Srivastava, S. (2017). The mitochondrial basis of aging and age-related disorders. *Genes*, 8(398). <https://doi.org/10.3390/genes8120398>
- Stallone, G., Infante, B., Prisciandaro, C., & Grandaliano, G. (2019). mTOR and Aging: An Old Fashioned Dress. *International Journal of Molecular Science*, 1, 1–17.
- Stevens, A. J., Rucklidge, J. J., Kennedy, M. A., Stevens, A. J., Rucklidge, J. J., Epigenetics, M. A. K., Stevens, A. J., Rucklidge, J. J., & Kennedy, M. A. (2018). *Epigenetics , nutrition and mental health . Is there a relationship ? 8305*. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1331524>
- Stranahan, A. M., Arumugam, T. V., Cutler, R. G., Lee, K., Egan, J. M., & Mattson, M. P. (2008). Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nature Neuroscience*, 11(3), 309–317.
- Suarez, W., & Sanchez, A. (2018). Índice De Masa Corporal Ventajas Y Desventajas. *Nutr Clin Med*, 12(3), 128–139. <https://doi.org/10.7400/NCM.2018.12.3.5067>
- Swahari, V., & West, A. E. (2019). Histone demethylases in neuronal differentiation, plasticity, and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 59, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.02.009>
- Takeda, T. (2009). Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochemical Research*, 34(4), 639–659.
- Tan, B. L., & Norhaizan, M. E. (2019). Effect of High-Fat Diets on Oxidative Stress, Cellular Inflammatory Response and Cognitive Function. *Nutrients*, 11(2579).
- Tang, Y., Bao, J. S., Su, J. H., & Huang, W. (2017). MicroRNA-139 modulates Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice by targeting cannabinoid

receptor type 2. *Genet. Mol. Res*, 16, 10–4238.

Thomazeau, A., Bosch, M., Essayan-Perez, S., Barnes, S. A., De Jesus-Cortes, H., & Bear, M. F. (2020). Dissociation of functional and structural plasticity of dendritic spines during NMDAR and mGluR-dependent long-term synaptic depression in wild-type and fragile X model mice. *Molecular Psychiatry*, 1–18.

Tian, B., & Liu, J. (2020). Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1392–1404. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10152>

Tiffon, C. (2018). The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *International Journal of Molecular Science*, 19(3425). <https://doi.org/10.3390/ijms19113425>

Toepper, M. (2017). Dissociating normal aging from Alzheimer's disease: A view from cognitive neuroscience. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(2), 331–352.

Torres, R. F., Kouro, R., & Kerr, B. (2019). Writers and Readers of DNA Methylation/Hydroxymethylation in Physiological Aging and Its Impact on Cognitive Function. *Neural Plasticity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5982625>

Turner, R. S., Thomas, R. G., Craft, S., Van Dyck, C. H., Mintzer, J., Reynolds, B. A., Brewer, J. B., Rissman, R. A., Raman, R., & Aisen, P. S. (2015). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology*, 85(16), 1383–1391. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002035>

Tuscher, J. J., & Day, J. J. (2019). Multigenerational epigenetic inheritance: One step forward, two generations back. *Neurobiology of Disease*, 132(July), 104591. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104591>

- Upadhyaya, B., Larsen, T., Barwari, S., Louwagie, E. J., Baack, M. L., & Dey, M. (2017). Prenatal exposure to a maternal high-fat diet affects histone modification of cardiometabolic genes in newborn rats. *Nutrients*, *9*(4), 407.
- Uysal, F., & Ozturk, S. (2020). The loss of global DNA methylation due to decreased DNMT expression in the postnatal mouse ovaries may associate with infertility emerging during ovarian aging. *Histochemistry and Cell Biology*, *154*, 301–314.
- Van Acker, Z. P., Bretou, M., & Annaert, W. (2019). Endo-lysosomal dysregulations and late-onset Alzheimer's disease: Impact of genetic risk factors. *Molecular Neurodegeneration*, *14*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0323-7>
- van Bodegom, M., Homberg, J. R., & Henckens, M. J. A. G. (2017). Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 87.
- Van Doorn, C., Macht, V. A., Grillo, C. A., & Reagan, L. P. (2017). Leptin resistance and hippocampal behavioral deficits. *Physiology and Behavior*, *176*, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.002>
- Vermunt, L., Sikkes, S. A. M., Van Den Hout, A., Handels, R., Bos, I., Van Der Flier, W. M., Kern, S., Ousset, P., Maruff, P., & Skoog, I. (2019). Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's & Dementia*, *15*(7), 888–898.
- Vinicius, M., De Mello, C., Vieira, L., Cruz de Souza, L., Gomes, K., & Carvalho, M. (2019). Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, *26*(33), 1–11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6507104/>
- Wahl, D., Solon-Biet, S. M., Cogger, V. C., Fontana, L., Simpson, S. J., Le Couteur, D. G.,

