



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

BENEFICIOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA Y LA CALIDAD PROTEÍCA EN EL DETERIORO COGNITIVO DE ANCIANOS INSTITUCIONALIZADOS

AMANDA SILVENTE POVEDA

Máster Universitario Nutrición y Alimentación Humana.

(Especialidad/Itinerario: Nutrición y Calidad de los Alimentos)

Centro de Estudios de Postgrado

Año Académico 2021-22

BENEFICIOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA Y LA CALIDAD PROTEICA EN EL DETERIORO COGNITIVO DE ANCIANOS INSTITUCIONALIZADOS.

AMANDA SILVENTE POVEDA

Trabajo de Fin de Máster

Centro de Estudios de Postgrado

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2021-22

Palabras clave del trabajo:

Dieta mediterránea, demencia, fuentes proteicas.

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Adamo Valle Gómez

Índice

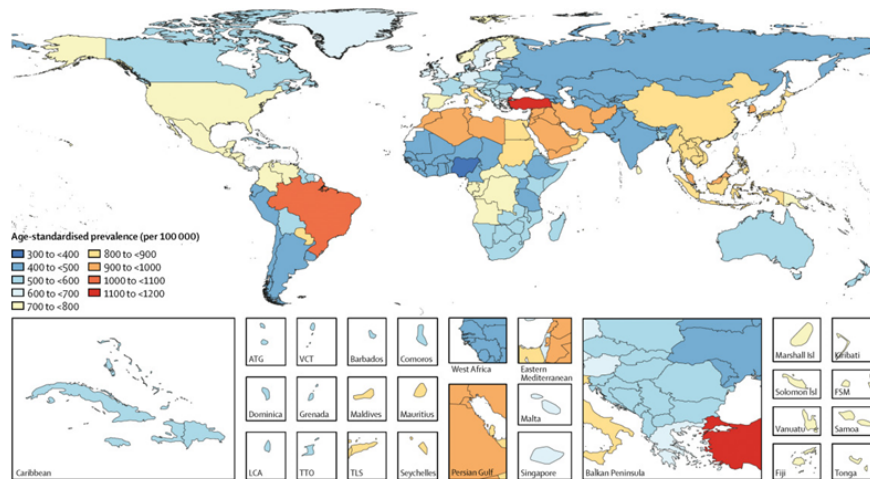
| | |
|--|----|
| 1. Antecedentes | 2 |
| 1.1. Epidemiología de la demencia | 2 |
| 1.2. Biomarcadores sanguíneos de demencia y Alzheimer..... | 4 |
| 1.3. Efectos de la dieta en la inflamación y la neurodegeneración | 4 |
| 1.4. La dieta mediterránea | 6 |
| 1.5. La dieta mediterránea y la demencia..... | 8 |
| 1.6. Fuentes proteicas y demencia..... | 9 |
| 1.7. Otras dietas y alimentos asociados a la demencia..... | 10 |
| 2. Bibliografía | 11 |
| 3. Hipótesis de trabajo | 16 |
| 4. Objetivos | 17 |
| 5. Material y métodos | 17 |
| 5.1. Diseño experimental | 17 |
| 5.2. Sujetos de estudio y criterios de selección | 18 |
| 5.3. Intervención nutricional..... | 19 |
| 5.4. Seguimiento | 22 |
| 5.5. Evaluación de la funcionalidad cognitiva | 23 |
| 5.6. Extracción, procesamiento y análisis de las muestras biológicas | 24 |
| 5.7. Neuroimagen..... | 28 |
| 5.8. Organización de datos y análisis estadístico | 29 |
| 5.9. Control de calidad | 31 |
| 5.10. Consideraciones éticas y confidencialidad..... | 32 |
| 5.11. Política de publicación..... | 32 |
| 5.12. Limitaciones del estudio..... | 32 |
| 6. Plan de Trabajo..... | 33 |
| 6.1. Listado de tareas | 33 |
| 6.2. Cronograma..... | 39 |
| 7. Aportaciones del estudio | 41 |
| ANEXO | 43 |

1. Antecedentes

1.1. Epidemiología de la demencia

En adultos mayores, una de las principales causas de discapacidad es la demencia, caracterizada por una deterioración cognitiva a nivel de memoria, aprendizaje, comprensión u orientación, lo cual llega a interferir en su vida diaria. La forma más común de demencia es la enfermedad del Alzheimer, afectando a más del 60% de los casos (Petersson & Philippou, 2016). Actualmente, se estima que hay 46.8 millones de personas en todo el mundo que padecen algún tipo de demencia, pudiéndose duplicar cada 20 años (Livingston et al., 2020). Los países más afectados por este tipo de patología son Brasil y Turquía (**Figura 1A**). Respecto a Europa central, se estima que 50 de cada 1000 personas de entre 85-89 años sufren algún tipo de demencia (**Figura 1B**).

A



B

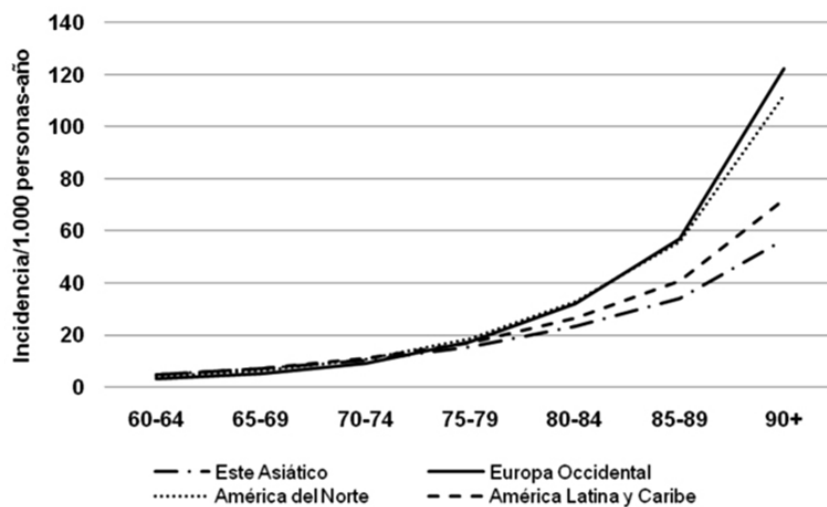


Figura 1. Epidemiología de la demencia. (A) Prevalencia de Alzheimer y otras demencias global incluyendo ambos sexos por cada 100.000 habitantes. Los territorios coloreados de azul corresponden a las menores prevalencias, mientras que los coloreados de rojo son aquellos con mayores prevalencias. (B) Estimación de la incidencia de demencia en mayores de 60 años (Garre Olmo, 2018; Nichols et al., 2019).

Por otro lado, el coste de los cuidados indirectos y cuidados médicos llegan hasta los 27.500 euros por persona en el caso de Europa occidental (Wimo et al., 2011). Además, las cinco terapias aprobadas actualmente por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) (4 inhibidores de la colinesterasa y 1 antagonista del receptor de N-metil-d-aspartato) muestran cierta capacidad para tratar los síntomas de la demencia, pero no consiguen modificar su curso (Casey et al., 2010). A pesar del elevado número de investigaciones en el área, tan solo un fármaco (memantina) ha recibido una

indicación de la FDA (Cummings et al., 2014). Debido a estas alarmantes cifras y ante la falta de tratamientos eficaces, resulta pertinente abordar los factores de riesgo modificables con tal de prevenir la aparición de patologías cognitivas.

1.2. Biomarcadores sanguíneos de demencia y Alzheimer

Una de las características más comunes del Alzheimer es la presencia de placas amiloides cerebrales, las cuales se encuentran en el espacio extracelular. Estas placas se componen mayoritariamente por el péptido b-amiloide (Cheignon et al., 2018). Los niveles de b-amiloide circulantes se asocian a individuos diagnosticados con Alzheimer mediante neuroimagen. Los niveles de b-amiloide 42 son más bajos y los de b-amiloide 43 son más altos en el suero de los pacientes con Alzheimer en comparación con los sujetos sanos. Por tanto, los ratios en plasma de Ab42 y Ab43 son un biomarcador sanguíneo fiable de la enfermedad del Alzheimer (Hosoki et al., 2021).

La proteína Tau se codifica por el gen *MAPT* y tiene una función clave en el citoesqueleto neuronal, puesto que facilita la polimerización de la tubulina en la formación de los microtúbulos (Gra Menéndez et al., 2002). En el caso de p-tau181, se trata de un componente clave en los ovillos de degeneración neurofibrilar de proteína Tau dentro de las neuronas, comúnmente asociadas a la enfermedad del Alzheimer. Así, a mayores niveles de p-tau181 circulante, mayor será el número de agregaciones y peor será el grado de Alzheimer (Hosoki et al., 2021).

Por último, la GFAP es una proteína cerebral específica de las células de la astrogliá, implicadas en dar soporte a la actividad de las neuronas y en la regulación de la barrera hematoencefálica. Tras el daño cerebral, las células de la astrogliá reaccionan elevando la expresión de GFAP en sangre. Por tanto, los elevados niveles de esta proteína en el plasma sanguíneo es un indicador de daño cerebral y de la fase asintomática del Alzheimer (Katisko et al., 2021).

1.3. Efectos de la dieta en la inflamación y la neurodegeneración

Aunque existan distintas causas asociadas a la demencia, las últimas evidencias indican que los factores modificables como el estilo de vida juegan un rol importante en la salud cognitiva. En este contexto, el tipo y la calidad de dieta podrían afectar a la aparición y desarrollo de la demencia (Petersson & Philippou, 2016). Actualmente, se desconocen los mecanismos que subyacen a los efectos cognitivos de las dietas

controladas, pero los estudios sugieren que las vías inflamatorias podrían estar involucradas (Scarmeas et al., 2018). La inflamación está estrechamente relacionada con la patogenia de la enfermedad de Alzheimer (Heppner et al., 2015). Los macrófagos microgliales en el cerebro se activan de forma crónica durante el envejecimiento (Dilger & Johnson, 2008), especialmente en condiciones patológicas (Akiyama et al., 2000), para promover la producción sostenida de citocinas proinflamatorias, incluidas la interleucina-1 β , la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral. alfa (TNF- α) (Heppner et al., 2015). La producción de estas moléculas puede perpetuar el ciclo de los procesos neuroinflamatorios, incluida la amiloidosis, la muerte neuronal (Block et al., 2007) (**Figura 2**), el adelgazamiento cortical, la disminución del volumen cerebral (Gu et al., 2017), los eventos asociados con la enfermedad cerebrovascular como microhemorragias o infartos y neurodegeneración (Gu et al., 2019; Heneka et al., 2015). Los estudios genéticos han proporcionado pruebas sólidas del papel causal de la neuroinflamación en la enfermedad de Alzheimer, con mutaciones en algunos genes de la microglía, como TREM2 y CD33, asociados de forma independiente con un mayor riesgo de enfermedad de Alzheimer (Hickman et al., 2018).

