



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Relació entre la ingesta de greix dietètic i malalties neurodegeneratives: anàlisi de marcadors de dany a nivell d'hipocamp a rates alimentades amb dietes riques en greix

Savina Abraham Pol

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 43196689K

Treball tutelat per Paula Oliver
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Dietes hiperlipídiques, alteracions cognitives, hipocamp, expressió gènica, MONW (metabolic-obese, normal-weight)

RESUM

Actualment, les alteracions cognitives lleus (MCI, “Mild Cognitive Impairment”), tenen una prevalença considerable a la nostra societat, que a més augmenta als grups d’avançada edat. Aquestes alteracions es caracteritzen per ser més lleus que les demències, ja que no incapaciten a qui les pateixen, però a la llarga poden agreujar-se (suposen un risc de patir demències greus com l’Alzheimer). L’etiologia d’aquests trastorns és molt variada. Una de les causes poden ser les dietes desequilibrades, com per exemple riques en greixos, o l’obesitat. Estudis amb animals han demostrat que la ingesta de dietes hiperlipídiques empitjora els resultats als tests de comportament. En quan als estudis a nivell molecular el camp no està gaire avançat, però se centra principalment en els efectes perjudicials d’aquestes dietes sobre l’hipocamp, ja que és una estructura cerebral essencial per a l’aprenentatge i cognició als mamífers. En aquest treball s’ha revisat l’estat actual del tema i s’han seleccionat una sèrie de gens claus per analitzar-ne l’expressió a nivell d’ARNm a l’hipocamp (a través de Q-PCR a temps real) de rates alimentades durant 4 mesos (des del segon mes de vida) amb una dieta hiperlipídica (HF) 45% en quantitats isocalòriques a una dieta control. Dels 7 gens seleccionats (*Arc*, *Nmdar1*, *Nrf2*, *SorL1*, *Tmcc2*, *Sirt1*, *Zpr1*), es va alterar la expressió de 4 (*SorL1* i *Zpr1* $p < 0,05$; *Nrf2* $p = 0,08$; *Tmcc2* $p = 0,14$; t-Student control vs HF) com a resultat de la ingesta de dieta HF. És important destacar que aquestes resultats es van obtenir sense que les rates desenvolupessin obesitat a causa de la dieta ni presentessin alteracions metabòliques molt aparents. Per tant, els resultats mostren que la ingesta de dietes riques en greixos, tot i no estar associades a l’increment de pes, constitueix un factor que pot contribuir a un risc incrementat de patir alteracions cognitives.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Alteracions cognitives, un problema de salut creixent	1
1.2. Hipocamp com a diana de les alteracions cognitives	
1.3. Dietes hiperlipídiques i alteracions a nivell d'hipocamp	3
1.4. Obesitat i alteracions cognitives a nivell d'hipocamp	
1.5. “Falsos delgados”, un problema de salut latent	4
2. OBJECTIUS	5
3. MATERIALS I MÈTODES	5
4. RESULTATS	8
5. DISCUSIÓ	12
6. CONCLUSIONS	15
7. REFERÈNCIES	16

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Alteracions cognitives: un problema de salut creixent

Actualment, les alteracions cognitives lleus (que es divideixen en diversos subgrups), també conegudes com MCI, de les sigles en anglès *Mild Cognitive Impairment*, tenen una prevalença considerable a la nostra societat. Per exemple, es calcula que a individus de més de 65 anys aquests trastorns afecten entre al 4 i 8% de la població (1). A més, el nombre d'afectats augmenta amb l'edat arribant al 15% a persones majors de 75 anys (2). Aquest tipus d'alteracions cognitives es defineixen com un estadi intermedi entre la normalitat i la demència, i es diagnostiquen en subjectes que tot i no presentar cap tipus de demència mostren un deteriorament cognitiu evident (mesurable objectivament mitjançant tests neuropsicològics) que no arriba a afectar de manera greu el desenvolupament normal de les tasques diàries – principal diferència diagnòstica amb la demència – però que és superior al que es consideraria normal per a la seva edat. Durant els darrers anys s'han fet diverses revisions sobre el tema, observant una important heterogeneïtat simptomàtica i etiològica, encara que una de les manifestacions clíniques més comuns és la pèrdua de memòria a curt termini (revisat a 3,4,5).

Multitud de causes poden desencadenar alteracions cognitives. Entre algunes trobem la ingesta de dietes desequilibrades, per exemple riques en greixos i carbohidrats refinats i pobres en altres nutrients (6); determinats hàbits de vida com dormir menys de 6 hores al dia (7); i algunes patologies com ara la diabetis (8), l'obesitat, i el sobrepès (9). Contràriament, s'ha observat un cert patró de protecció davant el declivi cognitiu per part de dietes equilibrades com per exemple la dieta Mediterrània (revisat a 10).

És important controlar la incidència d'aquestes alteracions cognitives a la població, ja que a la llarga suposen un augment del risc de patir demències greus com per exemple l'Alzheimer (2).

1.2. Hipocamp com a diana de les alteracions cognitives

Gran part de les teories actuals que intenten explicar els mecanismes que governen la memòria als mamífers coincideixen en postular que aquesta és emmagatzemada gràcies a un extens sistema que comprèn diverses àrees corticals en interacció. En aquest complex sistema destaca el paper central de l'hipocamp, àrea cerebral clau en l'adquisició de la memòria declarativa. La memòria declarativa, també coneguda com a memòria explícita, consisteix en el record de les experiències diàries, totes elles unides dins el marc del coneixement. Aquest tipus de memòria podria ser considerada com a una memòria a curt termini, encarregada d'emmagatzemar nova informació sobre situacions viscudes (memòria episòdica), així com informació semàntica o espacial, ja que tant les noves paraules com l'orientació a espais nous s'aprenen a través de l'experiència. Així, l'hipocamp, encara que no emmagatzemi la informació a llarg termini, gràcies a la seva interacció amb altres àrees corticals, tindria el paper de “porta” a través de la qual els nous coneixements adquirits passen a formar part de la memòria “real” – una memòria complexa que es compon a partir del conjunt de les experiències vitals (11-14).

El terme memòria declarativa és sinònim al concepte d'aprenentatge a través de l'experiència (15). Per tant, el paper de l'hipocamp també serà fonamental a l'aprenentatge, que es basa en l'adquisició de nous coneixements, l'emmagatzematge d'aquests, i la seva evocació de forma conscient en el futur pel tal de resoldre situacions noves mitjançant relacions i inferències entre records passats. Aquestes relacions entre distints records també tenen lloc a través de l'hipocamp. Així doncs, podem dir que l'hipocamp desenvolupa una funció principal en l'aprenentatge i la consolidació de la memòria a llarg termini, així com en l'establiment de relacions entre distints records per a la resolució de noves situacions (11).

Diversos estudis recolzen el paper de l'hipocamp a les funcions abans comentades. Per exemple, mitjançant l'observació de pacients amb amnèsia s'ha vist que si aquesta és provocada per danys al lòbul temporal (regió cerebral on es troba l'hipocamp) provoca déficits en la memòria declarativa, impedit l'aprenentatge de noves paraules, per exemple, però mantenint els records creats abans de la lesió. En canvi, si l'amnèsia és deguda a alteracions a altres regions cerebrals, els individus que la pateixen no poden recordar records passats, però mantenen la capacitat d'aprenentatge. Aquestes observacions relacionen l'hipocamp amb la memòria declarativa (aprenentatge o adquisició de coneixements a partir de noves situacions viscudes) (revisat a 11).

En resum, podem dir que l'hipocamp processa la informació a temps real i consolida la memòria, que després serà emmagatzemada a llarg termini a altres àrees cerebrals. Per això, és necessari que l'hipocamp estigui en contacte amb la resta del cervell, ja que necessita rebre estímuls sensorials per processar la informació de l'entorn i a la vegada ha d'enviar informació a altres regions cerebrals perquè pugui ser emmagatzemada a llarg termini. Les estructures cerebrals amb les quals manté el contacte l'hipocamp (situat al lòbul temporal) són els còrtex perirrinal i entorrinal, a través dels quals es dona un flux continu i bidireccional d'informació. Aquestes dues àrees són les que es troben més pròximes a l'hipocamp, situant-se just davall la fisura rinal del lòbul temporal. A la Figura 1A es pot observar una il·lustració del cervell d'una rata on s'indica la posició d'aquestes estructures.

L'hipocamp en si, està format per dues estructures principals, el gir dentat i el *Cornu Ammonis*. El gir dentat és una unitat anatòmica i funcional involucrada en el processament de la informació i consolidació de la memòria. El *Cornu Ammonis*, per una altra banda, està dividit en 4 subàrees: CA1, CA2, CA3, i CA4, de les quals CA1 i CA3 són les més grans. Les distintes regions CA del *Cornu Ammonis* estan formades en un 90% per neurones piramidals, que posseeixen axons glutamatèrgics projectats cap al còrtex entorrinal i altres estructures (via de sortida d'informació). A la Figura 1B podem observar un esquema de les parts de l'hipocamp de rata (15).