- & Ribeiro, R. V. (2019). Aging, lifestyle and dementia. *Neurobiology of Disease*, 130(May), 104481. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104481>
- Wang, N., He, J., Pan, C., Wang, J., Ma, M., Shi, X., & Xu, Z. (2019). Resveratrol activates autophagy via the AKT/mTOR signaling pathway to improve cognitive dysfunction in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 859.
- Wang, P., Gao, J., Ke, W., Wang, J., Li, D., Liu, R., Jia, Y., Wang, X., Chen, X., Chen, F., & Hu, X. (2020). Resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed mice via modulating the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Free Radical Biology and Medicine*, 156(17), 83–98. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.013>
- Wang, R., Zhang, Y., Li, J., & Zhang, C. (2017). Resveratrol ameliorates spatial learning memory impairment induced by A β 1–42 in rats. *Neuroscience*, 344, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.051>
- Wang, Y., Ma, Q., Ma, X., Zhang, Z., Liu, N., & Wang, M. (2017). Role of mammalian target of rapamycin signaling in autophagy and the neurodegenerative process using a senescence accelerated mouse-prone 8 model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(2), 1051–1057.
- Wheeler, S., & Sillence, D. J. (2020). Niemann–Pick type C disease: cellular pathology and pharmacotherapy. *Journal of Neurochemistry*, 153(6), 674–692. <https://doi.org/10.1111/jnc.14895>
- Widagdo, J., & Anggono, V. (2018). The m6A-epitranscriptomic signature in neurobiology: from neurodevelopment to brain plasticity. *Journal of Neurochemistry*, 147(2), 137–152. <https://doi.org/10.1111/jnc.14481>
- Winther, G., Elfving, B., Müller, H. K., Lund, S., & Wegener, G. (2018). Maternal high-fat diet programs offspring emotional behavior in adulthood. *Neuroscience*,

388, 87–101.

- Wu, F., Cheng, W., Zhao, F., Tang, M., Diao, Y., & Xu, R. (2019). Association of N6-methyladenosine with viruses and related diseases. *Virology Journal*, *16*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1236-3>
- Wu, S., Zhang, J., Li, F., Du, W., Zhou, X., Wan, M., Fan, Y., Xu, X., Zhou, X., & Zheng, L. (2019). One-carbon metabolism links nutrition intake to embryonic development via epigenetic mechanisms. *Stem Cells International*, *2019*.
- Wu, Z., Shi, Y., Lu, M., Song, M., Yu, Z., Wang, J., Wang, S., Ren, J., Yang, Y. G., Liu, G. H., Zhang, W., Ci, W., & Qu, J. (2020). METTL3 counteracts premature aging via m6A-dependent stabilization of MIS12 mRNA. *Nucleic Acids Research*, *48*(19), 11083–11096. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa816>
- Xiao, F. H., Wang, H. T., & Kong, Q. P. (2019). Dynamic DNA methylation during aging: A “prophet” of age-related outcomes. *Frontiers in Genetics*, *10*(feburay), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00107>
- Xiao, S., Song, L.-L., Li, J.-T., Wang, H., Yu, N., Wang, Z.-Q., Zhang, Y., He, J.-S., & Hung, T. (2020). Intraperitoneal Administration of Monoclonal Antibody Against Pathologic A β 42 Aggregates Alleviated Cognitive Deficits and Synaptic Lesions in APP/PS1 Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, *73*(2), 657–670.
- Xiong, J., Jiang, H. P., Peng, C. Y., Deng, Q. Y., Lan, M. D., Zeng, H., Zheng, F., Feng, Y. Q., & Yuan, B. F. (2015). DNA hydroxymethylation age of human blood determined by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/mass spectrometry. *Clinical Epigenetics*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0109-x>
- Yuen, E. Y., Wei, J., & Yan, Z. (2017). Molecular and epigenetic mechanisms for the complex effects of stress on synaptic physiology and cognitive functions. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *20*(11), 948–955.

- Zambrano, E. (2009). Mecanismos transgeneracionales en el desarrollo de enfermedades metabólicas. *Revista de Investigacion Clinica*, 61(1), 41–52.
- Zare Javid, A., Hormoznejad, R., Yousefimanesh, H. A., Zakerkish, M., Haghghi-zadeh, M. H., Dehghan, P., & Ravanbakhsh, M. (2017). The impact of resveratrol supplementation on blood glucose, insulin, insulin resistance, triglyceride, and periodontal markers in type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *Phytotherapy Research*, 31(1), 108–114.
- Zaw, J. J. T., Howe, P. R. C., & Wong, R. H. X. (2020). Sustained cerebrovascular and cognitive benefits of resveratrol in postmenopausal women. *Nutrients*, 12(3), 828.
- Zhang, T., Chen, D., & Lee, T. H. (2020). Phosphorylation signaling in APP processing in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010209>
- Zhang, X.-Y., Lou, M.-F., Shen, W., Fu, R.-S., & Wang, D.-H. (2017). A maternal low-fiber diet predisposes offspring to improved metabolic phenotypes in adulthood in an herbivorous rodent. *Physiological And Biochemical Zoology*, 90(1), 75–84.
- Zhao, Q., Tian, Z., Zhou, G., Niu, Q., Chen, J., Li, P., Dong, L., Xia, T., Zhang, S., & Wang, A. (2020). SIRT1-dependent mitochondrial biogenesis supports therapeutic effects of resveratrol against neurodevelopment damage by fluoride. *Theranostics*, 10(11), 4822.
- Zhou, Y., Zhu, H., Wu, H., Jin, L., Chen, B., Pang, H., Ming, Z., Cheng, Y., Zhou, C., & Guo, M. (2018). Diet-Induced Paternal Obesity Impairs Cognitive Function in Offspring by Mediating Epigenetic Modifications in Spermatozoa. *Obesity*, 26(11), 1749–1757.
- Zhu, Y., Liu, X., Ding, X., Wang, F., & Geng, X. (2019). Telomere and its role in the

aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology*, 20(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9769-1>

Zortea, K., Franco, V. C., Francesconi, L. P., Cereser, K. M. M., Lobato, M. I. R., & Belmonte-de-Abreu, P. S. (2016). Resveratrol supplementation in schizophrenia patients: a randomized clinical trial evaluating serum glucose and cardiovascular risk factors. *Nutrients*, 8(2), 73.