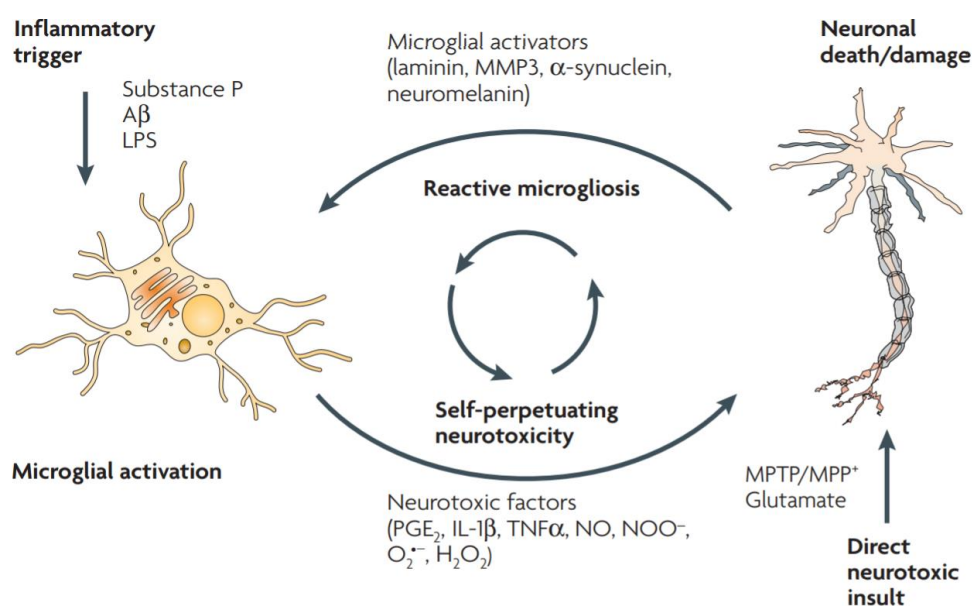


Figura 2. Muerte neuronal por ciclo neuroinflamatorio (Block et al., 2007).

La dieta también tiene un impacto en la regulación del sistema inmunológico (Calder et al., 2017), y algunos nutrientes y componentes bioactivos pueden influir en los procesos neuroinflamatorios. Por ejemplo, los polifenoles, las grasas insaturadas y las vitaminas antioxidantes suprimen el estrés oxidativo y la neuroinflamación (Devassy

et al., 2016; Milanski et al., 2009; Monacelli et al., 2017), mientras que las grasas saturadas promueven la inflamación, especialmente en el hipotálamo (Milanski et al., 2009). La creciente evidencia sugiere que la inflamación periférica y las alteraciones en la microbiota intestinal pueden amplificar la neuroinflamación y acelerar la neurodegeneración (Kowalski & Mulak, 2019; Pistollato et al., 2018), y que estos factores externos también pueden estar influenciados por la dieta (Minihane et al., 2015). Por lo tanto, estos resultados sugieren que las dietas ricas en componentes antiinflamatorios prevengan la neuroinflamación directamente a través de vías inmunitarias e indirectamente a través del microbioma intestinal y la circulación.

1.4. La dieta mediterránea

La dieta Mediterránea, también conocida como dieta al estilo Mediterráneo, se trata de un conjunto de costumbres dietéticas y gastronómicas ancestrales propias de las zonas que rodean las aguas del mar Mediterráneo. Esta dieta se caracteriza por los alimentos propios de estas regiones, incluyendo una alta ingesta de pescado, verduras, frutas, legumbres, frutos secos, semillas, cereales y aceite de oliva, un consumo moderado de pescado, aves, huevos, queso, yogur, vino y un bajo consumo de carne.

Según una actualización de la pirámide de la dieta Mediterránea (**Figura 3**) (Serra-Majem et al., 2020), el agua, las frutas (1-2 piezas), verduras (> 2 piezas), aceite de oliva, cereales y pan (1-2 piezas) deben ser los alimentos mayormente consumidos por cada ración diaria. Diariamente, se recomienda consumir productos lácteos (2 piezas), frutos secos (1-2 piezas) y legumbres. Las fuentes de proteína animal como las carnes blancas (2 piezas), el pescado y el marisco (> 2 piezas) y los huevos (2-4 piezas) pasan a consumirse de forma menos frecuente, pasando de su consumo diario a semanal. En la parte más alta de la pirámide, aparecen los alimentos azucarados (< 3 piezas) y las carnes rojas (< 2 piezas) y procesadas (1 pieza) las cuales deben consumirse de forma muy ocasional y semanalmente (Serra-Majem et al., 2020).

Se enfatiza también la preferencia por alimentos locales, frescos y de temporada. Además, el ejercicio físico regular, dormir las horas recomendadas, la convivencia y el consumo de vino con moderación son otras de las recomendaciones asociadas al patrón de la dieta mediterránea. Por último, esta pirámide actualizada involucra a un nuevo

factor de impacto ambiental que tiene en cuenta la sostenibilidad de la producción de los alimentos (Serra-Majem et al., 2020).



Figura 3. Pirámide de la dieta Mediterránea actualizada. Figura extraída del artículo de Serra-Majem et al., 2020.

Existen diferencias importantes en los patrones de la dieta mediterránea según la región o el área geográfica de procedencia. En el caso de España, por ejemplo, la cercanía al mar podría explicar el elevado consumo de pescado de la población. Por otro lado, los habitantes de Italia consumen más cantidad de pasta, un hábito asociado a su propia cultura y raíces. Otros países mediterráneos como aquellos pertenecientes a los continentes asiáticos o africanos apenas consumen vino en comparación con los mencionados anteriormente (Balanza et al., 2007).

De igual forma, también existen diferencias temporales e históricas que han provocado cambios en el patrón dietético de los pueblos del mediterráneo con el paso del tiempo. En las últimas décadas, los países mediterráneos han aumentado su ingesta total de energía aportada por las grasas de origen animal y han disminuido el consumo total de carbohidratos. Asimismo, la disponibilidad de frutas, verduras, legumbres,

mariscos y huevos ha mejorado en el área Mediterránea con el paso de los años, facilitando así su inclusión semanal y diaria en la dieta (Márquez-Sandoval et al., 2008).

1.5. La dieta mediterránea y la demencia

Las últimas investigaciones al respecto se están enfocando en los patrones dietéticos que puedan retrasar el origen y progresión de la demencia con un impacto positivo en la salud pública. Son muchos los estudios prospectivos que asocian los patrones dietéticos con el menor riesgo de demencia. Los metaanálisis muestran un riesgo reducido de padecer demencia con una mayor ingesta de verduras y frutas (Jiang et al., 2017), pescado (S. Wu et al., 2015) y con una buena adherencia a la dieta mediterránea (Singh et al., 2014).

La gran mayoría de estos estudios de asociación dieta-cognición se centran en la dieta mediterránea, puesto que su adherencia sugiere una prometedora protección en la aparición y evolución de la demencia. En particular, algunos autores asocian los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea en la enfermedad del Alzheimer ya que asegura una adecuada ingesta de vitamina B, folatos y ácidos grasos omega 3, los cuales forman parte de la síntesis de ciertos neurotransmisores y fosfolípidos. En otro estudio longitudinal llevado a cabo en Italia se observó que la dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados se asocia con una mejora cognitiva en individuos de edad avanzada que seguían la típica dieta mediterránea (Solfrizzi et al., 2006). Por otro lado, una baja adherencia a la dieta mediterránea se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer deterioro cognitivo leve y Alzheimer (Gardener et al., 2012), sugiriendo que este patrón dietético podría asociarse con un efecto neuroprotector a través de sus propiedades antiinflamatorias, la disminución del estrés oxidativo y la protección cardiovascular (Singh et al., 2014).

Respecto a aspectos cognitivos generales, el estudio de Knight et al., el cual involucró a un total de 166 individuos mayores de 65 años con funciones cognitivas normales, mostró resultados positivos para la dieta mediterránea (Knight et al., 2015). Aquellos sujetos intervenidos que siguieron las recomendaciones de la dieta mediterránea durante seis meses mostraron una mejora en la memoria, atención, visión espacial y habilidades óculo-motoras, variables sensibles al envejecimiento. Asimismo, los resultados también mostraron que los individuos intervenidos mostraron cambios

positivos en los biomarcadores relacionados con las capacidades psicológicas como el estrés, el sueño, la ansiedad y la depresión (Knight et al., 2015).

Cabe destacar el estudio de Nagpal et al., en el que asoció los cambios de la microbiota intestinal asociada al Alzheimer con la adherencia a la dieta Mediterránea (Nagpal et al., 2019). Este estudio involucró a un número reducido de sujetos (N=17) con una media de edad de 65 años y de los cuales 11 presentaban problemas cognitivos. Sabiendo que la presencia de *Bifidobacterium* y *Lachnobacterium* aumentan los biomarcadores de Alzheimer en el fluido cerebroespinal y que las especies *Enterobacteriaceae*, *Akkermansia*, *Slackia*, *Christensenellaceae* y *Erysipelotriaceae* los reducen, los sujetos intervenidos mostraron una regulación en la abundancia de dichas especies, asociándose con una reducción en el riesgo de padecer Alzheimer (Nagpal et al., 2019).

1.6. Fuentes proteicas y demencia

A pesar de estos esperanzadores resultados, otros estudios incitan a la controversia con respecto a la dieta mediterránea y su efecto beneficioso en la disfunción cognitiva. En el estudio de Takeuchi & Kawashima, los resultados revelaron que una ingesta moderadamente alta de carne, una ingesta alta de pan y una ingesta baja de verduras y frutas se asocian con un menor riesgo de aparición posterior de demencia (Takeuchi & Kawashima, 2021). Estas conclusiones están de acuerdo con un estudio reciente, en el cual se sugiere que el bajo consumo de carne se asocia con un mayor riesgo de demencia en comparación con el consumo regular. De igual forma, un estudio de cohorte anterior reveló que una ingesta adecuada de proteínas (20% de la ingesta calórica total) y una alta ingesta de grasas se asocian con una reducción significativa de padecer demencia (Roberts et al., 2012). Esta asociación podría deberse a que el consumo proteico ayuda en el mantenimiento de las membranas neuronales y las células cerebrales, y a que algunos aminoácidos son críticos como precursores en la biosíntesis de neurotransmisores (Kouvari et al., 2016). Además, la ingesta de proteínas ayuda a la retención muscular en adultos mayores, lo que puede ser clave en la prevención de la demencia (Kouvari et al., 2016).

Esta controversia incita a evaluar la repercusión de la calidad y cantidad proteica en la funcionalidad cognitiva de los ancianos. Algunos resultados de los estudios más recientes motivan dicha evaluación: el alto consumo de pescado previene la demencia

(Nozaki et al., 2021) y el bajo consumo de carne incrementa el riesgo a largo plazo de demencia y Alzheimer (Ngabirano et al., 2019). Estos resultados coinciden con los de Albanese et al., en los que se quiso asociar el consumo de carne o pescado con el riesgo de demencia. Los autores observaron que el consumo de pescado se asociaba de forma inversa con la demencia, mientras que el consumo de carne se relacionaba positivamente con los diagnósticos de esta patología (Albanese et al., 2009).

1.7. Otras dietas y alimentos asociados a la demencia

Si bien la mayor parte de la investigación se ha centrado en la dieta mediterránea y en la dieta para frenar la hipertensión (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*, DASH), aún queda mucho por aprender sobre la combinación ideal de alimentos y nutrientes para una salud cognitiva óptima durante el envejecimiento. Además de la dieta mediterránea, la dieta dedicada a controlar la hipertensión ha demostrado una asociación prometedora con la reducción del deterioro cognitivo (Tangney et al., 2014) y la reducción del Alzheimer (L. Wu & Sun, 2017), aunque los resultados no llegan a ser del todo consistentes.

Respecto al consumo de pescado, su ingesta moderadamente alta se ha asociado con un menor riesgo de demencia. Entre los nutrientes del pescado, el ácido docosahexaenoico (DHA) y el eicosapentaenoico (EPA) tienen efectos protectores contra la neurodegeneración (S. Wu et al., 2015). Aun así y dado que el pescado tiene metilmercurio, una neurotoxina, se ha demostrado que el aumento de la ingesta de pescado está asociado con los niveles de mercurio en el cerebro (Morris et al., 2016).

