



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Tecnología de la
Alimentación y Nutrición

Diseño de una bebida con elevado contenido en
polifenoles y estudio de su efecto sobre la evolución
del estrés oxidativo en enfermos de Alzheimer

Autor:

D. José Miguel Rubio Pérez

Directores:

Dra. Dña. Juana María Morillas Ruiz

Dra. Dña. Pilar Zafrilla Rentero

Murcia, diciembre de 2015



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES
DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN COMO COMPENDIO
DE PUBLICACIONES**

La Dra. Dña. Juana María Morillas Ruiz y la Dra. Dña. Pilar Zafrilla Rentero, como Directoras de la Tesis Doctoral titulada “Diseño de una bebida con elevado contenido en polifenoles y estudio de su efecto sobre la evolución del estrés oxidativo en enfermos de Alzheimer”, realizada por D. José Miguel Rubio Pérez en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autorizan su presentación a trámite como compendio de publicaciones**, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 16 de octubre de 2015.

Dra. Dña. Juana María Morillas Ruiz

Dra. Dña. Pilar Zafrilla Rentero



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

La presente tesis doctoral titulada “Diseño de una bebida con elevado contenido en polifenoles y estudio de su efecto sobre la evolución del estrés oxidativo en enfermos de Alzheimer” es un compendio de trabajos previamente publicados o aceptados para su publicación.

- Artículos que constituyen el cuerpo de la tesis:

Artículo 1

Rubio-Perez, J. M., Vidal-Guevara, M. L., Zafrilla, P., & Morillas-Ruiz, J. M. (2014). A new antioxidant beverage produced with green tea and apple. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(5), 552-557.

Artículo 2

Rubio-Perez, J. M., Albaladejo, M. D., Zafrilla, P., Vidal-Guevara, M. L., & Morillas-Ruiz, J. M. (2015). Effects of an antioxidant beverage on biomarkers of oxidative stress in Alzheimer’s patients. *European Journal of Nutrition*, doi:10.1007/s00394-015-1024-9

Artículo 3

Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2013). Serum cytokine profile in Alzheimer’s disease patients after ingestion of an antioxidant beverage. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 12(8), 1233-1241.

- Otros artículos publicados o aceptados para su publicación derivados del proyecto de tesis:

Artículo 4

Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2014). Oxidative damage in Alzheimer's disease. *Therapeutic Targets for Neurological Diseases*, doi: 10.14800/ttnd.246

Artículo 5

Rubio-Perez, J. M., Zafrilla, P., Palacio-Vales, P., & Morillas-Ruiz, J. M. (2013). Nutritional evaluation of daily intake in Alzheimer's patients. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63(suppl 1), 1175.

Artículo 6

Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *The Scientific World Journal*, 2012, 756357.

Artículo 7

Morillas-Ruiz, J. M., Rubio-Perez, J. M., Albaladejo, M. D., Zafrilla, P., Parra, S., & Vidal-Guevara, M.L. (2010). Effect of an antioxidant drink on homocysteine levels in Alzheimer's patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 299(1-2), 175-178.

Artículo 8

Zafrilla, P., Morillas, J. M., Rubio-Perez, J. M., & Cantos Villar, E. (2009). Ingredients for functional drinks in neurodegenerative diseases: a review. *Natural Product Communications*, 4(5), 719-740.

- Capítulos de libros:

Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2014). Proceso inflamatorio en la enfermedad de Alzheimer. Papel de las citoquinas. En García Rodríguez, J. C. (Ed.), *Neuroprotección en enfermedades Neuro y Heredo degenerativas* (pp. 121-156). 1ª ed. Barcelona, España: OmniaScience.

- Comunicaciones a congresos nacionales e internacionales:

1. Rubio-Perez, J. M., Zafrilla, P., Palacio-Vales, P., & Morillas-Ruiz, J. M. Nutritional evaluation of daily intake in Alzheimer's patients. IUNS 20th International Congress of Nutrition, 09/2013.
2. Rubio-Perez, J. M., Vidal-Guevara, M. L., Zafrilla, P., & Morillas-Ruiz, J. M. Diseño de una bebida rica en antioxidantes a partir de té verde y manzana. I Simposio Mediterráneo: Nutrición, Dietética e Innovación, 10/2012 (***Premio a la mejor Comunicación Científica***).
3. Rubio-Perez, J. M., Morillas-Ruiz, J. M., Albaladejo, M. D., Zafrilla, P., & Vidal-Guevara, M. L. Effect of a drink rich in polyphenols on biomarkers of inflammation in healthy elderly people. 5th International Conference on Polyphenols and Health, 10/2011.
4. Rubio-Perez, J. M., Morillas-Ruiz, J. M., Zafrilla, P., Vidal-Guevara, M. L., & Albaladejo, M. D. Influencia del consumo de una bebida antioxidante sobre el riesgo cardiovascular en enfermos de Alzheimer. VII Congreso Internacional de Nutrición, Alimentación y Dietética, 03/2011 (***Premio a la mejor Comunicación Científica***).