Totes aquestes funcions comentades es realitzen a través de la combinació de distints mecanismes com ara la plasticitat sinàptica o els canvis en l'expressió gènica format una complexa ret de senyals (14).

En relació a les alteracions cognitives, s'ha de comentar que l'hipocamp es troba en continua activitat durant molt processos diferents, per tant defectes en el seu funcionament poden causar patologies molt diverses, com per exemple esquizofrènia, epilèpsia, depressions, o trastorns bipolars (13).

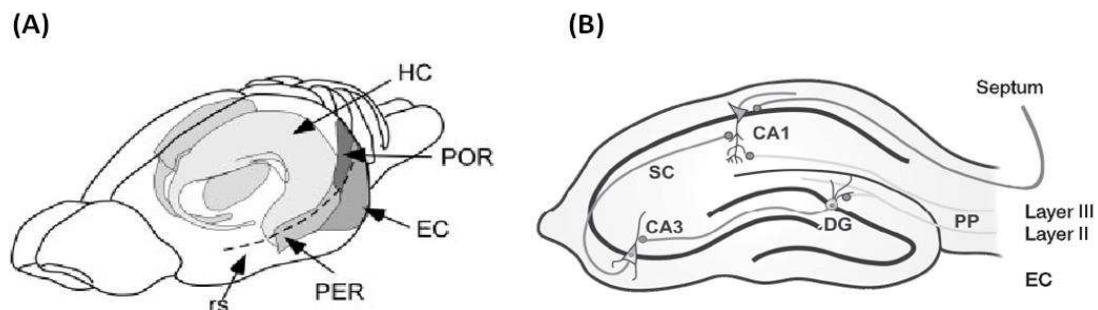


Figura 1. Representació esquemàtica del cervell (A) i l'hipocamp (B) de rata.

(A) Es mostra una visió lateral del cervell de rata on s'indica la posició de l'hipocamp (HC) i de les estructures adjacents (POR: postrinal còrtex; EC: entorrinal còrtex; PER: perirrinal còrtex; rs: fisura rinal). (Figura extreta de Furtak *et al*, (16)).

(B) Representació esquemàtica d'un tall transversal de l'hipocamp de rata on es mostren les seves parts principals. CA1 i CA3: parts del Cornu Ammonis on es representen les neurones piramidals; DG: gir dentat. (Figura extreta de Biel *et al* (17)).

És d'especial rellevància, però, la relació entre les alteracions a l'hipocamp i el risc de desenvolupar alteracions cognitives lleus o mitjanes (MCI) o fins i tot altres tipus de demència greus com l'Alzheimer (18), malaltia neurodegenerativa que es caracteritza per l'aparició de símptomes com ara la dificultat per adquirir i recordar nova informació, el declivi de les habilitats visuals i espacials, la disminució de l'habilitat per al llenguatge (parla, lectura i escriptura), i canvis en la personalitat o el comportament que no són deguts a desordres psíquics. Tot aquest conjunt de manifestacions interfereix significativament en el desenvolupament de les activitats diàries. Des del punt de vista molecular, aquesta patologia es caracteritza per l'acumulació de proteïna β -amiloide (A β) al cervell, formant les plaques amiloides; i per la hiperfosforil·lació de la proteïna Tau (τ) (19).

1.3. Dietes hiperlipídiques i alteracions cognitives a nivell d'hipocamp

A humans, encara que quasi no existeixen estudis, s'ha vist que podria existir una correlació entre el consum habitual d'una dieta rica en greixos saturats i el desenvolupament d'Alzheimer o altres formes mitjanes d'alteracions cognitives (20). Estudis realitzats amb rosegador alimentats amb aquests tipus de dietes han mostrat aquesta associació mitjançant la realització de tests de comportament i alguns estudis a nivell molecular, que demostren alteracions a funcions que depenen en major mesura de l'hipocamp així com en l'expressió de determinats gens o proteïnes dins aquest. Alguns exemples són els experiments de Greenwood *et al* (21,22), on es demostra una pitjor realització dels tests a ratolins alimentats amb dietes riques en greixos, sobretot quan la quantitat de greixos saturats és més elevada. Altres estudis com ara els de Kanoski *et al* (23) i Davidson *et al* (24) observen l'efecte de dietes que a més de ser riques en greixos tenen un elevat percentatge de sucres simples, la coneguda com a "Western Diet". En aquest cas, les alteracions cognitives són més evidents, i poden observar-se fins i tot a individus que no han desenvolupat obesitat (24). Intentant explicar la relació entre aquestes dietes riques en greixos i les alteracions cognitives a nivell molecular, en alguns estudis s'ha associat la ingesta de dietes hiperlipídiques amb un augment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica a la zona de l'hipocamp, causat per una baixa expressió de proteïnes encarregades d'establir unions estretes (23). Malgrat l'existència d'alguns estudis, però, aquest és un camp obert on encara queda molta feina per fer.

És important profunditzar en aquest tema, ja que la ingesta de greixos a la nostra societat és molt elevada, i ha seguit augmentant amb la moda de les dietes baixes en carbohidrats (i riques en greixos) com a mètode fàcil i ràpid per perdre pes (25). Per tant, els patrons alimentaris actuals podrien estar contribuint a la incidència d'alteracions cognitives de diversos graus de severitat.

1.4. Obesitat i alteracions cognitives a nivell d'hipocamp

Avui en dia, l'obesitat és un problema global que s'ha anat incrementant fins a arribar a afectar a una bona part de la població (26). Diversos estudis epidemiològics han relacionat l'obesitat i el sobrepès a edats mitjanes amb un major risc de desenvolupar demència (sobretot Alzheimer o Demència vascular) a la vellesa. Concretament, als estudis de Hassing *et al* (9) s'identifica el sobrepès com a factor de risc per a la demència, i a més, diferint amb estudis anteriors, s'observa el mateix patró per a homes i dones. L'estudi, però, té carències que els mateixos autors reconeixen, ja que l'adipositat o la mesura del diàmetre de la cintura serien millors indicadors del risc de desenvolupar algun tipus de demència en el futur que el pes corporal en sí. Una d'aquestes mesures – el diàmetre de la cintura, la trobem als treballs de Whitmer *et al* (27), on s'extreu la conclusió de que aquest paràmetre té major influència que l'IMC sobre el risc de desenvolupar demència. Aquest fet es podria deure a que el greix visceral és metabòlicament més actiu que el subcutani, i això podria provocar una major

influència en la producció d'adipoquines pro-inflamatòries i en la propensió a la resistència a la insulina (RI).

A nivell molecular, s'han suggerit diversos factors que podrien relacionar l'obesitat amb alteracions cognitives a l'hipocamp. El més destacat és la neuroinflamació, proposada a estudis com els de knight *et al* (28) o a la revisió de Miller *et al* (29) com a esdeveniment desencadenant de diverses alteracions a l'hipocamp que desembocaran en alteracions cognitives. La inflamació està associada a la obesitat, i a nivell cerebral podria provocar remodelació sinàptica, neurodegeneració i fins i tot estrès oxidatiu i apoptosi a l'hipocamp, donant lloc a resultats negatius en la funció cognitiva. Miller *et al* (29) descriuen un model on l'obesitat provocaria un augment en la circulació de citoquines pro-inflamatòries, triglicèrids i cèl·lules immunes, que juntament amb l'increment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica conduirien a la inflamació central. Un altre factor que podria ser d'importància en el deteriorament de la funció cognitiva, i en especial en el desenvolupament d'Alzheimer, podria ser la resistència central a insulina, ja que provoca un augment en els nivells circulants de glucosa, cosa que podria provocar una des-regulació de l'activitat de quinases i fosfatases de la proteïna Tau, hiperfosforil·lada als cervells de malalts d'Alzheimer (30).

1.5. “Falsos delgados”, un problema de salut latent

En relació amb el tema del sobrepès/obesitat i també amb les dietes desequilibrades, apareixen els “falsos delgados”, coneguts com a MONW (“metabolic-obese, normal-weight”) o TOFI (“thin-out, fat-inside”). Aquests individus són bastant comuns a la població general (entorn al 18% a l'any 2003) (31), i es caracteritzen per tenir un pes normal segons l'IMC (índex de massa corporal, Kg/m²) i estar prims externament a la vegada que presenten una important desregulació metabòlica i complicacions associades a l'obesitat com per exemple algunes característiques del síndrome metabòlic (obesitat central, hiperglucèmia, hipertensió, hipertriglicèridèmia, baixos nivells de colesterol HDL, esteatosi hepàtica, resistència a la insulina), així com major risc d'accidents cardiovasculars i inflamació sistèmica. Aquestes alteracions metabòliques solen ser causades per un elevat percentatge de greix en la composició corporal, que a més es localitza a l'abdomen (greix central o visceral). Una ingesta inadequada, com ara la de dietes riques en greixos, és un dels principals factors etiològics que poden conduir a persones amb normopès a desenvolupar aquests tipus d'alteracions a nivell metabòlic.