Otros estudios también han analizado el efecto del consumo de pan en la demencia, concluyendo que su alto consumo se asocia a un riesgo significativamente menor. Un reciente metaanálisis indicó que las bajas concentraciones de vitamina D se han relacionado con un mayor riesgo de padecer deterioro cognitivo (Cao et al., 2016). Dichos componentes nutricionales ejercen su función protectora de distintas formas. Se ha demostrado que apagan las principales vías y procesos fisiopatológicos relacionados con el desarrollo de la demencia (en particular, la enfermedad de Alzheimer), incluyendo los depósitos de amiloide, la degeneración neurofibrilar, la pérdida de sinapsis, la inflamación, el aumento del estrés oxidativo, los defectos en la función mitocondrial y producción de energía celular, la pérdida de integridad vascular y la lesión neuronal (Swaminathan & Jicha, 2014).

A pesar de estos prometedores resultados, los estudios observacionales presentan una serie de limitaciones. Entre éstas estaría el hecho de que la evaluación dietética generalmente se suele completar tan solo una vez antes de la determinación del resultado, y también la elevada heterogeneidad en las puntuaciones utilizadas para definir la dieta, así como la evaluación cognitiva (Valls-Pedret et al., 2015). Para abordar estos problemas y avanzar en el campo, el presente proyecto tendrá en cuenta estos factores para evitar la falta de consistencia de los resultados. El diseño del estudio incluye un sistema de puntuaciones tanto para la dieta como para el nivel de deterioro cognitivo y se realizará un seguimiento a lo largo de todo el proceso.

Algunos autores han recomendado los estudios de neuroimagen como la tomografía por emisión de positrones (PET) y la medición de biomarcadores cerebrales para investigar los cambios neurológicos asociados con la dieta desde las primeras hasta las últimas etapas del deterioro cognitivo (Cagnin et al., 2007). Por ello, el presente proyecto permitirá la medición de la activación de la microglía in vivo mediante PET, avanzando así en la comprensión actual de los efectos mecánicos de la modificación de la dieta sobre la neuroinflamación cerebral y la demencia.

Sobre la disparidad observada de las conclusiones con respecto a la ingesta de carne, nuestro proyecto servirá para esclarecer las dudas, siendo la evaluación de la calidad y cantidad proteica de la dieta mediterránea uno de los objetivos principales.

2. Bibliografía

- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mraz, R., Mackenzie, I. R., ... Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *21*(3), 383–421. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00124-x](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00124-x)
- Albanese, E., Dangour, A. D., Uauy, R., Acosta, D., Guerra, M., Guerra, S. S. G., Huang, Y., Jacob, K. S., de Rodriguez, J. L., Noriega, L. H., Salas, A., Sosa, A. L., Sousa, R. M., Williams, J., Ferri, C. P., & Prince, M. J. (2009). Dietary fish and meat intake and dementia in Latin America, China, and India: a 10/66 Dementia Research Group population-based study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *90*(2), 392–400. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27580>
- Balanza, R., García-Lorda, P., Pérez-Rodrigo, C., Aranceta, J., Bonet, M. B., & Salas-Salvadó, J. (2007). Trends in food availability determined by the Food and Agriculture Organization's food balance sheets in Mediterranean Europe in comparison with other European areas. *Public Health Nutrition*,

- 10(2), 168–176. <https://doi.org/10.1017/S1368980007246592>
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(1), 57–69. <https://doi.org/10.1038/nrn2038>
- Cagnin, A., Kassiou, M., Meikle, S. R., & Banati, R. B. (2007). Positron emission tomography imaging of neuroinflammation. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4(3), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.04.006>
- Calder, P. C., Bosco, N., Bourdet-Sicard, R., Capuron, L., Delzenne, N., Doré, J., Franceschi, C., Lehtinen, M. J., Recker, T., Salvioli, S., & Visioli, F. (2017). Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition. *Ageing Research Reviews*, 40, 95–119. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.09.001>
- Cao, L., Tan, L., Wang, H.-F., Jiang, T., Zhu, X.-C., Lu, H., Tan, M.-S., & Yu, J.-T. (2016). Dietary Patterns and Risk of Dementia: a Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Molecular Neurobiology*, 53(9), 6144–6154. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9516-4>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Casey, D. A., Antimisiaris, D., & O'Brien, J. (2010). Drugs for Alzheimer's disease: are they effective? *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 35(4), 208–211.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14, 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Cummings, J. L., Morstorf, T., & Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(4), 37. <https://doi.org/10.1186/alzrt269>
- Devassy, J. G., Leng, S., Gabbs, M., Monirujjaman, M., & Aukema, H. M. (2016). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Oxylipins in Neuroinflammation and Management of Alzheimer Disease. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 7(5), 905–916. <https://doi.org/10.3945/an.116.012187>
- Dilger, R. N., & Johnson, R. W. (2008). Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4), 932–939. <https://doi.org/10.1189/jlb.0208108>
- Gardener, S., Gu, Y., Rainey-Smith, S. R., Keogh, J. B., Clifton, P. M., Mathieson, S. L., Taddei, K., Mondal, A., Ward, V. K., Scarmeas, N., Barnes, M., Ellis, K. A., Head, R., Masters, C. L., Ames, D., Macaulay, S. L., Rowe, C. C., Szoek, C., & Martins, R. N. (2012). Adherence to a Mediterranean diet and Alzheimer's disease risk in an Australian population. *Translational Psychiatry*, 2(10), e164. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.91>
- Garre Olmo, J. (2018). Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Revista de Neurología*, 66(11), 377. <https://doi.org/10.33588/rn.6611.2017519>

- Gra Menéndez, S., Padrón Pérez, N., & Llibre Rodríguez, J. de J. (2002). Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer . In *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* (Vol. 21, pp. 253–261). scielocu .
- Gu, Y., Gutierrez, J., Meier, I. B., Guzman, V. A., Manly, J. J., Schupf, N., Brickman, A. M., & Mayeux, R. (2019). Circulating inflammatory biomarkers are related to cerebrovascular disease in older adults. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 6(1), e521. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000521>
- Gu, Y., Vorburger, R., Scarmeas, N., Luchsinger, J. A., Manly, J. J., Schupf, N., Mayeux, R., & Brickman, A. M. (2017). Circulating inflammatory biomarkers in relation to brain structural measurements in a non-demented elderly population. *Brain, Behavior, and Immunity*, 65, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.04.022>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(6), 358–372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
- Hosoki, S., Tanaka, T., & Ihara, M. (2021). Diagnostic and prognostic blood biomarkers in vascular dementia: From the viewpoint of ischemic stroke. *Neurochemistry International*, 146, 105015. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105015>
- Jiang, X., Huang, J., Song, D., Deng, R., Wei, J., & Zhang, Z. (2017). Increased Consumption of Fruit and Vegetables Is Related to a Reduced Risk of Cognitive Impairment and Dementia: Meta-Analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 18. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00018>
- Katisko, K., Cajanus, A., Huber, N., Jääskeläinen, O., Kokkola, T., Kärkkäinen, V., Rostalski, H., Hartikainen, P., Koivisto, A. M., Hannonen, S., Lehtola, J.-M., Korhonen, V. E., Helisalmi, S., Koivumaa-Honkanen, H., Herukka, S.-K., Remes, A. M., Solje, E., & Haapasalo, A. (2021). GFAP as a biomarker in frontotemporal dementia and primary psychiatric disorders: diagnostic and prognostic performance. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 92(12), 1305–1312. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-326487>
- Knight, A., Bryan, J., Wilson, C., Hodgson, J., & Murphy, K. (2015). A randomised controlled intervention trial evaluating the efficacy of a Mediterranean dietary pattern on cognitive function and psychological wellbeing in healthy older adults: The MedLey study. *BMC Geriatrics*, 15(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12877-015-0054-8>
- Kouvari, M., Tyrovolas, S., & Panagiotakos, D. B. (2016). Red meat consumption and healthy ageing: A review. *Maturitas*, 84, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.11.006>
- Kowalski, K., & Mulak, A. (2019). Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 25(1), 48–60. <https://doi.org/10.5056/jnm18087>

- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimäki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., ... Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet*, *396*(10248), 413–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6)
- Márquez-Sandoval, F., Bulló Bonet, M., Vizmanos, B., Casas Agustench, P., & Salas Salvadó, J. (2008). Un patrón de alimentación saludable: la dieta mediterránea tradicional. *Antropo*, *16*, 11–22.
- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D. E., Tsukumo, D. M. L., Anhe, G., Amaral, M. E., Takahashi, H. K., Curi, R., Oliveira, H. C., Carvalheira, J. B. C., Bordin, S., Saad, M. J., & Velloso, L. A. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(2), 359–370. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009>
- Minihane, A. M., Vinoy, S., Russell, W. R., Baka, A., Roche, H. M., Tuohy, K. M., Teeling, J. L., Blaak, E. E., Fenech, M., Vauzour, D., McArdle, H. J., Kremer, B. H. A., Sterkman, L., Vafeiadou, K., Benedetti, M. M., Williams, C. M., & Calder, P. C. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *The British Journal of Nutrition*, *114*(7), 999–1012. <https://doi.org/10.1017/S0007114515002093>
- Monacelli, F., Acquarone, E., Giannotti, C., Borghi, R., & Nencioni, A. (2017). Vitamin C, Aging and Alzheimer's Disease. *Nutrients*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/nu9070670>
- Morris, M. C., Brockman, J., Schneider, J. A., Wang, Y., Bennett, D. A., Tangney, C. C., & van de Rest, O. (2016). Association of Seafood Consumption, Brain Mercury Level, and APOE ε4 Status With Brain Neuropathology in Older Adults. *JAMA*, *315*(5), 489–497. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.19451>
- Nagpal, R., Neth, B. J., Wang, S., Craft, S., & Yadav, H. (2019). Modified Mediterranean-ketogenic diet modulates gut microbiome and short-chain fatty acids in association with Alzheimer's disease markers in subjects with mild cognitive impairment. *EBioMedicine*, *47*, 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.032>
- Ngabirano, L., Samieri, C., Feart, C., Gabelle, A., Artero, S., Duflos, C., Berr, C., & Mura, T. (2019). Intake of Meat, Fish, Fruits, and Vegetables and Long-Term Risk of Dementia and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *68*(2), 711–722. <https://doi.org/10.3233/JAD-180919>
- Nichols, E., Szoeki, C. E. I., Vollset, S. E., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdela, J., Aichour, M. T. E., Akinyemi, R. O., Alahdab, F., Asgedom, S. W., Awasthi, A., Barker-Collo, S. L., Baune, B. T., Béjot, Y., Belachew, A. B., Bennett, D. A., Biadgo, B., Bijani, A., Bin Sayeed, M. S., ... Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, *18*(1), 88–106. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30403-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30403-4)
- Nozaki, S., Sawada, N., Matsuoka, Y. J., Shikimoto, R., Mimura, M., & Tsugane, S. (2021). Association Between Dietary Fish and PUFA Intake in Midlife and Dementia in Later Life: The JPHC Saku