5. Morillas-Ruiz, J. M., Rubio-Perez, J. M., Zafrilla, P., Albaladejo, M. D., Parra, S., & Vidal-Guevara, M. L. Produits d'oxydation de lipides chez les malades d'Alzheimer après l'ingestion d'une boisson riche en polyphénols. 4ème Congrès de la Société Française de Nutrition, 12/2009.
6. Morillas-Ruiz, J. M., Rubio-Perez, J. M., Zafrilla, P., Albaladejo, M. D., Parra, S., Vidal-Guevara, M. L. Effets d'une boisson riche en polyphénols au niveau des enzymes antioxydantes chez les malades d'Alzheimer. 4ème Congrès de la Société Française de Nutrition, 12/2009.
7. Morillas-Ruiz, J. M., Rubio-Perez, J. M., & Zafrilla, P. Determination of peripheral inflammatory markers in patients with Alzheimer disease. Sixth International Congress on Vascular Dementia, 11/2009.
8. Morillas-Ruiz, J. M., Rubio-Perez, J. M., Albaladejo, M. D., Parra, S., & Zafrilla, P. Nutritional evaluation and biochemical parameters in older Spanish subjects. 19th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, 07/2009.
9. Morillas-Ruiz, J. M., Rubio-Perez, J. M., Albaladejo, M. D., Parra, S., & Zafrilla, P. Biomarkers of oxidative stress in older healthy Spanish subjects. 19th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, 07/2009.
10. Rubio-Perez, J. M., Morillas-Ruiz, J. M., Zafrilla, P., Albaladejo, M. D., Parra, S., & Vidal-Guevara, M. L. Efecto de un zumo rico en polifenoles sobre los niveles de homocisteína en enfermos de Alzheimer. V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 05/2009.
11. Figueroa, F., Morillas-Ruiz, J. M., Zafrilla, P., & Rubio-Perez, J. M. Ingesta de antioxidantes dietéticos en enfermos de Alzheimer. VI Congreso Internacional de Alimentación, Nutrición y Dietética y 3º Simposio de Alimentos Funcionales, 04/2008.

AGRADECIMIENTOS

Hace ya unos años, comenzaba en mi vida una nueva etapa, llena de ilusión, emociones y esperanzas. Ahora, esa etapa termina con la presentación de esta Tesis Doctoral. El camino recorrido ha sido largo, con muchos momentos ilusionantes y satisfactorios, pero también con momentos frustrantes y de mucho estrés.

Me gustaría dejar patente mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido para que esta Tesis sea una realidad.

Quiero comenzar mostrando todo mi agradecimiento a la Dra. Juana María Morillas Ruiz, directora y principal responsable de esta Tesis, por haberme permitido aprender tantas cosas desde que fui alumno suyo, por su ejemplo de profesionalidad, entereza y espíritu de lucha, por haber confiado en mí en todo momento, por su ayuda y sus consejos tanto a nivel profesional como personal, y por haberme tratado como a un hijo más. He crecido como persona a tu lado y mi trayectoria investigadora te la debo a ti, gracias de corazón.

Quisiera mostrar también mi agradecimiento a la Dra. Pilar Zafrilla Rentero, codirectora de esta Tesis, por toda su ayuda, y por el apoyo y los conocimientos que me ha transmitido.

A la Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM), y a su Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, por haberme acogido tan bien desde que inicié mis estudios, y por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral.

A la Fundación Séneca (Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia) por la concesión de mi beca predoctoral, y a la Consejería de Educación y Cultura de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, que ha proporcionado la financiación necesaria para el desarrollo del proyecto.

A Hero España, S.A., por su colaboración científica con la UCAM, y en especial a María Luisa Vidal y al equipo de Investigación & Desarrollo de Hero España, S.A., por su ayuda en el diseño y en el desarrollo de la bebida.