El diagnòstic a temps dels MONW és molt important, ja que el tractament basat en dietes adequades, exercici, i fàrmacs (en cas de ser necessaris) té un molt bon pronòstic a llarg termini, sempre que s'iniciï abans de que les alteracions metabòliques hagin esdevingut irreversibles. El problema és que aquest diagnòstic es dona en pocs casos, ja que el tipus d'alteracions que pateixen aquests individus no es manifesten simptomàticament fins que no arriben a un cert nivell de gravetat, i la falta d'indicis externs de risc d'alteracions metabòliques com ara l'obesitat o sobrepès provoca, en molt de casos, que no es realitzin les proves necessàries per a la detecció d'aquesta condició (revisat en 32-34).

Per tant, segons el que s'ha exposat en apartats anteriors sobre la relació que tenen les dietes hiperlipídiques i l'obesitat amb el desenvolupament d'alteracions cognitives, i l'existència d'estudis que també relacionen al síndrome metabòlic amb aquestes alteracions (revisat a 35), és lògic pensar que aquests individus podrien estar en risc de patir aquests problemes, encara que actualment no existeixen estudis sobre el tema.

2. OBJECTIUS

Actualment es troben pocs estudis on es relacioni la ingesta de dietes hiperlipídiques amb alteracions cognitives a nivell d'expressió gènica. A més, els pocs estudis que es troben a nivell molecular normalment fan referència a un o a pocs gens, per això es troba a faltar una visió integradora del tema. Per tant, l'objectiu d'aquest estudi és realitzar una revisió de l'estat actual del tema per a identificar gens clau que relacionin la ingesta de dietes riques en greixos amb alteracions cognitives a nivell d'hipocamp; dissenyar "primers" per a aquest conjunt de gens, i estudiar la seva expressió a l'hipocamp de rates alimentades amb una dieta hiperlipídica (45% de Kcal corresponents a greix) administrada de manera isocalòrica a una dieta control, per tal de no induir l'aparició d'obesitat.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Cerca bibliogràfica

Inicialment es va realitzar una cerca bibliogràfica per a identificar gens clau que poguessin resultar d'interès per a l'estudi de la relació entre la ingesta d'una dieta hiperlipídica i alteracions cognitives a nivell d'hipocamp. La selecció d'aquests gens d'interès es realitzà mitjançant recerca bibliogràfica a la base de dades PubMed, utilitzant les paraules clau "high fat diets", "brain disorders", "cognitive impairment", i "hippocampal gene expression" en distintes combinacions. S'escolliren articles originals on s'analitzava l'expressió de determinats gens a l'hipocamp de rates o ratolins alimentats amb dietes riques en lípids.

3.2. Disseny experimental

La determinació del grau d'expressió dels gens d'interès a nivell d'ARNm s'ha realitzat a partir de mostres d'hipocamp obtingudes de rates Wistar mascle (*Charles River Laboratories France*) establades a 22°C amb un període de llum/obscuritat de 12h. Les rates foren dividides en dos grups alimentats durant 4 mesos, des del segon mes de vida, amb dietes comercials amb distinta proporció de macronutrients administrades isocalòricament. Un primer grup, el control (C; n=6), s'alimentà amb una dieta normolipídica (*Ref# D12450B de Research Diets*) a la qual només un 10% de les Kcal ingerides provenien de lípids. D'aquests lípids, un 40% eren àcids grassos poliinsaturats, un 34,7% monoinsaturats, i un 25,1% saturats. La resta de calories s'obtenien a partir de carbohidrats (70%) i proteïnes (20%). El segon grup, en canvi, s'alimentà amb una dieta hiperlipídica (HF; n=5) (*Ref# D12451 de Research Diets*) a la qual aquest macronutrient suposava un 45% de les Kcal consumides, deixant només un 35% de la ingesta calòrica als carbohidrats i mantenint el 20% de calories aportades per proteïnes. Referent al perfil d'àcids grassos d'aquest segon grup, un 18,5% d'aquests eren poliinsaturats, un 45,3% monoinsaturats i el 36,3% eren saturats.

Els animals foren sacrificats als 6 mesos d'edat per decapitació i els teixits extrets varen ser conservats a -80°C per a evitar la degradació de l'ARN per acció d'ARNases.

Al present projecte es va treballar a partir de mostres d'hipocamp que ja havien estat recollides a partir d'aquests animals. A més, em subministraren dades sobre el pes corporal i l'adipositat, així com altres paràmetres fisiològics rellevants per a la interpretació dels resultats obtinguts.

3.3. Disseny de “primers” per als gens seleccionats

Per al disseny dels “primers” s’ha utilitzat el programa informàtic “PRIMER3 INPUT 4.0”. A aquest programa se li introdueix la seqüència d’ARNm del gen (extreta de la base de dades Nucleotide) perquè generi diverses seqüències de possibles “primers”. A continuació se n’ha de triar una parella que compleixi les següents condicions: han d’entrar dins un exó codificant (aquesta informació pot extreure’s de la base de dades Gene); la Tm (temperatura de fusió) dels dos “primers” ha de ser igual o molt semblant ($\pm 1^\circ\text{C}$); el percentatge de CG ha de ser menor o igual al 55%; i finalment la mida de l’amplicó (fragment del gen que serà amplificat) s’ha de trobar entre 120 i 130 pb aproximadament (de no ser possible ha de ser menor a 250 pb).

Una vegada es tenen les seqüències dels “primers” s’ha de comprovar que aquests són específics del gen que volem amplificar. A més, podem fixar-nos si també serveixen per a una espècie distinta a la seleccionada inicialment. Per això s’introdueixen les seqüències al programa “Nucleotide Blast” (indicant que són seqüències d’ARNm), al qual es pot accedir a través de PubMed. El “Nucleotide Blast” generarà una taula de resultats on podrem observar amb quins gens i de quines espècies s’adhereixen els nostres “primers”.

3.4. Aïllament d’ARN de mostres d’hipocamp

L’extracció d’ARN de les mostres d’hipocamp es realitza a partir d’homogenats obtinguts amb el lisat de tot el teixit dins 1 mL de Tripure (*Roche Diagnostics, Barcelona, España*). Aquest reactiu provoca la ruptura de les cèl·lules, i a la vegada desnatura les nucleases endògenes dels teixits, impedit que aquestes degradin l’ARN. Una vegada obtingut l’homogenat s’aconsegueix l’aïllament de l’ARN per mitjà de diverses centrifugacions amb diferents reactius. Primer, se separen les proteïnes mitjançant la precipitació d’aquestes amb cloroform. A continuació, l’ARN es precipita per incubació amb isopropanol. Finalment, el precipitat d’ARN es purifica per mitjà de la precipitació amb etanol 75%.

Per a impedir la degradació de l’ARN és important que tot el procediment sigui realitzat a 4°C i amb materials i reactius estèrils.

3.4.1. Quantificació de l’ARN

Es va quantificar espectrofotomètricament la concentració d’ARN de cada mostra mesurant l’absorbància a 260 nm. Les mesures d’absorbància es realitzaren amb l’espectrofotòmetre “NanoDrop ND-1000 spectrophotometer” (*NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA*), introduint-hi 2 μL de mostra. A part de l’absorbància a 260 nm, l’espectrofotòmetre proporciona els ratis $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ i $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{230}$, útils per a valorar la puresa de les mostres. El primer rati serveix per a detectar contaminació per proteïnes, i el segon contaminació per dissolvents orgànics. A totes les mostres els ratis foren els adequats.

Una vegada quantificades les mostres, es realitzaren dilucions per tal d’obtenir alíquotes amb una concentració de 50ng ARN/ μL .

3.4.2. Comprovació de l’estat de les mostres d’ARN

La correcta purificació de l’ARN i la seva integritat es comprovaren a través d’una electroforesi en gel d’agarosa 1% carregant 0,25 μg d’ARN per cada mostra. Si l’ARN ha estat correctament purificat i a més es troba en bon estat s’han d’observar dues bandes al gel, les corresponents a dos ARNs ribosòmics (ARNr 28S i ARNr 18S) que són molt abundants. A més, la banda d’ARNr 28S ha de tenir una intensitat major que la de l’ARNr 18S. Si l’ARN està parcialment degradat es veuria una banda difusa, i si està totalment degradat només podríem observar una petita banda de baix pes molecular. A la Figura 2 podem observar el gel amb els resultats de l’electroforesi. Aquests resultats són positius, ja que s’observen ben

definides les dues bandes esperades (a més la banda corresponent a l'ARNr 28S és més intensa).