- Mental Health Study. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 79(3), 1091–1104.
<https://doi.org/10.3233/JAD-191313>
- Petersson, S. D., & Philippou, E. (2016). Mediterranean Diet, Cognitive Function, and Dementia: A Systematic Review of the Evidence. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 7(5), 889–904.
<https://doi.org/10.3945/an.116.012138>
- Pistollato, F., Iglesias, R. C., Ruiz, R., Aparicio, S., Crespo, J., Lopez, L. D., Manna, P. P., Giampieri, F., & Battino, M. (2018). Nutritional patterns associated with the maintenance of neurocognitive functions and the risk of dementia and Alzheimer's disease: A focus on human studies. *Pharmacological Research*, 131, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.03.012>
- Reisberg, B., Ferris, S. H., & Franssen, E. (1985). An ordinal functional assessment tool for Alzheimer's-type dementia. *Hospital & Community Psychiatry*, 36(6), 593–595.
<https://doi.org/10.1176/ps.36.6.593>
- Roberts, R. O., Roberts, L. A., Geda, Y. E., Cha, R. H., Pankratz, V. S., O'Connor, H. M., Knopman, D. S., & Petersen, R. C. (2012). Relative intake of macronutrients impacts risk of mild cognitive impairment or dementia. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 32(2), 329–339.
<https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120862>
- Scarmeas, N., Anastasiou, C. A., & Yannakoulia, M. (2018). Nutrition and prevention of cognitive impairment. *The Lancet. Neurology*, 17(11), 1006–1015. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30338-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30338-7)
- Serra-Majem, L., Tomaino, L., Dernini, S., Berry, E. M., Lairon, D., Ngo de la Cruz, J., Bach-Faig, A., Donini, L. M., Medina, F.-X., Belahsen, R., Piscopo, S., Capone, R., Aranceta-Bartrina, J., La Vecchia, C., & Trichopoulou, A. (2020). Updating the Mediterranean Diet Pyramid towards Sustainability: Focus on Environmental Concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(23). <https://doi.org/10.3390/ijerph17238758>
- Singh, B., Parsaik, A. K., Mielke, M. M., Erwin, P. J., Knopman, D. S., Petersen, R. C., & Roberts, R. O. (2014). Association of mediterranean diet with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 39(2), 271–282. <https://doi.org/10.3233/JAD-130830>
- Solfrizzi, V., Colacicco, A. M., D'Introno, A., Capurso, C., Torres, F., Rizzo, C., Capurso, A., & Panza, F. (2006). Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiology of Aging*, 27(11), 1694–1704.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.026>
- Swaminathan, A., & Jicha, G. A. (2014). Nutrition and prevention of Alzheimer's dementia. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 282. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00282>
- Takeuchi, H., & Kawashima, R. (2021). Diet and Dementia: A Prospective Study. *Nutrients*, 13(12).
<https://doi.org/10.3390/nu13124500>
- Tangney, C. C., Li, H., Wang, Y., Barnes, L., Schneider, J. A., Bennett, D. A., & Morris, M. C. (2014). Relation of DASH- and Mediterranean-like dietary patterns to cognitive decline in older persons. *Neurology*, 83(16), 1410–1416. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000884>
- Valls-Pedret, C., Sala-Vila, A., Serra-Mir, M., Corella, D., de la Torre, R., Martínez-González, M. Á.,

- Martínez-Lapiscina, E. H., Fitó, M., Pérez-Heras, A., Salas-Salvadó, J., Estruch, R., & Ros, E. (2015). Mediterranean Diet and Age-Related Cognitive Decline: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Internal Medicine*, *175*(7), 1094–1103. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.1668>
- Wimo, A., Jönsson, L., Gustavsson, A., McDaid, D., Ersek, K., Georges, J., Gulácsi, L., Karpati, K., Kenigsberg, P., & Valtonen, H. (2011). The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from the Eurocode project. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *26*(8), 825–832. <https://doi.org/10.1002/gps.2610>
- Wu, L., & Sun, D. (2017). Adherence to Mediterranean diet and risk of developing cognitive disorders: An updated systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Scientific Reports*, *7*, 41317. <https://doi.org/10.1038/srep41317>
- Wu, S., Ding, Y., Wu, F., Li, R., Hou, J., & Mao, P. (2015). Omega-3 fatty acids intake and risks of dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *48*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.008>

3. Hipótesis de trabajo

La demencia afecta a una porción cada vez mayor de la población anciana, lo que lleva a la necesidad de diseñar nuevas estrategias de prevención y tratamiento para controlar el auge de esta enfermedad. Gracias a las últimas investigaciones se han identificado nuevos métodos para la detección precoz de la demencia, así como nuevos biomarcadores que indican el alcance de la demencia o el Alzheimer en un individuo. Por otro lado, la dieta mediterránea ha demostrado múltiples beneficios, entre ellos la prevención de la aparición y progresión de la demencia. A pesar de los estudios relacionados con la dieta mediterránea y la demencia en ancianos, son muchas las limitaciones que impulsaron el diseño del proyecto MEDPRO. Además de ser inconsistente con la calidad de las proteínas de los grupos de alimentos que componen la dieta, la mayoría de los resultados se basaron en evaluaciones cognitivas y de alimentación irregular. Por tanto, la hipótesis del presente trabajo “la dieta mediterránea y la calidad proteica de la misma afectan de manera positiva a la salud cognitiva de los ancianos institucionalizados”. Para responder a dicha hipótesis, el proyecto establece los objetivos principales de conocer los beneficios de la dieta mediterránea en el deterioro cognitivo de ancianos institucionalizados, evaluando además la repercusión de la calidad y cantidad proteica. Para ello, se intervendrá nutricionalmente a un total de 250 institucionalizados de la comarca del Mar Menor en base a la dieta mediterránea.

4. Objetivos

4.1. Objetivos principales

Objetivo principal 1: conocer los beneficios de la dieta mediterránea en el deterioro cognitivo de ancianos institucionalizados.

Objetivo principal 2: evaluar la repercusión de la calidad y cantidad proteica de la dieta mediterránea en la funcionalidad cognitiva.

4.2. Objetivos específicos

- Analizar los cambios en los biomarcadores cerebrales de la población de estudio derivados de la intervención nutricional.
- Comprobar los cambios en la microbiota intestinal de los ancianos involucrados que resulten de la intervención nutricional.
- Conocer los cambios a nivel neurológico (PET y cuestionarios) derivados de la intervención nutricional.
- Analizar estadísticamente las correlaciones entre los biomarcadores, la microbiota y las imágenes PET.

5. Material y métodos

5.1. Diseño experimental

El proyecto propuesto consta de un ensayo aleatorizado, multicéntrico y de simple ciego que tiene como objetivo mejorar las funciones cognitivas de un grupo de ancianos institucionalizados mediante una intervención nutricional basada en las recomendaciones de la dieta mediterránea, comparando los resultados con un grupo control. El grupo intervenido se dividirá en 3 subgrupos; uno que seguirá las recomendaciones de la dieta mediterránea y otros dos grupos que recibirán una dieta mediterránea modificada, en la que la principal fuente proteica será la carne o el pescado. El grupo control seguirá una dieta habitual de residencia. Los individuos reclutados incluyen hombres y mujeres de edad comprendida entre los 70 y los 99 años, excluyéndose aquellos ancianos que no puedan seguir la dieta mediterránea por problemas de salud o sufran de demencia por causas externas al envejecimiento. Mediante un continuo seguimiento durante tres años, se obtendrán los resultados de funcionalidad cognitiva mediante encuestas, muestras biológicas e imágenes cerebrales.

5.2. Sujetos de estudio y criterios de selección

Los ancianos institucionalizados de diferentes residencias de la comarca del Mar Menor serán reclutados para llevar a cabo el presente estudio. Estos ancianos incluirán a hombres y mujeres de edad comprendida entre 70 y 99 años. Asimismo, deberán cumplir los criterios de selección descritos a continuación.

Criterios de inclusión

- Consentimiento informado por parte del residente o su familia para acceder al historial médico.
- Con más de 3 años institucionalizados, con tal de asegurar la adherencia a la dieta de la residencia.
- Con algún tipo de demencia.

Criterios de exclusión

- Ancianos cuya demencia derive de un accidente externo al deterioro cognitivo por envejecimiento.
- Individuos que necesiten dietas especiales como las adaptadas a celíacos.
- Historial de alergias a alimentos incluidos en la dieta mediterránea.
- Individuos con problemas neurológicos graves o de deglución y digestión que les impida adherirse a la intervención nutricional.
- Dificultad o inconveniencias para cambiar sus hábitos dietéticos.
- Condición médica o farmacológica que impida el seguimiento de la dieta mediterránea.

Del total de individuos involucrados y de forma aleatorizada, el 75% recibirá la intervención nutricional y el 25% formarán parte del grupo control. Asimismo, el grupo de intervención se dividirá en tres subgrupos: el 25% seguirá las recomendaciones de la dieta mediterránea (DM), otro 25% seguirá la dieta mediterránea siendo las carnes rojas y blancas la principal fuente de proteínas (DMC) y el restante 25% seguirá la DM pero con el pescado como fuente principal de proteínas (DMP).

El personal de enfermería asignará a cada participante al correspondiente grupo siguiendo las tablas de aleatorización en bloques de 63 individuos, los cuales se equilibran por sexo y edad. Estas tablas fueron elaboradas por la unidad de estadística

de la Universidad de Murcia y proporcionan una secuencia aleatorizada y estratificada para la clasificación de cada anciano en el grupo correspondiente. Los tres estratos de aleatorización estratificada se construyeron de acuerdo al sexo y la edad.

5.3. Intervención nutricional

Durante los años de duración del estudio, los candidatos elegidos para el grupo de intervención nutricional DM seguirán las recomendaciones de la dieta mediterránea descritas en la **tabla 1**. Este subgrupo pasará a consumir recetas con alta cantidad de aceite de oliva, ≥ 2 raciones de verduras al día (al menos una de ellas serán verduras frescas en una ensalada), > 2 -3 raciones diarias de fruta fresca (incluyendo zumos naturales), ≥ 3 raciones a la semana de legumbres, ≥ 3 raciones a la semana de pescado o marisco (al menos una ración de pescado graso), ≥ 3 raciones a la semana de frutos secos, carnes blancas y rojas (aves sin piel o conejo) evitando las procesadas (hamburguesas, salchichas), al menos dos veces a la semana recetas con tomate, ajo y cebolla, añadiendo especias. Para las salsas que acompañen a la pasta o al arroz, se utilizará tomate, ajo y cebolla con abundante aceite de oliva. Además, se restringirá el consumo de los siguientes alimentos: mantequilla o margarina, fiambres, paté, bebidas azucaradas o carbonatadas, dulces, bollería industrial (como tartas, donuts o galletas), patatas fritas o comida pre-cocinada.

El subgrupo Dieta Mediterránea Carne (DMC) seguirá las mismas recomendaciones que el grupo DM a excepción del consumo de pescado y marisco el cual cambiará a 2 raciones por semana, mientras que el consumo de carne subirá a 6 veces por semana.

El subgrupo Dieta Mediterránea Pescado (DMP) seguirá las recomendaciones del grupo DM a excepción del consumo de carne, el cual se reducirá a 2 veces por semana, mientras que el consumo de pescado y marisco subirá a 6 raciones por semana.

El grupo control permanecerá adherido a una dieta habitual en las residencias donde están institucionalizados. Para evitar heterogeneidad entre las diferentes dietas, se recogió la información de todas ellas y se elaboró una dieta basal que representaría la dieta habitual de la residencia. Por tanto, la dieta control incluye dos raciones al día de verduras, una o dos raciones al día de fruta, una o dos raciones a la semana de

legumbres, dos raciones de pescado a la semana, nada de frutos secos y cuatro o cinco raciones de carne, incluyendo carnes blancas y carnes rojas.