A los directores de las Asociaciones de Alzheimer que colaboraron en el proyecto, y a todos los voluntarios (pacientes y cuidadores) que participaron en el estudio, porque sin su inestimable colaboración esta Tesis no hubiera sido posible.

A Gabi y a Alfonso, por su gran ayuda en los laboratorios del Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición de la UCAM.

A Jose, Paco, María del Carmen, Soledad e Ignacio, del laboratorio de Bioquímica General del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, y en especial a María Dolores, una de las mejores profesionales que conozco y una gran persona, muchas gracias por todo.

A Patricia y Pilar, sin vosotras los desayunos no hubieran sido lo mismo. Porque llenasteis de alegría mis mañanas en el despacho y cambiasteis el concepto de ir a trabajar.

A Marta, mi gran amiga y confidente, porque hemos vivido juntos el difícil trabajo que conlleva una Tesis Doctoral. Gracias por estar ahí cuando lo he necesitado.

A Rocío, la mejor compañera de piso del mundo. Gracias por tu apoyo en los momentos duros, por tus consejos y por escucharme.

A todos mis amigos, porque sois los mejores amigos del mundo. Muchas gracias por vuestro cariño y apoyo.

A mis padres y a mi hermana, por su comprensión, paciencia y gran cariño. Gracias por haberme apoyado en todo momento en este largo y complicado camino. Os quiero mucho.

Y finalmente a ti, María Eugenia, por estar a mi lado y apoyarme en los momentos más difíciles, por creer en mí, por tus ánimos y mimos, y por hacerme sentir especial cada día. Gracias por ayudarme a organizarme con tus "plannings". Sin ti no podría haber acabado esta Tesis. Te quiero mucho, eres mi vida.

¡Muchas gracias a todos!

*“Mientras el cerebro sea un misterio,
el universo continuará siendo un misterio”*

Santiago Ramón y Cajal

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	21
SIGLAS Y ABREVIATURAS	27
1. INTRODUCCIÓN	33
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	37
2.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	37
2.1.1. Historia de la enfermedad	37
2.1.2. Aspectos generales de la enfermedad	39
2.1.3. Epidemiología y prevalencia	40
2.1.4. Factores predisponentes	43
2.1.5. Cambios neuropatológicos macroscópicos	45
2.1.6. Cambios neuropatológicos microscópicos	45
2.1.6.1. Ovillos neurofibrilares y τ	46
2.1.6.2. Depósitos amiloides y $A\beta$	47
2.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO	48
2.2.1. Los radicales libres	48
2.2.2. Especies oxidantes	49
2.2.2.1. Radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	51
2.2.2.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	52
2.2.2.3. Radical hidroxilo (OH^{\bullet})	53
2.2.2.4. Radical peroxilo (ROO^{\bullet})	53

2.2.2.5. Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).....	54
2.2.2.6. Radical óxido nítrico (NO^\bullet).....	54
2.2.2.7. Dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet).....	55
2.2.3. Concepto de estrés oxidativo	55
2.2.4. Daño sobre biomoléculas	56
2.2.4.1. Daño oxidativo a lípidos.....	57
2.2.4.2. Daño oxidativo a proteínas.....	58
2.2.4.3. Daño oxidativo al ADN.....	58
2.2.4.4. Daño oxidativo a glúcidos.....	59
2.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	59
2.3.1. Oxidación de las proteínas.....	60
2.3.2. Oxidación de los lípidos.....	62
2.3.3. Oxidación de los glúcidos.....	65
2.3.4. Oxidación del ADN y ARN.....	65
2.4. LA INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	67
2.4.1. La microglía.....	70
2.4.2. Los astrocitos.....	72
2.4.3. El sistema del complemento.....	72
2.4.4. Las quimioquinas.....	74
2.4.5. Las neuronas.....	75
2.4.6. Las citoquinas.....	76
2.4.6.1. Citoquinas proinflamatorias.....	78
2.4.6.2. Citoquinas antiinflamatorias.....	80
2.4.7. Factores de crecimiento.....	82