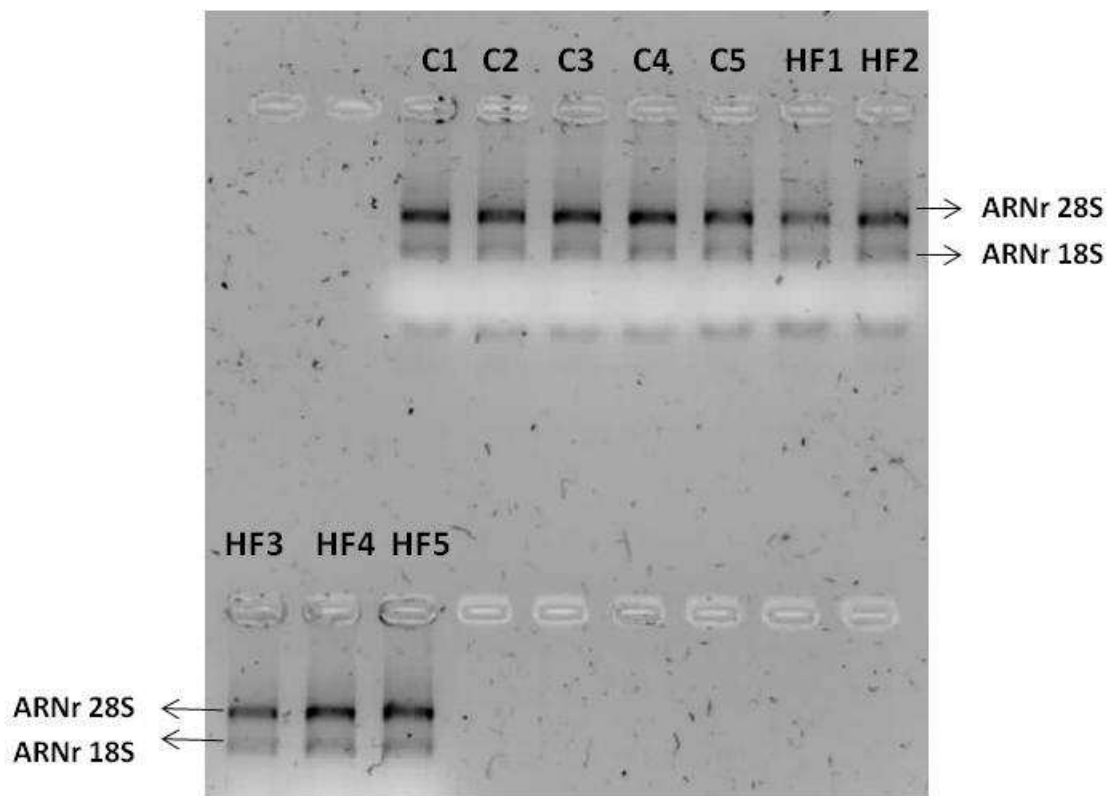


Figura 2. Electroforesi en gel d'agarosa 1% de les mostres d'ARN aïllat. Es poden observar les bandes d'ARNr 28S i 18S.

3.5. Elecció del gen constitutiu

Per a comparar l'expressió gènica a nivell d'ARNm dels distints grups experimentals, és necessari corregir els resultats obtinguts a la Q-PCR referint-se a l'expressió d'un gen constitutiu. Un gen constitutiu és aquell que no varia els seus nivells d'expressió a causa del tractament seguit. Per tant, si corregim els resultats de l'expressió gènica amb els resultats obtinguts per al gen de referència minimitzarem la variabilitat dels resultats deguda al procés experimental.

Es realitzaren Q-PCR amb distints gens constitutius amb l'objectiu de seleccionar el més adequat. Els gens que s'analitzaren foren *β-actina*, *ARNr 18S*, i *Gapdh*, gens amplament utilitzats com a constitutius (36). A part, es va provar el gen *Rplp0*, la utilització del qual també s'ha estès darrerament (37). Finalment es va optar per utilitzar el gen *Rplp0* com a constitutiu, ja que va ser el que menor variació va donar entre els distints grups experimentals.

3.6. Determinació de l'expressió gènica per Q-PCR

3.6.1. Retrotranscripció

Mitjançant la tècnica de la retrotranscripció (RT), l'ARN aïllat es transcriu inversament a ADN complementari (ADNc) per l'acció de la transcriptasa inversa MuLV RT (murine leucèmia virus reverse transcriptase; *Applied Biosystems, Madrid, España*). La reacció es realitzà al termociclador "Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler" (*Applied Biosystems, Madrid, España*).

3.6.3. Q-PCR a temps real (*real time quantitative polymerase chain reaction*)

Per a quantificar l'expressió dels distints gens, s'amplificà mitjançant Q-PCR a temps real (reacció en cadena de la polimerasa quantitativa) l'ADNc obtingut a la retrotranscripció. La reacció de la Q-PCR es va realitzar amb l'aparell "Applied Biosystem StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems" (*Applied Biosystem, Madrid, España*). En aquesta tècnica es mesura la quantitat d'ADN contínuament, enregistrant el temps en què es detecta per primera vegada el producte amplificat (moment en el qual la fluorescència supera el *background* i comença l'amplificació exponencial de l'ADN). Aquest punt s'expressa mitjançant el valor Ct ("cycle number"), que és calculat amb el software "Step One Software 2.0". Per a la detecció de l'ADN aquest ha d'estar marcat, i en aquest cas hem utilitzat el fluoròfor inespecífic SYBR Green, que quan s'intercala entre les bases de l'ADN emet fluorescència. Com més gran sigui el nombre de còpies inicials, abans començarà l'amplificació exponencial de l'ADN, i menor serà el Ct. Per tant, el valor Ct està inversament relacionat amb els nivells d'expressió gènica. Finalment, l'expressió gènica relativa es calcula en funció del gen de referència o gen constitutiu (*Rplp0*), i mitjançant el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (38) és expressada en percentatge respecte al grup control (l'expressió del qual es considera el 100%).

3.7. Anàlisi estadístic

Les dades obtingudes s'analitzaren amb el programa estadístic "IBM SPSS Statistics 21.Ink" per a Windows (*SPSS, Chicago, IL, USA*). Tots els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM (error estàndard de la mitjana). Les diferències entre els resultats obtinguts per als distints grups experimentals (Control i HF45% isocalòrics) es van analitzar mitjançant l'estadístic t-Student per a mostres independents. Es considera que existeixen diferències significatives quan $p < 0,05$ a no ser que s'especifiqui el contrari.

4. RESULTATS

4.1. Selecció dels gens d'interès

Es va trobar un nombre reduït d'estudis on s'hagués analitzat l'efecte de dietes hiperlipídiques administrades a rates o ratolins adults sobre l'expressió gènica a nivell d'ARNm a l'hipocamp. Per tant, tots els gens que havien mostrat una expressió alterada a aquests estudis foren seleccionats. Aquests gens són: *Arc* (39), *Nmdar1* (39), *Nrf2* (40), *Sirt1* (41), i *Zpr1* (42). Addicionalment, es varen incloure a l'estudi 2 gens relacionats amb alteracions cerebrals (*Sorl1*, *Tmcc2*) que es varen trobar alterats a un anàlisi de "microarray" dut a terme anteriorment pel grup de recerca del Laboratori de Biologia Molecular, Nutrició i Biotecnologia (LBNB) de la Universitat de les Illes Balears (UIB) en rates alimentades amb dietes hiperlipídiques (60% de Kcal corresponents a lípids). Els gens seleccionats codifiquen per a proteïnes que participen a processos que de no donar-se de manera adequada poden interferir en el funcionament de l'hipocamp, com ara la protecció oxidativa. En l'apartat de discussió es comentaran en detall les funcions de tots els gens estudiats.

4.2. Paràmetres corporals i fisiològics dels subjectes experimentals

En aquest apartat es presenten distintes dades dels subjectes experimentals, que encara que no fossin recollides ni analitzades per mi, són exposades aquí degut a la seva rellevància a l'hora de valorar els efectes produïts sobre el metabolisme per la dieta HF. Podem observar que l'alimentació amb aquesta dieta rica en greixos (45% de les Kcal consumides) administrada de manera isocalòrica a la dieta control no produeix un increment del pes corporal total

(Figura 3A) ni del percentatge de massa grassa significatius (Figura 3B). En canvi, com es pot observar a la Figura 4A, els nivells de glucosa sèrica sí que es veuen augmentats significativament a les rates que han estat tractades amb la dieta HF des del primer mes d'administració de la dieta, mentre que no es va produir cap canvi als nivells d'insulina circulant (Figura 4B). Referent a l'HOMA-Index, un indicador de la resistència a insulina, tampoc es veuen diferències significatives entre els dos grups experimentals (Figura 4C). Finalment, el contingut greixós (en forma de triglicèrids) del fetge augmentà significativament a les rates alimentades amb la dieta HF (Figura 5), signe d'esteatosi hepàtica. En tots els casos, les diferències entre ambdós grups experimentals es calcularen mitjançant l'estadístic t-Student (control vs HF) amb una significància del 95% ($p < 0,05$).