Tabla 1. Dietas de cada uno de los grupos de estudio.

| Grupo | DM | DMC | DMP | Control |
|--------------------------|--|--|--|---|
| Grasas | Aceite de oliva virgen extra | Aceite de oliva virgen extra | Aceite de oliva virgen extra | Aceite de oliva virgen extra |
| Verduras | >=2 raciones/día | >=2 raciones/día | >=2 raciones/día | 2 raciones/día |
| Fruta | >2-3 raciones/día | >2-3 raciones/día | >2-3 raciones/día | 1-2 raciones/día |
| Legumbres | >=3 raciones/sem | >=3 raciones/sem | >=3 raciones/sem | 1-2 raciones/sem |
| Pescado o Marisco | >=3 raciones/sem 1 de pescado graso | 2 raciones/sem 1 de pescado graso | 6 raciones/sem 3 de pescado graso | 2 raciones/sem |
| Frutos secos | >=3 raciones/sem | >=3 raciones/sem | >=3 raciones/sem | 0 raciones |
| Carnes | >=3 raciones/sem Carnes blancas Carnes rojas | 6 raciones/sem Carnes blancas Carnes rojas | 2 raciones/sem Carnes blancas Carnes rojas | 4-5 raciones/semana Carnes blancas Carnes rojas |
| Aderezo | Especias | Especias | Especias | Especias |

DM, dieta mediterránea; DMC, dieta mediterránea carne; DMP, dieta mediterránea pescado.

5.4. Seguimiento

Para el adecuado seguimiento de los pacientes, firmará un convenio con cada una de las residencias para establecer la participación y las funciones del personal de enfermería, cocina y otros cuidadores que atiendan a los ancianos. Este personal fue debidamente formado mediante charlas y guías establecidas para la aplicación de la dieta mediterránea. Además, se aportarán plantillas donde se anotaría cualquier tipo de incidencia que afectase al seguimiento de las dietas o a la salud del anciano. Por otro lado, el convenio con el Hospital Los Arcos del Mar Menor permitirá el transporte y recepción de muestras biológicas, así como la citación de los ancianos para conseguir las imágenes cerebrales al inicio y al final del estudio.

Para las visitas a la residencia, asegurar la adherencia de los individuos a las dietas establecidas y la recogida de datos de forma periódica, se contratará a dos dietistas por residencia. Por último, el contrato del servicio de análisis del centro de Investigación servirá para obtener los resultados de las muestras biológicas, así como los resultados estadísticos de la comparación entre los tres grupos de estudio.

Los participantes reclutados recibirán un seguimiento durante tres años, con el objetivo de conseguir un seguimiento lo más largo posible y evitando que los individuos dejen el estudio de forma temprana.

Tabla 2. Resumen de la recogida de datos del estudio.

| | Inicio | Año 1 | Año 2 | Año 3 |
|--|---------------|--------------|--------------|--------------|
| Consentimiento informado | X | | | |
| Cuestionario dieta | X | X | X | X |
| Evaluación funcional (cuestionario) | X | X | X | X |
| Evaluación funcional (actividades) | X | X | X | X |
| Muestras biológicas | X | X | X | X |
| Neuroimagen | X | | | X |

5.5. Evaluación de la funcionalidad cognitiva

Mediante las visitas llevadas a cabo por los dietistas, se evaluará la funcionalidad cognitiva de los ancianos de estudio mediante un cuestionario (**Anexo I**) y diferentes actividades dedicadas a ancianos con demencia.

En primer lugar, se les consultará a los cuidadores y/o enfermeros de cada residencia sobre el nivel de dependencia de los ancianos con el objetivo de clasificar su nivel de demencia según la Escala Clínica de Clasificación de la Demencia (CDR) (Reisberg et al., 1985). Estas preguntas involucrarán la solución de problemas, la independencia en actividades de cuidado personal, su participación en las actividades, su nivel de orientación en tiempo y espacio, la ayuda requerida por parte del personal y la incontinencia (**Tabla 3**).

Tabla 3. Escala Clínica de Clasificación de la Demencia (Reisberg et al., 1985).

| Estadio | Descripción |
|----------------|--|
| CDR-0 | Sin demencia |
| CDR-0.5 | Demencia muy leve – Los problemas de memoria son leves, pero consistentes <ul style="list-style-type: none"> ➤ Dificultad leve para solucionar problemas ➤ Leve discapacidad en la vida diaria ➤ Pueden llevar a cabo su cuidado personal |
| CDR-1 | Demencia leve – La pérdida de memoria es moderada, especialmente para eventos recientes e interfiere con sus actividades diarias. <ul style="list-style-type: none"> ➤ Dificultad moderada para solucionar problemas ➤ No puede realizar tareas diarias de forma independiente ➤ Dificultad con las actividades diarias y hobbies |
| CDR-2 | Demencia moderada – Pérdida de memoria más grave, sólo recuerda material muy aprendido. <ul style="list-style-type: none"> ➤ Desorientación espacial y temporal ➤ Dificultado para solucionar problemas ➤ Poca o nada de independencia ➤ No puede llevar a cabo tareas simples |

| | |
|--------------|--|
| | ➤ Pocos intereses |
| CDR-3 | <p>Demencia severa – pérdida de memoria grave</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Desorientación espacial y temporal ➤ Sin capacidad para resolver problemas ➤ No puede participar en ninguna actividad fuera de la residencia ➤ Requiere ayuda con todas las tareas ➤ Requiere ayuda con el cuidado personal ➤ Incontinencia frecuente |

CDR, Escala Clínica de Clasificación de la Demencia.

En segundo lugar, se les realizará una serie de pruebas a los ancianos mediante un cuestionario. A través de este test, se examinará al paciente mediante unas sencillas preguntas. Al inicio del test, se le pedirá al individuo que recuerde tres palabras para que las memorice. A continuación, se le pedirá dibujar un reloj en un papel marcando todos los números e indicando una hora en concreto (**Anexo I**), se le pedirá que comente alguna noticia de la última semana y por último se le pedirá que nos diga cuál eran las tres palabras que se había memorizado al principio. Cada uno de los pasos de esta encuesta valdrá un punto, por lo que nos dará información sobre el nivel de demencia del anciano. Debido a que estas actividades pueden variar por cada visita realizada, se evitará que el anciano encuestado las realice de memoria, asegurando la eficacia de cada prueba.

5.6. Extracción, procesamiento y análisis de las muestras biológicas

El profesional de enfermería será el responsable directo para la extracción, procesamiento y almacenamiento de las muestras biológicas. Toda esta plantilla tendrán experiencia y con un registro de aprendizaje certificado para realizar las tareas descritas. Durante el reclutamiento de los sujetos, estos trabajadores acudirán a sesiones de formación sobre el proyecto en cuestión. Las muestras de sangre y heces serán extraídas al inicio del estudio y cada tres meses durante los tres años de estudio de acuerdo con los protocolos descritos a continuación.

5.6.1. Manipulación de las muestras de sangre

Para las muestras de sangre, se extraerán un total de 38,5 mL en ayunas en cada una de las residencias donde se realiza el presente estudio. Las extracciones se

realizarán en todos los casos en la vena cubital. Los mililitros extraídos serán distribuidos en distintos tubos EDTA, citrato y gel-cristal SST (Tabla 4). El tubo de plástico K3E EDTA (frío) y un tubo de gel-cristal SST (para homocisteína) se refrigerarán en hielo antes de la extracción; después de la recogida de sangre, los tubos permanecerán en frío. Las muestras de suero, plasma citrato y plasma EDTA se distribuirán en alícuotas de 650 uL y almacenadas a -80°C para futuros análisis en los laboratorios.

Tabla 4. Muestras de sangre extraídas cada tres meses.

| | Número de tubos | Volumen (mL) |
|---|-----------------|--------------|
| Tubo de cristal K3E EDTA | 4 | 4.5 |
| Tubo de plástico K3E EDTA (frío) | 1 | 3 |
| Tubo de cristal 9NC Citrato | 1 | 4.5 |
| Tubo de gel-cristal SST | 2 | 4 |
| Tubo de cristal K3E EDTA* | 1 | 5 |
| TOTAL | 9 | 38.5 |

*El 10% de la muestra será analizada para la búsqueda de biomarcadores, el resto se almacenará para futuros análisis.

Los tubos EDTA se centrifugarán a 400 G durante 30 minutos para separar el plasma del componente celular. Las fracciones de plasma se alicuotarán en tubos *eppendorf* y almacenadas a -80°C hasta ser analizadas.

5.6.2. Estudio hematológico y biomarcadores cerebrales

Para el estudio hematológico se analizarán distintas variables, las cuales se describen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Variables del estudio hematológico

| Núm. | Variable |
|----------|---------------------------------|
| 1 | Recuento de eritrocitos |
| 2 | Hemoglobina |
| 3 | Hematocrito |
| 4 | Volumen Corpuscular Medio (VCM) |

| | |
|-----------|---|
| 5 | Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) |
| 6 | Concentración Corpuscular media de hemoglobina (CHCM) |
| 7 | Tamaño de distribución de los eritrocitos (RDW) |
| 8 | Recuento plaquetario |
| 9 | Volumen plaquetario medio (MPV) |
| 10 | Tamaño de la distribución plaquetaria (PDW) |
| 11 | Recuento de leucocitos (WBC) |
| 12 | Histograma diferencial de WBC |
| 13 | Linfocitos |
| 14 | Porcentaje de granulocitos |
| 15 | Porcentaje de eosinófilos |
| 16 | Basófilos y otros elementos sanguíneos |

Además del estudio hematológico, se evaluarán los perfiles lipídicos y metabólicos de cada uno de los individuos. Estos resultados servirán para identificar aquellos cambios derivados de la intervención nutricional y controlar posibles alteraciones sanguíneas (**Tabla 6**). Mediante el método colorimétrico enzimático, se medirán las variables de calcio, fosfolípidos, ácido úrico, fósforo, colesterol, triglicéridos, glucosa y hierro. Para llevar a cabo este paso, se utilizarán los kits de Roche-Boehringer, los cuales estarán adaptados al analizador Hitachi 917. Por otro lado, el colesterol HDL se estudiará mediante precipitación. Del mismo modo, el colesterol LDL se determinará mediante precipitación selectiva y de forma indirecta o directa. A través de la técnica de inmunturbidimetría con el analizador Beckam Array 306 (analizador específico de proteínas), se evaluarán los niveles de las apolipoproteínas, la transferrina y ferritina y la pre-albúmina. Por último, se llevará a cabo el inmunoensayo enzimático con el sistema AIA-600 para estudiar los niveles de insulina en sangre.

Sin excepciones y siguiendo la normativa aplicable a la red hospitalaria pública, todas las evaluaciones sanguíneas pasarán por controles internos y externos de calidad.

Tabla 6. Variables analizadas a partir de las muestras de sangre para evaluar el perfil lipídico plasmático y metabólico-nutricional de la población de estudio.

| Perfil lipídico plasmático |
|--------------------------------------|
| Triglicéridos |
| Colesterol total |
| Fosfolípidos |
| HDL-colesterol |
| LDL-colesterol |
| Apolipoproteína B |
| Apolipoproteína A1 |
| Apolipoproteína A |
| Perfil metabólico-nutricional |
| Glucosa |
| Insulina |
| Prealbúmina |
| Hierro |
| Ferritina |
| Transferrina |
| Ácido úrico |
| Calcio |
| Fósforo |

Los biomarcadores cerebrales analizados a partir de las muestras de sangre serán b-amiloide, el cual será medido por espectrometría de masas, el p-tau181, analizado mediante un equipo de Simoa® y la proteína acídica fibrilar glial mediante ELISA.

5.6.3. Estudio de la microbiota intestinal

Las muestras de heces serán recogidas el mismo día de la preparación de la solución fecal, siendo recolectadas en recipientes estériles en condiciones de asepsia. Se transportarán desde las residencias hasta los laboratorios de la Universidad de Murcia en nevera refrigerada, manteniéndose en frío durante el trayecto mediante el empleo de acumuladores en frío.