2.5. SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES.....	84
2.5.1. Definiciones y clasificaciones	84
2.5.2. Mecanismo de acción	87
2.5.3. Antioxidantes endógenos	89
2.5.3.1. SOD.....	89
2.5.3.2. CAT.....	90
2.5.3.3. GPx y glutatión reductasa	90
2.5.3.4. GSH.....	91
2.5.3.5. Melatonina	92
2.5.3.6. Ácido α -lipoico.....	93
2.5.3.7. Ubiquinona	94
2.5.4. Antioxidantes exógenos	94
2.5.4.1. Ácido ascórbico	94
2.5.4.2. Vitamina E	96
2.5.4.3. Beta-caroteno	97
2.5.4.4. Compuestos polifenólicos.....	98
2.5.4.5. Selenio	102
2.5.4.6. Zinc	102
2.5.4.7. Cobre	103
2.6. BEBIDAS FUNCIONALES CON ANTIOXIDANTES.....	103
2.6.1. Definición de alimento funcional	103
2.6.2. Legislación	105
2.6.3. Bebidas funcionales antioxidantes	108
3. JUSTIFICACIÓN	113

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	117
5. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	121
Art. 1: A new antioxidant beverage produced with green tea and apple.....	121
Art. 2: Effects of an antioxidant beverage on biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's patients.....	127
Art. 3: Serum cytokine profile in Alzheimer's disease patients after ingestion of an antioxidant beverage.....	139
6. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	151
6.1. DISEÑO DE LA BEBIDA ANTIOXIDANTE Y DE LA BEBIDA PLACEBO.....	151
6.2. EFECTO DE LA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO	156
6.2.1. Efecto sobre el TAS.....	156
6.2.2. Efecto sobre las enzimas antioxidantes	157
6.2.3. Efecto sobre la oxidación del ADN.....	159
6.2.4. Efecto sobre la oxidación proteica	159
6.2.5. Efecto sobre la oxidación lipídica	160
6.3. EFECTO DE LA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE LA INFLAMACIÓN.....	161
6.3.1. Efecto sobre las citoquinas proinflamatorias	161
6.3.2. Efecto sobre las citoquinas antiinflamatorias.....	163
7. CONCLUSIONES	167
8. BIBLIOGRAFÍA	171
8.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	171
8.2. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	219
9. CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES.....	227

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Tabla 2.1: Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno citotóxicas	52
Figura 2.1: Dr. Alois Alzheimer	37
Figura 2.2: Sra. Auguste Deter	37
Figura 2.3: Atrofia de la corteza cerebral en la EA	38
Figura 2.4: Placas seniles y ovillos neurofibrilares en la corteza cerebral de un paciente con EA.....	38
Figura 2.5: La reducción del oxígeno molecular.....	50
Figura 2.6: Posibles lesiones celulares debidas al estrés oxidativo	56
Figura 2.7: Oxidación de lípidos	57

ARTÍCULO 1

Tabla 1: Ingredients used in the formulation of the antioxidant beverage (% of total)	122
Tabla 2: Stability of CIEL* <i>a</i> * <i>b</i> * values in the prepared beverage during the storage period.....	123
Tabla 3: Values of phenolic acids, flavan-3-ols, proanthocyanidins, dihydroxychalcones, flavonols and total phenolic compounds of the antioxidant beverage in the initial and final storage period at 25 °C in darkness	124

Figura 1: Changes in ascorbic acid content (mg/L) in the prepared antioxidant beverage during 240 days of storage at 4 °C and 25 °C in darkness.....	124
Figura 2: Changes in antioxidant activity (mM Trolox) in the prepared antioxidant beverage during 240 days of storage at 4 °C and 25 °C in darkness.....	124

ARTÍCULO 2

Tabla 1: Ingredients used in the formulation of the antioxidant beverage and the placebo beverage (% of total).....	129
Tabla 2: Descriptive statistics of the study population	131
Tabla 3: Basal analytical parameters measured in serum and BMI of subjects (controls and AD patients).....	132
Tabla 4: Levels of biomarkers measured in serum, lysed erythrocytes and urine of subjects (controls and AD patients) at initial period of the study.....	132
Tabla 5: Levels of biomarkers measured in serum and urine of subjects (controls and AD patients) at initial, middle and final period of ingestion of antioxidant or placebo beverage.....	133
Figura 1: Changes in concentrations of total antioxidant status in the control group (C), AD patients in initial phase (ADI) and AD patients in moderate phase (ADM) with antioxidant beverage (AB) and placebo beverage (PB).....	133
Figura 2: Changes in concentrations of glutathione peroxidase in the control group (C), AD patients in initial phase (ADI) and AD patients in moderate phase (ADM) with antioxidant beverage (AB) and placebo beverage (PB).....	133
Figura 3: Changes in concentrations of superoxide dismutase in the control group (C), AD patients in initial phase (ADI) and AD patients in moderate phase (ADM) with antioxidant beverage (AB) and placebo beverage (PB)	134
Figura 4: Changes in concentrations of protein carbonyls in the control group (C), AD patients in initial phase (ADI) and AD patients in moderate phase (ADM) with antioxidant beverage (AB) and placebo beverage (PB)	134