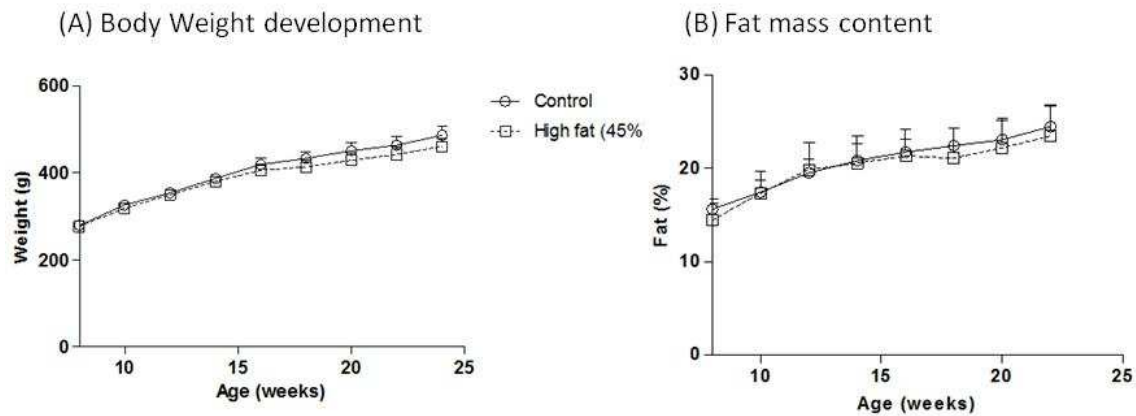


Figura 3. Evolució de (A) el pes corporal en grams i (B) del contingut de massa grassa en percentatge dels grups experimentals Control i HF(45%). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM (t-Student control vs HF, * $p < 0,05$).

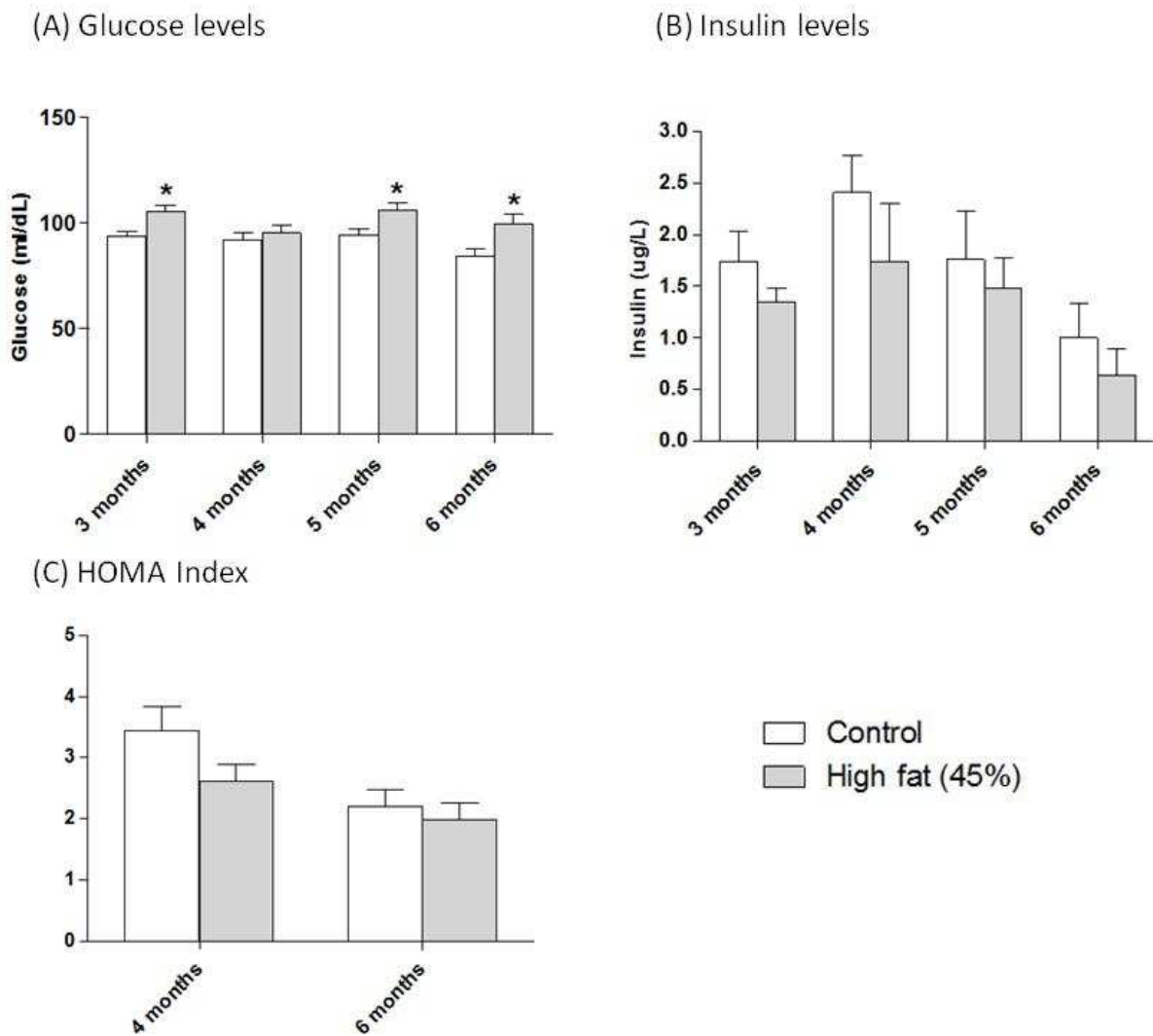


Figura 4. Nivells circulants de (A) glucosa i (B) insulina; i (C) HOMA-Index dels grups experimentals Control i HF(45%) a distints moments de l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM (t-Student control vs HF, * $p < 0,05$).

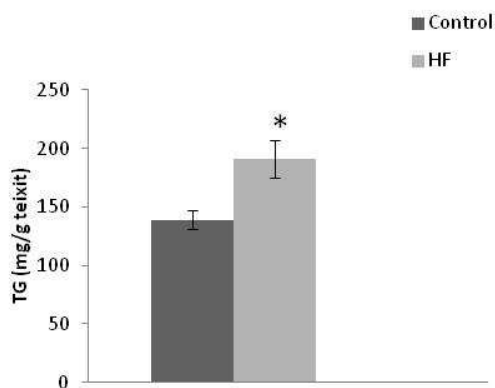


Figura 5. Nivells de triglicèrids hepàtics (mg TG/g teixit) dels grups experimentals Control i HF(45%) una vegada finalitzat l'estudi. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM (t-Student control vs HF, * $p < 0,05$).

4.3. “Primers dissenyats”

La seqüència dels “primers” dissenyats i utilitzats en aquest estudi i la mida del seu producte gènic (amplicó) es mostren a la taula 1.

Taula 1. Seqüència dels “primers” utilitzats a la Q-PCR i mida de l’amplicó en pb.

Gen	Seq. “Primer Forward “(5’ – 3’)	“Seq. Primer Reverse” (3’ – 5’)	Mida Amplicó (pb)
<i>Arc</i>	TTACCAGCGAGTCAGTAGCC	GGTTGTGTGGCAGTTGTGA	200
<i>Nmdar1</i>	ACTCCCAACGACCACTTCAC	TCGCATCATCTCAAACCAGA	180
<i>Nrf2</i>	CAGAGCAAGTGACGAGATGG	CCGAAATGTTGAGTGTGGTG	177
<i>Sorl1</i>	CACCGTCTCATTGTCAGCAC	ATCTCGTAGCCCCTGGTTTTTC	149
<i>Tmcc2</i>	TCCTCCTCTACCACCGATACC	CTCCCTTGTACCCTTGTCC	170
<i>Zpr1</i>	GGATTACCCTCCACATCACAG	TGTCTTTCAGCAGTCCTTCG	153
<i>Rplp0</i> (gen constitutiu)	GCAGCATCTACAGCCCAGAG	TCGCATCATCTCAAACCAGA	213

Per a cada parella de “primers” es va comprovar que únicament s’amplificava un producte i que aquest corresponia a la mida esperada.

4.4. Canvis en l’expressió gènica a nivell d’hipocamp

Els resultats de la determinació per Q-PCR a temps real del grau d’expressió a nivell d’ARNm dels distints gens seleccionats per a la realització de l’estudi (*Arc*, *Nmdar1*, *Nrf2*, *Tmcc2*, *Sorl1*, i *Zpr1*) es presenten agrupats a la Figura 6 en ordre alfabètic. L’expressió gènica s’indica considerant que al grup control és el 100% i referint l’expressió del grup HF(45%) a la del control. Els resultats mostren una disminució significativa de l’expressió dels gens *Sorl1* i *Zpr1* (t-Student control vs HF, $p < 0,05$) com a resultat de l’alimentació amb la dieta HF(45%), mentre que per als gens *Arc* i *Nmdar1* no s’observa variació en els nivells d’expressió.