Seguendo el protocolo de Nagpal et al., el ADN genómico se extraerá de 200 mg de muestra fecal utilizando *QiaAMP PowerFecal DNA Kit* (Qiagen, CA, USA) (Nagpal et al., 2019). Se amplificarán las regiones hipervariables identificadas utilizando *primers* universales y los amplicones se purificarán con *beads* magnéticas AMPure® (Agencourt). Los productos purificados se cuantificarán utilizando el fluorímetro Qubit-3 (Invitrogen) y la librería del amplicón se generará de acuerdo con los métodos de Caporaso et al. (Caporaso et al., 2012). Este producto de PCR purificado se secuenciará en un equipo de Illumina MiSeq y se analizarán mediante el software QIIME (*Quantitative Insights into Microbial Ecology*; versión 1.9.1). La diversidad del microbioma se analizará utilizando un análisis coordinado principal utilizando la versión 0.9.3 de EMPEROR. Asimismo, el análisis discriminatorio lineal se aplicará para identificar los taxones bacterianos presentes en distintas medidas entre los grupos intervenidos y el grupo control.

Para explorar las actividades metabólicas de las comunidades bacterianas intestinales, se utilizará la herramienta bioinformática PICRUSt (Investigación Filogenética de Comunidades por Reconstrucción de Estados no observados). De esta forma, se predecirán los genes funcionales de los microorganismos. Subsecuentemente, las familias de genes se anotarán según la enciclopedia de genes y genomas Kyoto (KEGG) para generar las rutas funcionales KEGG.

5.7. Neuroimagen

Para la detección de placas típicas de la enfermedad del Alzheimer, la tomografía por emisión de positrones (PET) será utilizada en los ancianos involucrados en el estudio. La Sociedad de Imagen Molecular y Medicina Nuclear proporciona guías en las que se recomienda que los pacientes estén en ayunas durante 4-6 horas antes de comprobar los niveles de glucosa. Si la glucosa es adecuada para la neuroimagen, una línea intravenosa se coloca y el paciente se quedará en una habitación silenciosa durante al menos 10 minutos. Tras los 10 minutos, se administra contraste intravenoso y el individuo deberá quedarse callado y quieto. El escaneado se realiza 30-60 minutos después de la administración. Después de la adquisición, las imágenes son procesadas y enviadas a un servidor para ser visualizadas y analizadas de forma cuantitativa y cualitativa (**Figura 4**).

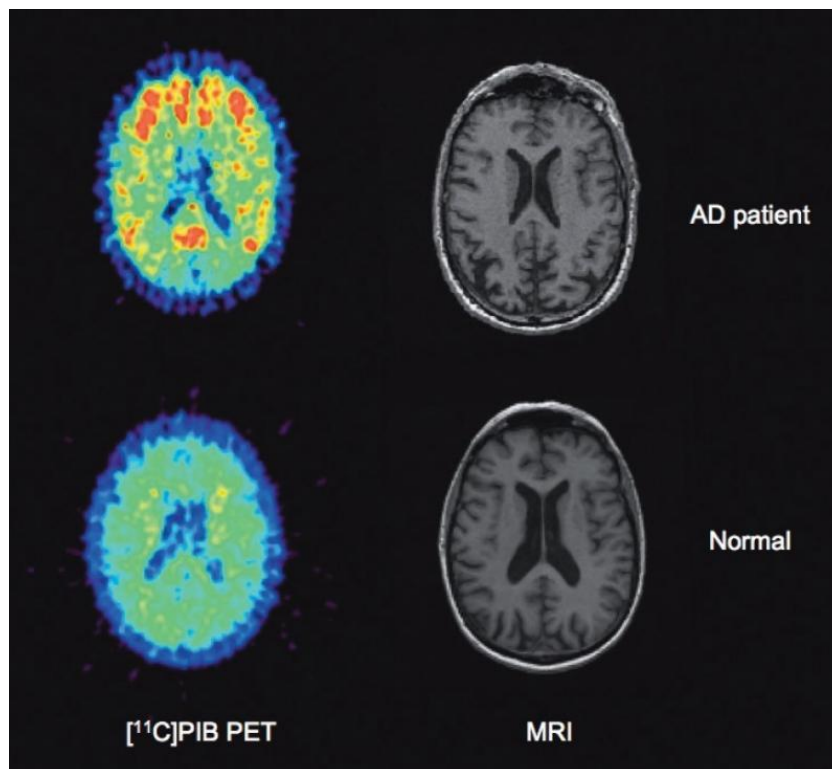


Figura 4. Imágenes cerebrales tomadas por PET de un individuo normal y un paciente con Alzheimer.

Las pruebas PET se llevarán a cabo en el hospital al inicio y una vez al año durante los 3 años de duración del proyecto. En caso de que alguno de los ancianos deba dejar el seguimiento y han pasado más de 6 meses desde el inicio del estudio, se le realizará el PET para poder comparar los resultados.

5.8. Organización de datos y análisis estadístico

La unidad de informática y estadística de la Universidad de Murcia desarrollarán y actualizarán una base de datos. Los datos que provengan de las encuestas, los resultados de los análisis de biomarcadores y microbiota y los diagnósticos de neuroimagen serán incluidas en esta base de datos de forma lógica y ordenada. Una vez al mes, la unidad enviará informes sobre información faltante o errónea a los coordinadores. De forma periódica, se realizarán revisiones para detectar duplicados, ausencia de datos o errores.

Por otro lado, se diseñó una web en la que se publicarán los resultados y las bases de datos, que podrán ser descargadas por investigadores autorizados. Para mayor seguridad y privacidad, se requerirá una identificación personal y una contraseña para

acceder a estos datos. Además, este sistema web también podrá utilizarse para mantener el contacto con el Data Manager de la unidad informática.

El proyecto será supervisado por la Dra. Cristina Martínez (Hospital Los Arcos del Mar Menor), el cual será asistido por un Comité de Investigación Médica para aplicar las decisiones estratégicas durante los años de estudio. La coordinación, investigación y supervisión interna del proyecto se llevarán a cabo por 7 categorías distintas: las unidades de administración, soporte tecnológico, comité de investigación y comité ético, estadística, soporte médico, universidad e investigación. La **Tabla 7** muestra las actividades llevadas a cabo por cada unidad.

Respecto al Comité de Investigación médica encabezada por Dña. Senena Corbalán García, incluye a los coordinadores de cada una de las unidades, el investigador responsable de cada unidad de laboratorio y el Data Manager. Estos coordinadores serán invitados a revisar la implementación del protocolo y monitorizar el progreso del estudio de forma anual. Además, se les informará periódicamente por e-mail con los análisis y datos recogidos para asegurar la continuación del estudio. Por último, se llevarán a cabo reuniones por video llamada y en persona con los comités una vez al año.

Tabla 7. Descripción de las responsabilidades de cada unidad

| Unidad | Responsabilidades |
|----------------------------|--|
| Administración | Organización general |
| Soporte tecnológico | Soporte técnico y tecnológico informático, mantenimiento de los equipos |
| Comité de Investigación | Elaboración de protocolos y supervisión del seguimiento. |
| Comité ético | Evaluación y aprobación de los protocolos. |
| Estadística y Data Manager | Análisis estadístico, organización de las bases de datos, elaboración de informes, desarrollo de herramientas informáticas y software. |

| | |
|----------------------------|---|
| Soporte médico | Asistencia médica en tareas clínicas. Neuroimagen. Análisis de las imágenes cerebrales |
| Universidad | Reclutamiento de pacientes, intervención nutricional, extracción de muestras, recogida de datos. |
| Instituto de Investigación | Análisis de las muestras biológicas. |

Los análisis principales incluirán un análisis dentro de los mismos grupos de los biomarcadores cerebrales y la microbiota al principio y al final del estudio, además de la progresión por cada tres meses transcurridos y la comparación entre los dos grupos intervenidos y el grupo control con respecto a los mismos parámetros. Estos análisis se llevarán a cabo a partir de las bases de datos diseñadas y los softwares de R y SPSS. Según la normalidad de las variables, se compararán mediante correlaciones de Spearman, Test T, Test de Mann-Whitney, ANOVA y test de Friedman, entre otros. Se considerarán como estadísticamente significativas las diferencias con un p-valor < 0.05. La visualización de los datos se llevará a cabo mediante el paquete ggplot2 de R.

De esta forma, se observarán los cambios en los biomarcadores cerebrales y la microbiota intestinal derivados de la intervención nutricional. Los análisis serán llevados a cabo por la unidad de estadística del Instituto de Investigación.

5.9. Control de calidad

En cualquier proyecto o estudio de investigación, la calidad es una de las prioridades a ser consideradas. De este modo, se garantiza que los resultados obtenidos sean lo más fiables posible. Por tanto, el presente estudio contará con las medidas de control de calidad necesarias, tanto dentro de cada uno de los centros y laboratorios involucrados como en cada uno de los procesos realizados. Incluyendo un extensivo análisis del proceso general, se pueden detectar, minimizar y eliminar la posible variabilidad presente, así como diseñar y optimizar los protocolos de actuación para evitar errores en las fases más importantes del estudio.

Para asegurar los controles de calidad y la optimización de los protocolos, se organizaron las debidas reuniones con los responsables de cada uno de los centros involucrados con el objetivo de establecer los métodos y el cronograma de acción. Estas

reuniones sirvieron para la elaboración de manuales explicativos de cada una de las partes del estudio.

5.10. Consideraciones éticas y confidencialidad

De acuerdo con la Declaración de Helsinki (Rev. Hong Kong, septiembre de 1989), las Buenas Prácticas Clínicas de la CEE (Documento 111/3976/88 de julio de 1990) y la normativa española vigente en materia de investigación clínica en humanos (Real Reglamento de Ensayos Clínicos, Decreto 561/1993), este estudio se llevó a cabo tras la evaluación y aprobación del Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Además, aparte de la explicación detallada en los manuales disponibles, se obtendrá el consentimiento informado por escrito de cada individuo y de sus familiares antes de iniciar el estudio en cada una de las residencias.

Toda aquella información generada durante el estudio, incluyendo los resultados de los cuestionarios, manuales, bases de datos, análisis, etc. Estará protegido del uso no autorizada por personas externas a la investigación. De esta forma, toda la documentación será estrictamente confidencial, pudiendo ser inspeccionada por las autoridades del sector sanitario.

5.11. Política de publicación

Los resultados de la investigación se difundirán en revistas internacionales de alto impacto, en línea con la trayectoria del equipo investigador. Además, los resultados se difundirán tanto en congresos nacionales como internacionales. Todo el equipo investigador, según su grado de implicación en el proyecto, participará de la autoría de estas actividades de difusión.

5.12. Limitaciones del estudio

Entre las limitaciones del presente proyecto, se encuentra el tamaño poblacional, el cual podría haberse aumentado con el involucramiento de más residencias de España, los factores externos que puedan influenciar en la adherencia a la intervención nutricional, la gran variabilidad de niveles de demencia dentro de la población de estudio y la situación dietética de partida, en la que los ancianos seguían dietas muy

distintas según la residencia en la que estaban institucionalizados. Esta última limitación intentó compensarse mediante el diseño de una dieta que reuniese los componentes de todas las dietas seguidas por las distintas residencias, creando un grupo control útil para realizar las comparaciones pertinentes.

Otra de las limitaciones recae en el tiempo de duración de la intervención nutricional, la cual podría ser insuficiente para observar efectos significativos en la funcionalidad cognitiva de los pacientes. El presente estudio se centra únicamente en el efecto de la intervención nutricional basada en la dieta mediterránea, pero la inclusión de otros factores como los suplementos vitamínicos o el ejercicio físico podrían resultar en mayores beneficios sobre la demencia de los ancianos.