Per als gens *Nrf2* i *Tmcc2*, encara que el *p* valor sigui major que 0,05 (t-Student control vs HF; $p = 0,08$ i $p = 0,14$ respectivament) i no es puguin considerar diferències estrictament significatives s’observa una tendència a la disminució dels nivells d’ARNm com a resultat de l’alimentació amb la dieta HF(45%). A més, cal destacar que per a aquests gens la resposta a la dieta va variar molt entre individus, ja que per als dos gens hi ha dos individus on clarament s’ha donat una disminució important en l’expressió, mentre que als altres subjectes no s’ha observat resposta. Degut a aquesta variació entre individus la mitjana s’acosta més a la del grup control i augmenta el *p* valor. A la Taula 2 es mostren els valors numèrics de l’expressió gènica dels individus del grup HF(45%) (Nota: les dades de l’individu 2 del grup HF(45%) varen ser descartades, ja que es consideraren un cas atípic o “outlier”).

Els resultats obtinguts per al gen *Sirt1* no es mostren, ja que no es va detectar expressió a cap dels dos grups experimentals.

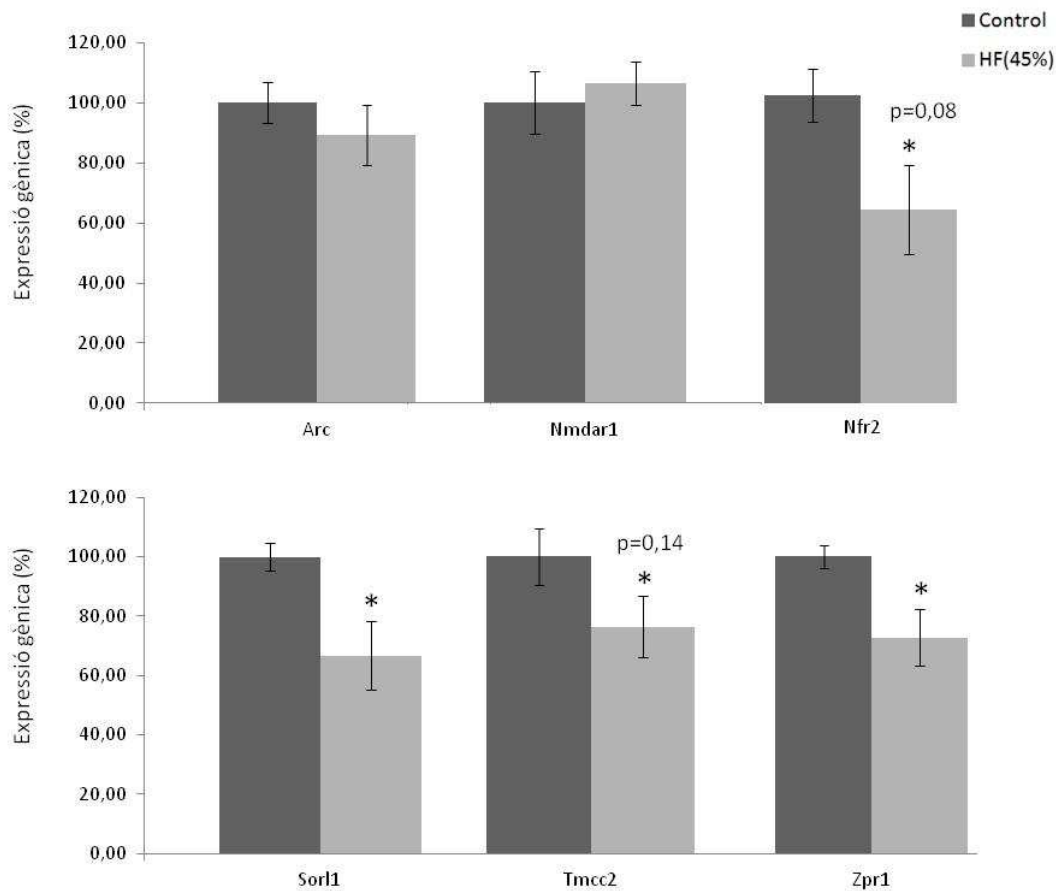


Figura 6. Grau d'expressió de distints gens a nivell d'ARN missatger a l'hipocamp dels grups experimentals Control i HF(45%). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM (t-Student control vs HF, * $p < 0,05$ a no ser que s'indiqui el contrari). El nivell d'expressió gènica del grup HF s'expressa com a percentatge respecte de la mitjana del grup control, que està referida al 100%.

Expressió gènica (%)		
Grup HF(45%)	<i>Nrf2</i>	<i>Tmcc2</i>
1	42,29	57,68
3	34,56	91,00
4	93,12	97,41
5	82,23	59,26

Taula 2. Nivells d'expressió gènica de *Nrf2* i *Tmcc2* a l'hipocamp dels individus del grup experimental HF(45%). El nivell d'expressió de cada individu s'ha de tenir en compte en comparació amb la mitjana del grup control, que està referida a 100% per a tots els gens. Els resultats amb una variació considerable apareixen destacats en vermell.

5. DISCUSIÓ

5.1. Paràmetres corporals i fisiològics dels subjectes experimentals

Tal com s'esperava ad administrar la dieta hiperlipídica en condicions isocalòriques respecte a una dieta control, les rates de l'estudi no desenvoluparen obesitat, sinó que aquestes es mantingueren dins els intervals de normopès. A més, l'alimentació a llarg termini (4 mesos) amb una dieta HF on el 45% de les calories ingerides corresponien a lípids tampoc va produir

un canvi significatiu en el percentatge de massa grassa. L'índex HOMA (indicador de resistència a insulina) i els nivells sèrics d'insulina tampoc reflectiren canvis significatius. En canvi, sí que es va produir un augment notable en els nivells de glucosa circulants i la quantitat relativa de triglicèrids hepàtics (mg Tg/g fetge), que mostra un principi d'esteatosi o fetge gras. Aquestes dues darreres característiques són pròpies del síndrome metabòlic. Per tant, podem classificar els subjectes del grup experimental HF com a individus MONW, ja que malgrat no experimentar augment de pes mostren signes de síndrome metabòlic relacionats amb la ingesta de una dieta desequilibrada, rica en greix (31-34).

5.2. Canvis en l'expressió gènica a nivell d'hipocamp

Al present estudi hem pogut comprovar que l'administració d'una dieta hiperlipídica (45% de les Kcal en forma de lípids) en quantitats isocalòriques a la dieta control provoca una disminució significativa de l'expressió gènica a nivell d'ARNm a l'hipocamp per als gens *Sor11* i *Zpr1*. Per una altra banda, per als gens *Nrf2* i *Tmcc2* s'observen distints patrons de resposta entre els subjectes experimentals que resulten en una tendència quasi significativa cap a la disminució de la seva expressió. Finalment, l'expressió gènica de *Arc*, *Nmdar1*, i *Sirt1* no s'ha vist alterada per la dieta. A continuació s'exposa breument la funció d'aquests gens i les implicacions que podria tenir la disminució de la seva expressió sobre les alteracions cognitives a nivell d'hipocamp.

- *Sor11*

La proteïna SorL1 ("sortilin-related receptor gene"), també coneguda com SorLA ("Sorting-related receptor with A-type repeats") o LR11 ("LDL receptor relative with 11 ligand-binding repeats"), està involucrada en el tràfic intracel·lular de la proteïna precursora β -amiloide (APP). Per tant, quan l'expressió de *Sor11* es veu disminuïda hi ha una acumulació de la proteïna β -amiloide que resulta tòxica per a les neurones. L'acumulació de proteïna β -amiloide és una de les característiques principals dels cervells dels malalts d'Alzheimer, i a més, s'ha vist una disminució en l'expressió de SorL1 al cervell d'aquests pacients, per tant podríem considerar-ho un marcador d'alteracions cognitives (43,44).

Al nostre estudi veiem una disminució significativa de l'expressió de *Sor11* al grup HF(45%). Per tant, es demostra que una dieta hiperlipídica pot provocar en rates alteracions a nivell d'expressió gènica a l'hipocamp que són indicatives d'alteracions cognitives, fins i tot abans de l'aparició de símptomes més evidents d'un mal estat nutricional com podrien ser l'obesitat o la resistència a insulina.

- *Zpr1*

ZPR1 ("Zinc Finger Protein ZPR1") és una proteïna amb motius estructurals de dits de zinc imprescindible per a la proliferació i la viabilitat cel·lular. En diversos estudis s'ha comprovat que ZPR1 es troba al citoplasma durant les fases G₁ i G₂/M del cicle cel·lular, i que durant la fase S, com a conseqüència de l'estimulació de la proliferació cel·lular per mitògens, es localitza al nucli (45,46). Probablement la seva funció al nucli sigui la de regular la localització subnuclear de diverses proteïnes necessàries per a la proliferació cel·lular com ara el factor de transcripció d'histones o altres proteïnes implicades en la síntesi d'ADN (46).

La falta parcial d'aquest gen té implicacions a malalties neurodegeneratives motores com per exemple l'atròfia muscular espinal, on s'ha vist que una baixa expressió de *Zpr1* provoca defectes en la mielina i disrupció dels microtúbuls axonals (conjuntament amb l'acumulació de Tau hiperfosforil·lada), que resulten en la pèrdua progressiva de neurones motores (47).

Per tant, la disminució en l'expressió de *Zpr1* causada per la dieta HF que s'observa en aquest estudi podria resultar en una disminució de la proliferació cel·lular a l'hipocamp, que a la llarga es podria traduir en neurodegeneració.

- *Nrf2*

L'expressió del gen *Nrf2* ("NF E2-related factor 2") és fonamental per a la protecció davant l'estrès oxidatiu, ja que és el principal factor de transcripció (FT) que activa l'element regulatori *cis* ARE ("Antioxidant Response Element"), que controla l'expressió d'enzims de detoxificació de fase II (per exemple la síntesi i metabolisme de l'enzim glutatió reductasa entre d'altres) (48-50).

La protecció davant l'estrès oxidatiu juga un paper molt important al cervell, on el consum d'O₂, i per tant la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), són molt elevats. Per tant, és important una correcta activació de la via Nrf2-ARE en cas de ser necessari. Tanta és la importància d'aquest sistema que s'ha observat una disminució de la seva activitat a individus afectats per malalties neurodegeneratives com per exemple l'Alzheimer o el Parkinson, per això es pensa en la sobre-expressió d'aquest gen com a diana terapèutica per a aquests tipus de trastorns (49).

En condicions d'homeostàsia, el factor de transcripció NRF2 es troba segregat al citoplasma mitjançant la interacció amb la proteïna Keap1, que provoca la seva ubiquitinació i degradació al proteasoma 26S. Així, aquest FT no pot entrar al nucli per unir-se i activar el seu element *cis* de resposta (ARE). Davant la presència d'estímuls estressors (per exemple ROS o productes d'oxidació de lípids) es produeix un canvi conformacional de la proteïna Keap1 i/o es fosforil·la la Ser40 de NRF2, provocant l'alliberació de l'FT, que serà translocat al nucli on s'unirà a l'element ARE activant l'expressió d'enzims de detoxificació (revisat a 48-50). L'increment d'insulina com a resposta a la ingesta també activa l'entrada de NRF2 al nucli a través de la inhibició d'un inhibidor (GSK-3β)(48).

En aquest estudi s'ha observat una disminució significativa en l'expressió del gen *Nrf2* com a resultat de l'administració de la dieta HF(45%), resultat que segons la informació acabada de donar recolzaria la hipòtesi d'una alteració cognitiva, en aquest cas deguda a l'estrès oxidatiu provocat a les cèl·lules de l'hipocamp. Els resultats coincideixen amb els estudis de Morrison *et al* (40), on una dieta hiperlipídica (60% greix) administrada a ratolins joves i que incrementa el pes corporal, produeix una disminució de l'expressió de *Nrf2* a la vegada que empitjora els resultats obtinguts als tests de memòria o comportament.

- *Tmcc2*

TMCC2 ("Transmembrane and coiled-coil domain family 2") és una proteïna present al reticle endoplasmàtic que interacciona amb les proteïnes apoE i APP (proteïna precursora β-amiloide), i que s'expressa amplament a neurones (51). S'ha observat que aquesta proteïna podria tenir una possible contribució al metabolisme β-amiloide anormal característic de la malaltia d'Alzheimer. S'ha de tenir en compte però, que aquests estudis s'han fet en relació a variants de les proteïnes apoE i APP que han estat identificades anteriorment com a factors de risc de patir Alzheimer (52). Però a més, s'ha observat que la interrupció en la funció de TMCC2 es relaciona amb neurodegeneració (52), mentre que l'expressió ectòpica d'un ortòleg de TMCC2 a *Drosophila*, conegut com Dementina, permet revertir els efectes causats per l'expressió de precursors de la proteïna amiloide humana (51).

Al nostre estudi, s'observa una disminució de l'expressió de *Tmcc2* a l'hipocamp, la qual cosa segons el comentat anteriorment, podria suposar un major risc de patir alteracions cognitives.

- *Arc, Nmdar1 i Sirt1*

L'expressió d'aquests tres gens disminuïa com a conseqüència de la ingesta de dietes hiperlipídiques als estudis escollits durant la selecció de gens d'interès (39,41). Al present

estudi, en canvi, no s'han vist canvis en el seu nivell d'expressió en hipocamp en rates MONW com a resultat de la intervenció nutricional realitzada.

Els gens *Arc* ("Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein") i *Nmdar1* (subunitat 1 del receptor de glutamat N-metil D-aspartat) són indicadors d'activitat i plasticitat sinàptica durant l'aprenentatge respectivament (53,54). La sirtuina 1 (SIRT1), en canvi, és una proteïna protectora davant les alteracions cognitives produïdes a l'hipocamp com a resultat de la resistència cerebral a la insulina (55). Per tant, una disminució en l'expressió d'aquests gens podria ser indicadora d'alteracions cognitives.

6. CONCLUSIONS

Els resultats de l'estudi mostren que, a rates, l'administració crònica d'una dieta rica en greixos en quantitats isocalòriques a una dieta control té uns efectes sobre l'expressió gènica a l'hipocamp que s'han relacionat amb alteracions cognitives. Dels gens estudiats, aquells relacionats amb l'activitat neuronal com *Arc* i *Nmdar1* no s'han vist afectats, mentre que s'ha observat una disminució significativa a gens que juguen papers importants en la protecció front a l'estrès oxidatiu o la proliferació cel·lular, com són *Nrf2* i *Zpr1*, respectivament. Això indica que l'efecte perjudicial que tenen les dietes hiperlipídiques sobre la funció cognitiva (comprovat a diversos estudis de comportament: 21,22) podria estar explicat a nivell molecular pel dany cel·lular provocat via estrès oxidatiu i/o per la disminució en la capacitat cel·lular de proliferació més que per la disminució de l'activitat dels sistemes sinàptics. Per una altra part, també s'ha d'assenyalar la disminució en l'expressió de la *SorL1* i *Tmcc2*, fet que es pot considerar com un marcador de risc d'alteracions cognitives (43,44,51).

Un punt important a destacar, degut a la falta d'estudis en aquest camp en concret, és que les rates no havien desenvolupat obesitat ni adipositat incrementada com a resposta a la dieta, encara que tenien algun paràmetre indicador de síndrome metabòlic (nivells elevats de glucosa sèrica i triglicèrids hepàtics). Així, poden ser considerades un model de MONW que prova que les alteracions a l'hipocamp a nivell molecular degudes a dietes hiperlipídiques tenen lloc abans de l'aparició de símptomes clars de mala alimentació com per exemple augment de pes, indicant que una part de la societat podria tenir risc de sofrir alteracions cognitives sense possibilitat de saber-ho i controlar la dieta degut a la difícil detecció d'aquests individus.

Finalment, remarcar que a les múltiples alteracions metabòliques que han estat tradicionalment associades a la ingesta de dietes riques en greixos (com resistència a la insulina, hipercolesterolèmia, hipertensió i fetge gras) es sumen també les alteracions cognitives. Aquesta situació és especialment preocupant degut a que la ingesta de greix està augmentant a les societats desenvolupades. El resultat d'aquest treball posen de manifest que un increment en la ingesta de greixos, podria anar associat a un major risc de patir alteracions cognitives encara en absència d'adipositat incrementada.