6. Plan de Trabajo

El presente estudio pretende dar respuesta a las preguntas fundamentales: ¿Cuáles son los beneficios de la dieta mediterránea en la demencia? ¿Cuáles son los mecanismos detrás de estos beneficios? ¿Cuáles son las variables más sensibles a la intervención nutricional MEDPRO? ¿Afecta a la microbiota intestinal? ¿Cuáles son las fuentes proteicas más beneficiosas? ¿Cómo se correlacionan las diferentes variables estudiadas con el grado de demencia?

6.1. Listado de tareas

TAREA 1: Promoción de la adherencia

Para asegurar la adherencia de los grupos DM, DMC y DMP en las residencias, se proporcionó un curso formativo de 10 horas a los trabajadores involucrados en el cuidado dietético de los pacientes, así como a los cocineros y enfermeras. Además, se repartieron folletos informativos y completos sobre la dieta a seguir, los cuales fueron diseñados y revisados por profesionales dietéticos.

El personal dietista proporcionará la información sobre el beneficio de la dieta mediterránea a la plantilla de la residencia y los individuos involucrados, destacando las ventajas de su seguimiento y transmitiendo un mensaje positivo sobre el beneficio de la dieta en la funcionalidad cognitiva de los ancianos. Las charlas informativas motivarán a seguir las recomendaciones de la dieta mediterránea, apoyándose por la posibilidad de que los ancianos institucionalizados puedan mejorar sus capacidades cognitivas o

prevenir la gravedad de la enfermedad. Además, se les informará sobre las importantes implicaciones de los resultados del estudio de cara a la salud de la población envejecida.

SESIÓN 1: “Hábitos de vida saludables”.

SESIÓN 2: “Grupos de alimentos en la dieta mediterránea”. Se describirá la pirámide alimenticia de la dieta mediterránea para que conozcan cuáles son las cantidades recomendadas y en las que se centrará el presente estudio.

SESIÓN 3: “El Proyecto MEDPRO”. Durante esta sesión se hablará de los puntos más importantes del proyecto, exponiendo el contexto actual, las necesidades de la realización del mismo y las implicaciones que supondrá.

Además de las charlas informativas a los profesionales implicados en el estudio, la idea es que los familiares de los participantes también estén debidamente informados, por lo que serán invitados a las charlas y se les proporcionarán folletos informativos y las grabaciones de las sesiones en caso de que no logren asistir.

TAREA 2: Visitas a los participantes y citas médicas

Para la obtención de los resultados durante el seguimiento de los ancianos, se requerirá de la participación de cuatro dietistas y cuatro enfermeros por residencia involucrada. Durante estas visitas, se rellenarán los cuestionarios y se llevarán a cabo las actividades diseñadas para evaluar la funcionalidad cognitiva, se obtendrán las muestras biológicas, se recogerán las posibles incidencias anotadas por los trabajadores de la residencia y se asegurará de que los ancianos involucrados siguen el estudio correctamente.

En la primera visita y antes de empezar la intervención, los ancianos involucrados serán entrevistados para conocer su estado neurológico y dietético. Asimismo, se le informará sobre los beneficios de la dieta mediterránea, sea del grupo control o del grupo intervenido. En todo momento, los dietistas no sabrán a qué grupo pertenece cada paciente entrevistado. Este personal será el encargado de transportar las muestras biológicas del primer día de estudio de todos los individuos involucrados, las cuales serán extraídas y numeradas con los correspondientes códigos por el personal de enfermería de la residencia. Durante el primer mes tras el reclutamiento, los individuos serán enviados al hospital para obtener las imágenes cerebrales que informarán sobre la funcionalidad cognitiva de los pacientes al inicio del estudio.

Debido a que los cuestionarios y la recogida de muestras biológicas no suponen un riesgo adverso para los ancianos, este control se realizará mediante una visita cada tres meses durante los 3 años de estudio. De forma contraria y debido al coste de transporte y la exposición radiológica, las imágenes neurológicas se obtendrán al inicio y una vez al año en el mes de octubre. En caso de que alguno de los sujetos de estudio abandone el proyecto antes de finalizar, se recogerán muestras biológicas y las imágenes radiológicas la misma semana. De este modo, aseguramos la disposición de los resultados al inicio, durante y al final del proyecto para cada individuo.

Mediante el análisis de biomarcadores cerebrales sanguíneos, los cambios de la microbiota intestinal y la interpretación de las imágenes PET se buscarán las diferencias significativas con respecto al punto inicial del estudio, identificando aquellas variables que presenten los p-valores más significativos y por tanto nos indiquen el mayor efecto de la dieta mediterránea y de la calidad proteica en la función cognitiva y la demencia.

TAREA 3: Estudio de los biomarcadores sanguíneos

TAREA 3.1. Biomarcadores sanguíneos de la demencia: Los posibles cambios en los biomarcadores cerebrales b-amiloide, p-tau181 y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) indicarán el efecto de la intervención nutricional y la calidad proteica en la demencia. Las técnicas de espectrometría de masas, Simoa® y ELISA serán utilizadas para obtener los valores de interés. Al inicio del estudio, se evaluarán los niveles de partida de estos tres biomarcadores en los ancianos involucrados en el estudio. Dado que se habrán seleccionado aquellos individuos con demencia, se espera que estos biomarcadores se encuentren alterados, indicando niveles leves o graves de demencia y Alzheimer. El análisis se llevará a cabo por el centro de investigación de la Universidad de Murcia. Por lo tanto, mediante la intervención nutricional se pretende regular los niveles de alguno de estos tres biomarcadores, ralentizando el avance de la demencia en los ancianos institucionalizados.

TAREA 3.2. Otros análisis de sangre: asimismo, se controlarán las posibles alteraciones en el perfil lipídico y el perfil metabólico-nutricional de los ensayos, así como mediante el estudio hematológico con el objetivo de controlar posibles efectos adversos derivados de la intervención nutricional que puedan poner en peligro la salud del sujeto de estudio.

TAREA 3.3. Análisis bioinformático: mediante los análisis estadísticos con el uso de programas bioinformáticos llevados a cabo por la unidad de estadística, se detectarán las correlaciones significativas entre las variables analizadas y el grado de demencia del individuo. Los análisis multivariantes ayudarán a discriminar entre el gran número de variables y ayudarán a crear una “firma” que ayude en el diagnóstico y la evaluación del nivel de demencia.

TAREA 4: Estudio de los cambios en la microbiota intestinal en los pacientes intervenidos

TAREA 4.1. Detección de las poblaciones microbianas: a partir de las muestras fecales, se generarán las librerías y se analizarán mediante el software QIIME y la versión 0.9.3 de EMPeror. Al igual que con los análisis de biomarcadores sanguíneos, los investigadores serán los responsables de esta actividad. De esta manera, se identificarán aquellas poblaciones que se correlacionen de forma significativa con el grado de demencia de los ancianos y se comprobará si la intervención nutricional tiene un efecto significativo en esta flora intestinal.

TAREA 4.2. Estudio de la actividad metabólica microbiana: de forma paralela, se explorarán las actividades metabólicas de estas comunidades mediante PICRUSt.

TAREA 4.3. Análisis específico poblacional: a partir de las librerías generadas, se comprobará la presencia de las poblaciones *Bifidobacterium*, *Lachnobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Akkermansia*, *Slackia*, *Christensenellaceae* y *Erysipelotriaceae*, especies que se han relacionado con el aumento o la reducción de biomarcadores de Alzheimer en el fluido cerebroespinal.

TAREA 5: Cambios neurológicos derivados de la dieta registrados por imágenes PET

Actualmente, se necesitan más estudios que asocien las imágenes PET a los demás biomarcadores, por lo que el presente proyecto aportará información valiosa que ayudará a conocer el grado de fiabilidad de los biomarcadores propuestos, así como el efecto de la dieta mediterránea en el progreso de dichas placas.

Los ancianos involucrados en el estudio serán llevados a los correspondientes hospitales para tomar las imágenes PET al inicio y al final del estudio. De esta forma,

los médicos y médicos investigadores del hospital interpretarán los resultados y valorarán el progreso de las placas.

TAREA 6: Cambios en el nivel cognitivo mediante los cuestionarios

Al igual que con el análisis de las muestras biológicas, los ancianos serán evaluados por el personal de enfermería y dietética mediante cuestionarios y actividades para conocer su grado de demencia cada 3 meses. Además del grado de demencia indicado en sus historiales médicos, estas pruebas ayudarán a conocer de manera más específica cuáles son sus habilidades cognitivas y podrán ser evaluadas a lo largo del estudio con el objetivo de detectar mejoras asociadas a la intervención nutricional.

TAREA 7: Correlación entre las variables analizadas y los cambios derivados de la intervención nutricional

Al final del estudio, se acabarán de completar todos los datos obtenidos a lo largo de los años, siendo revisados correctamente antes de su análisis. Mediante los softwares de R y SPSS, la unidad de estadística realizará un exhaustivo análisis que incluya la detección de las variables más sensibles al efecto de la intervención nutricional, análisis de correlaciones y gráficos temporales en los que se observen los cambios de forma progresiva, entre otros análisis.

Impacto de los resultados (TAREAS 1-7)

Los resultados extraídos de estos análisis servirán por un lado para confirmar la fiabilidad de estas moléculas como biomarcadores de demencia, puesto que serán relacionadas con las imágenes PET. Por otro lado, aportará información valiosa sobre la microbiota intestinal como indicadora de la demencia. Por último y como objetivo principal, los resultados aportarán datos importantes sobre el efecto de la intervención de la dieta mediterránea en el grado de demencia de los ancianos institucionalizados en comparación con las dietas habituales de las residencias.

TAREA 8: Evaluación de la calidad y cantidad proteica de la dieta mediterránea en la funcionalidad cognitiva

Con la asignación de dos grupos diferentes que reciban una intervención nutricional según la fuente proteica (carne o pescado), se analizarán los cambios en los biomarcadores cerebrales, la microbiota intestinal, la puntuación de los test cognitivos y las imágenes PET de la misma forma que en el Objetivo 1 (**TAREAS 3-7**). Del mismo

modo, se llevarán a cabo los análisis estadísticos correspondientes para observar las correlaciones entre la fuente proteica principal y las distintas variables estudiadas.

Esta parte del estudio ayudará a completar la información sobre los beneficios de la dieta mediterránea en la población de ancianos institucionalizados con demencia de una forma más específica, ya que se centra en la calidad de las fuentes proteicas.

Impacto de los resultados (TAREA 8)

La posible identificación de las fuentes proteicas de la dieta mediterránea que aporten más beneficios a nivel cognitivo en los ancianos con demencia podría conllevar el diseño de dietas mediterráneas específicas para esta parte de la población. Además, ayudaría a esclarecer las dudas sobre el nivel de ingesta de carne y la calidad proteica en relación con los beneficios contra el Alzheimer y la demencia.

A modo de resumen, la siguiente tabla muestra de qué forma responderán las diferentes tareas a los objetivos planteados en el presente estudio. Además, se describen cuáles serán los instrumentos o métodos que permitirán extraer las conclusiones.