7. REFERÈNCIES

1. Lopez-Anton R, Santabàrbara J, De-la-Cámara C, Gracia-García P, Lobo E, Marcos G, Pirez G, Saz P, Haro JM, Rodríguez-Mañas L, Modrego PJ, Dewey ME, Lobo A. Mild cognitive impairment diagnosed with the new DSM-5 criteria: prevalence and associations with non-cognitive psychopathology *Acta Psychiatr Scand*. 2014 Jun 4. doi: 10.1111/acps.12297.
2. Busse A, Bischof J, Riedel-Heller SG, Angermeyer MC. Subclassifications for mild cognitive impairment: Prevalence and predictive validity *Psychol Med*. 2003;33(6):1029-1038.
3. Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, et al. Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: Report of the international working group on mild cognitive impairment *J Intern Med*. 2004;256(3):240-246.
4. Portet F, Ousset PJ, Visser PJ, et al. Mild cognitive impairment (MCI) in medical practice: A critical review of the concept and new diagnostic procedure. report of the MCI working group of the european consortium on alzheimer's disease *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(6):714-718.
5. Petersen RC, Caracciolo B, Brayne C, Gauthier S, Jelic V, Fratiglioni L. Mild cognitive impairment: A concept in evolution *J Intern Med*. 2014;275(3):214-228.
6. Kim J, Yu A, Choi BY, Nam JH, Kim MK, Oh DH, Kim K, Yang YJ. Dietary patterns and cognitive function in Korean older adults *Eur J Nutr*. 2014 May 20
7. Moreno-Royo L, Climent MT, Vilaplana AM, Arnedo A, Vilar J. Life styles associated cognitive impairment. Study from the community pharmacy *Rev Invest Clin*. 2013 Nov-Dec;65(6):500-9.
8. Roberts RO, Knopman DS, Przybelski SA, et al. Association of type 2 diabetes with brain atrophy and cognitive impairment *Neurology*. 2014;82(13):1132-1141.
9. Hassing LB, Dahl AK, Thorvaldsson V, et al. Overweight in midlife and risk of dementia: A 40-year follow-up study *Int J Obes (Lond)*. 2009;33(8):893-898.
10. Kuczmarski MF, Allegro D, Stave E. The association of healthful diets and cognitive function: a review *J Nutr Gerontol Geriatr*. 2014;33(2):69-90.
11. Eichenbaum H. The hippocampus and declarative memory: Cognitive mechanisms and neural codes *Behav Brain Res*. 2001;127(1-2):199-207.
12. Eichenbaum H. Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory *Neuron*. 2004;44(1):109-120.
13. Wible CG. Hippocampal Physiology, Structure and Function and the Neuroscience of Schizophrenia: A Unified Account of Declarative Memory Deficits, Working Memory Deficits and Schizophrenic Symptoms. *Behav. Sci*. 2013,3,298-315.
14. Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR. The molecular and systems biology of memory *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):163-86.
15. Sweatt JD. Mechanisms of Memory *Elsevier* 2003 (USA).
16. Furtak SC, Wei SM, Agster KL, Burwell RD. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: The perirhinal and postrhinal cortices *Hippocampus*. 2007;17(9):709-722.

17. Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: From genes to function *Physiol Rev*. 2009;89(3):847-885.
18. Gron G, Brandenburg I, Wunderlich AP, Riepe MW. Inhibition of hippocampal function in mild cognitive impairment: Targeting the cholinergic hypothesis *Neurobiol Aging*. 2006;27(1):78-87.
19. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to alzheimer's disease: Recommendations from the national institute on aging-alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for alzheimer's disease *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):263-269.
20. Solfrizzi V, Panza F, Frisardi V, et al. Diet and alzheimer's disease risk factors or prevention: The current evidence *Expert Rev Neurother*. 2011;11(5):677-708.
21. Greenwood CE, Winocur G. Learning and memory impairment in rats fed a high saturated fat diet *Behav Neural Biol*. 1990;53(1):74-87.
22. Greenwood CE, Winocur G. Cognitive impairment in rats fed high-fat diets: A specific effect of saturated fatty-acid intake *Behav Neurosci*. 1996;110(3):451-459.
23. Kanoski SE, Zhang Y, Zheng W, Davidson TL. The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat *J Alzheimers Dis*. 2010;21(1):207-219.
24. Davidson TL, Hargrave SL, Swithers SE, et al. Inter-relationships among diet, obesity and hippocampal-dependent cognitive function *Neuroscience*. 2013;253:110-122.
25. Brinkworth GD, Noakes M, Clifton PM, Bird AR. Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations *Br J Nutr*. 2009;101(10):1493-1502.
26. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 *Lancet*. 2014 May 28. pii: S0140-6736(14)60460-8.
27. Whitmer RA, Gustafson DR, Barrett-Connor E, Haan MN, Gunderson EP, Yaffe K. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later *Neurology*. 2008;71(14):1057-1064.
28. Knight EM, Martins IV, Gümüşgöz S, Allan SM, Lawrence CB. High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology *Neurobiol Aging*. 2014 Aug;35(8):1821-32.
29. Miller AA, Spencer SJ. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment *Brain Behav Immun*. 2014 Apr 12. pii: S0889-1591(14)00088-9.
30. Peng D, Pan X, Cui J, Ren Y, Zhang J. Hyperphosphorylation of tau protein in hippocampus of central insulin-resistant rats is associated with cognitive impairment *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(5):1417-25.
31. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome *Hepatology*. 2003;37(4):917-923.
32. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited *Diabetes*. 1998;47(5):699-713.
33. Tsai CH. Metabolic syndrome in non-obese taiwanese: New definition of metabolically obese, normal-weight individual *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(21):2534-2539.

34. Oliveros E, Somers VK, Sochor O, Goel K, Lopez-Jimenez F. The concept of normal weight obesity *Prog Cardiovasc Dis*. 2014;56(4):426-433.
35. Yates KF, Sweat V, Yau PL, Turchiano MM, Convit A. Impact of metabolic syndrome on cognition and brain: A selected review of the literature *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(9):2060-2067.
36. Gangwani L. Deficiency of the zinc finger protein ZPR1 causes defects in transcription and cell cycle progression *J Biol Chem*. 2006;281(52):40330-40340.
37. Finot L, Marnet PG, Dessauge F. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization: Application in the caprine mammary gland *Small Ruminant Research* 2011;95():20-26.
38. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method *Methods*. 2001;25(4):402-408.
39. Mateos L, Akterin S, Gil-Bea FJ, et al. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein in rodent brain is down-regulated by high fat diet in vivo and by 27-hydroxycholesterol in vitro *Brain Pathol*. 2009;19(1):69-80.
40. Morrison CD, Pistell PJ, Ingram DK, et al. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: Implications for decreased Nrf2 signaling *J Neurochem*. 2010;114(6):1581-1589.
41. Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD. Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression *Neurobiol Learn Mem*. 2012;98(1):25-32.
42. Nogusa Y, Yanaka N, Sumiyoshi N, Takeda K, Kato N. Expression of zinc finger protein ZPR1 mRNA in brain is up-regulated in mice fed a high-fat diet *Int J Mol Med*. 2006 Mar;17(3):491-6.
43. Lee JH, Barral S, Reitz C. The neuronal sortilin-related receptor gene SORL1 and late-onset alzheimer's disease *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2008;8(5):384-391.
44. Lane RF, Raines SM, Steele JW, et al. Diabetes-associated SorCS1 regulates alzheimer's amyloid-beta metabolism: Evidence for involvement of SorL1 and the retromer complex *J Neurosci*. 2010;30(39):13110-13115.
45. Galcheva-Gargova Z, Gangwani L, Konstantinov KN, et al. The cytoplasmic zinc finger protein ZPR1 accumulates in the nucleolus of proliferating cells *Mol Biol Cell*. 1998;9(10):2963-2971.
46. Gangwani L. Deficiency of the zinc finger protein ZPR1 causes defects in transcription and cell cycle progression *J Biol Chem*. 2006;281(52):40330-40340.
47. Doran B, Gherbesi N, Hendricks G, Flavell RA, Davis RJ, Gangwani L. Deficiency of the zinc finger protein ZPR1 causes neurodegeneration *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(19):7471-7475.
48. Vomhof-Dekrey EE, Picklo MJ S. The Nrf2-antioxidant response element pathway: A target for regulating energy metabolism *J Nutr Biochem*. 2012;23(10):1201-1206.
49. Joshi G, Johnson JA. The Nrf2-ARE pathway: A valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2012;7(3):218-229.
50. Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection *Prog Neurobiol*. 2013;100:30-47.

51. Hopkins PC. Neurodegeneration in a drosophila model for the function of TMCC2, an amyloid protein precursor-interacting and apolipoprotein E-binding protein *PLoS One*. 2013;8(2):e55810.
52. Hopkins PC, Sainz-Fuertes R, Lovestone S. The impact of a novel apolipoprotein E and amyloid-beta protein precursor-interacting protein on the production of amyloid-beta *J Alzheimers Dis*. 2011;26(2):239-253.
53. Waters S, Ponten H, Edling M, Svanberg B, Klamer D, Waters N. The dopaminergic stabilizers pridopidine and orodopidine enhance cortico-striatal Arc gene expression *J Neural Transm*. 2014 May 11.
54. Cheli V, Adrover M, Blanco C, et al. Knocking-down the NMDAR1 subunit in a limited amount of neurons in the rat hippocampus impairs learning *J Neurochem*. 2006;97 Suppl 1:68-73.
55. Du LL, Xie JZ, Cheng XS, et al. Activation of sirtuin 1 attenuates cerebral ventricular streptozotocin-induced tau hyperphosphorylation and cognitive injuries in rat hippocampi *Age (Dordr)*. 2014;36(2):613-623.