Tabla 8. Resumen de los pasos del estudio que responderán a los objetivos específicos planteados.

| Objetivo | Tareas |
|---|--|
| <p><u>Objetivo específico 1</u></p> <p>Analizar los cambios en los biomarcadores cerebrales de la población de estudio.</p> | <p><u>TAREA 3: Estudio de los biomarcadores sanguíneos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ 3.1. Biomarcadores sanguíneos de la demencia ➤ 3.2. Otros análisis de sangre ➤ 3.3. Análisis bioinformático <p><u>TAREA 7: Evaluación de la calidad y cantidad proteica de la dieta mediterránea en la funcionalidad cognitiva</u></p> |
| <p><u>Objetivo específico 2</u></p> <p>Comprobar los cambios en la microbiota intestinal de los ancianos involucrados.</p> | <p><u>TAREA 4: Estudio de los cambios en la microbiota intestinal en los pacientes intervenidos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ 4.1. Detección de las poblaciones microbianas |

| | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> ➤ 4.2. Actividad metabólica microbiana ➤ 4.3. Análisis específico poblacional <p><u>TAREA 8: Evaluación de la calidad y cantidad proteica de la dieta mediterránea en la funcionalidad cognitiva</u></p> |
| <p><u>Objetivo específico 3</u></p> <p>Conocer los cambios a nivel neurológico (PET y cuestionarios) derivados de la intervención nutricional.</p> | <p><u>TAREA 5: Cambios neurológicos derivados de la dieta registrados por imágenes PET</u></p> <p><u>TAREA 6: Cambios en el nivel cognitivo mediante cuestionarios</u></p> <p><u>TAREA 8: Evaluación de la calidad y cantidad proteica de la dieta mediterránea en la funcionalidad cognitiva</u></p> |
| <p><u>Objetivo específico 4</u></p> <p>Analizar estadísticamente las correlaciones entre los biomarcadores, la microbiota y las imágenes PET.</p> | <p><u>TAREA 7: Correlación entre las variables analizadas y los cambios derivados de la intervención nutricional</u></p> <p><u>TAREA 8: Evaluación de la calidad y cantidad proteica de la dieta mediterránea en la funcionalidad cognitiva</u></p> |

6.2 Cronograma

Durante los primeros tres meses de estudio, se llevará a cabo el reclutamiento de los ancianos institucionalizados en cada una de las residencias involucradas. Tras aplicar los criterios de exclusión e inclusión y seleccionados los sujetos de estudio, se les extraerá las muestras de sangre y heces para los correspondientes análisis, se les realizará la prueba de imagen PET en el hospital y se les realizará el cuestionario de nivel de cognición. De esta forma, obtendremos los resultados basales de inicio del estudio que serán comparados con el resto de resultados obtenidos a lo largo de los 3 años.

Aprovechando estos meses iniciales, se impartirá la formación a los profesionales involucrados en el estudio, además de repartir los manuales correspondientes. Así, todo el personal estará convenientemente preparado para llevar a cabo las distintas fases del proyecto.

Una vez recogidos todos los datos y al mismo tiempo que se pasen de forma organizada a las bases de datos, se asignarán los grupos de intervención y el grupo control y empezará la parte intervencional del estudio. A partir de este momento hasta septiembre del tercer año de proyecto, los grupos seguirán las dietas que les corresponda, manteniendo la máxima adherencia en todo momento. Desde marzo del primer año hasta septiembre del tercer año, se obtendrán las muestras biológicas de sangre y heces, así como las imágenes PET. Estas muestras serán analizadas a medida que se vayan obteniendo con cada tres meses transcurridos.

A partir del mes de septiembre del tercer año y recogidos todos los datos mensuales y de imagen PET, se procederá a los análisis estadísticos para obtener las conclusiones definitivas del estudio. Con tal de acelerar estos análisis, la mayor parte ya se habrá realizado conforme se obtenían los datos mensuales y durante los dos primeros años de estudio, pero no será hasta los últimos meses del tercer año que se obtendrán los resultados finales y la publicación de los mismos.

Los distintos pasos del plan de trabajo que responderán a los objetivos planteados se llevarán a cabo de forma paralela desde el inicio hasta el final del estudio, con un continuo seguimiento, integración de los resultados en las bases de datos y análisis estadísticos.

Por último se redactarán las conclusiones del estudio de intervención y se realizará la publicación de los resultados en revistas de alto impacto y en las bases de datos universitarias.

En la siguiente tabla se muestra el calendario de actividades en las visitas a los participantes y las citas médicas al hospital:

Tabla 9. Calendario de recogida de muestras biológicas, citas médicas y cuestionarios. Las recogida de muestras biológicas se muestra en amarillo (sangre) y verde (heces) cada tres meses. La obtención de los cuestionarios y test se marca en naranja cada tres meses. Por último, en azul, se marcan las citas médicas para la obtención de imágenes PET al inicio del estudio y una vez al año en el mes de octubre.

| Año | Ene | Feb | Mar | Abr | May | Jun | Jul | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |

7. Aportaciones del estudio

Este proyecto tiene los objetivos principales de conocer los beneficios de la dieta mediterránea en el deterioro cognitivo de ancianos institucionalizados, evaluando además la repercusión de la calidad y cantidad proteica. Las diferentes intervenciones nutricionales planteadas en el estudio pretenden responder a las preguntas planteadas.

En relación a los resultados que se obtengan de esta intervención, servirán para aportar información y confirmar los beneficios de la dieta mediterránea a nivel de biomarcadores sanguíneos de demencia, microbiota intestinal asociada a los biomarcadores de Alzheimer y neuroimagen PET. Las conclusiones del proyecto servirán para motivar a las residencias y a la población envejecida a adoptar cambios en la dieta, diseñar nuevas estrategias nutricionales de prevención y de tratamiento y a utilizar los biomarcadores propuestos en los futuros ensayos.

Estos resultados serán redactados apropiadamente para su publicación en revistas de alto impacto. Además, estos resultados serán expuestos tanto en las webs de los hospitales y las universidades involucradas como en congresos y jornadas científicas. De esta forma, tanto la comunidad científica como la no científica podrán informarse sobre los resultados extraídos y acceder a los links disponibles sobre las recomendaciones de la dieta mediterránea, los cuales podrán ser descargables en formato de dietas fácilmente entendibles y con un fácil seguimiento.

Como una de las fortalezas principales de este programa, la combinación de cuatro métodos distintos (cuestionarios, PET, biomarcadores sanguíneos y microbiota intestinal) lo convierten en uno de los proyectos más completos. Mientras que otros estudios se centran en uno o más métodos de evaluación, el presente proyecto pretende incluir la mayor cantidad de variables posibles relacionadas con la funcionalidad cognitiva, con el objetivo de revelar los mecanismos por los cuales la dieta mediterránea aporta sus beneficios. Además, los biomarcadores intestinales y sanguíneos surgieron recientemente, por lo que su incorporación en el proyecto MEDPRO le otorgará mayor valor científico e innovador.

ANEXO I

Test de nivel cognitivo

Código del paciente:

Fecha:

Paso 1: Memorización de palabras

Mirar directamente al residente y decir “Por favor, escuche atentamente. Voy a decir tres palabras que quiero que me repitas e intentes recordar. Estas palabras son (seleccionar palabras de una de las versiones). Por favor, repítelas”. Si la persona no es capaz de repetir las después de tres intentos, pasar al paso 2.

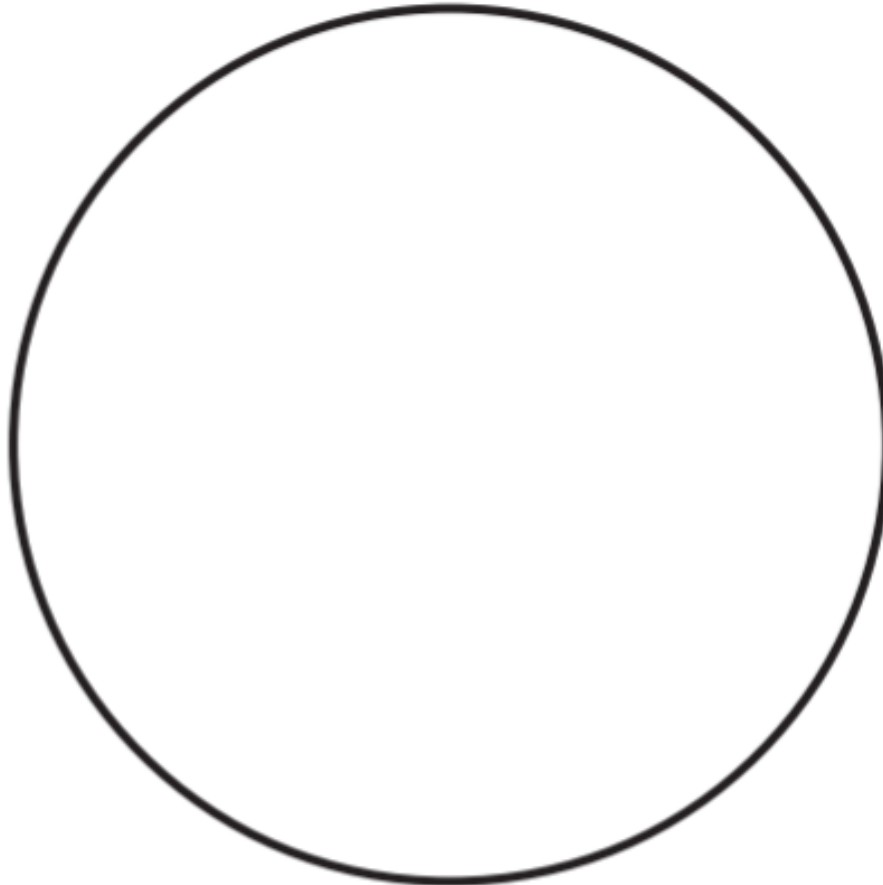
Las siguientes palabras se han utilizado en estudios clínicos (1-3).

| Versión 1 | Versión 2 | Versión 3 | Versión 4 | Versión 5 | Versión 6 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Silla | Líder | Ciudad | Río | Capitán | Hija |
| Amanecer | Estación | Cocina | Nación | Jardín | Cielo |
| Plátano | Tabla | Bebé | Dedo | Imagen | Montaña |

Paso 2: Dibujo del reloj

Decir: “Ahora quiero que dibujes un reloj. Primero, pon todos los números en la posición correcta”. Cuando lo complete, continuar “Ahora, pon las manecillas a las 11 y cuarto”.

Para este ejercicio se debe utilizar la plantilla mostrada a continuación. Repetir las instrucciones las veces que sea necesario. Pasar al siguiente paso si el reloj no queda completado antes de 3 minutos



Paso 3: Actualidad

“¿Puedes decirme alguna noticia que haya ocurrido recientemente?”

(Recientemente = la pasada semana. Si responde con un dato general, como por ejemplo “una guerra” o “ha llovido mucho”, preguntar por los detalles. Tan sólo cuentan las respuestas específicas.

Paso 4: Memoria

Se le pide a la persona que diga las tres palabras que había memorizado inicialmente en el Paso 2. Decir: “¿Cuáles eran las tres palabras que te he pedido que memorices?” Apuntar la versión elegida y las respuestas del residente.

| | | | | | |
|-----------------|--|--------------------|--|--|--|
| Versión: | | Respuestas: | | | |
|-----------------|--|--------------------|--|--|--|

Puntuación final

| Paso | Detalles de la respuesta | Puntos |
|------------------------------|---|--------|
| Paso 1 (0-3 puntos) | 1 punto por palabra correcta | |
| Paso 2 (0 o 2 puntos) | Reloj normal = 2 puntos. Un reloj normal debe tener todos los números dispuestos de forma correcta, sin duplicados ni posiciones vacías. Las manecillas bene señalar a la hora indicada. La longitud de las manecillas no se puntúa. Si no es capaz de dibujar el reloj o se niega a hacerlo, se darán 0 puntos | |
| Paso 3 (0-1 puntos) | Dar un punto si la respuesta es válida | |
| Puntuación total | | |