ARTÍCULO 3

Tabla 1: Descriptive statistics of the study population	141
Tabla 2: Levels of major pro-inflammatory cytokines in serum of subjects (controls and AD patients) at initial, middle and final period of ingestion of placebo beverage.....	142
Tabla 3: Levels of major pro-inflammatory cytokines in serum of subjects (controls and AD patients) at initial, middle and final period of ingestion of antioxidant beverage	143
Tabla 4: Levels of major anti-inflammatory cytokines in serum of subjects (controls and AD patients) at initial, middle and final period of ingestion of antioxidant or placebo beverage.....	144
Figura 1: Changes in serum IL-2 concentrations in subjects with antioxidant beverage.....	144
Figura 2: Changes in serum IFN- γ concentrations in subjects with antioxidant beverage.....	145
Figura 3: Changes in serum TNF- α concentrations in subjects with antioxidant beverage.....	145

SIGLAS Y ABREVIATURAS

SIGLAS Y ABREVIATURAS

- 3-NT: 3-nitrotirosina
8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
8-OHG: 8-hidroxiguanosina
AGE: Productos finales de glicación avanzada
AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados
AMK: N1-acetil-5-metoxiquinuramina
Apo E: Apolipoproteína E
APP: Proteína precursora del amiloide
A β : Amiloide A β
A β -42: Péptido β -amiloide-42
BA: Bebida antioxidante
BP: Bebida placebo
C*: Croma
C: Controles
CAT: Catalasa
CK: Creatina quinasa
COX: Ciclooxygenasa
CSF: Factor estimulante de colonias
CTE: Cadena de transporte de electrones
DPPH•: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EA: Enfermedad de Alzheimer
EAI: Enfermos de Alzheimer en fase inicial o leve
EAM: Enfermos de Alzheimer en fase moderada
EC: (-)-epicatequina

ECG: (-)-epicatequina-3-galato

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

EFSA: Autoridad europea de seguridad alimentaria

EGC: (-)-epigallocatequina

EGCG: (-)-epigallocatequina-3-galato

EO: Estrés oxidativo

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FOSHU: Alimentos de uso específico para la salud

GC: (-)-galocatequina

GF: Factores de crecimiento

GMSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GS: Glutamina sintasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

H*: Ángulo Hue

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HNE: 4-hidroxi-2,3-nonenal

OH•: Radical hidroxilo

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LOX: Lipooxigenasa

MCP: Proteína quimiotáctica de monocitos

MCSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MDA: Malondialdehído

- MIP: Proteína inflamatoria de macrófagos
NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappaB
NGF: Factor de crecimiento nervioso
O₂^{•-}: Radical anión superóxido
OH⁻: Anión hidroxilo
ON: Óxido nítrico
ONOO⁻: Peroxinitrito
PBI: Producto bruto interno
PON-1: Paraoxonasa-1
PS-1: Presenilina-1
PS-2: Presenilina-2
RAGE: Receptor de los productos finales de glicación avanzada
RL: Radicales libres
SNC: Sistema nervioso central
SOD: Superóxido dismutasa
SST: Sólidos solubles totales
TAS: Estado antioxidante total
TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
Tf: Periodo final del estudio
TGF- β : Factor de crecimiento transformante β
Ti: Periodo inicial del estudio
Tm: Periodo intermedio del estudio
TNF: Factor de necrosis tumoral
 τ : Proteína tau

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La función principal de los alimentos es proporcionar los nutrientes necesarios para satisfacer los requerimientos nutricionales de un individuo, y para dar al consumidor una sensación de satisfacción y bienestar a través de atributos organolépticos. Sin embargo, además de esta función, hay evidencia científica que demuestra que los alimentos pueden tener efectos beneficiosos para la salud del consumidor, más allá de los efectos nutricionales ampliamente aceptados, y pueden desempeñar un papel importante en la reducción del riesgo de padecer ciertas enfermedades.

En el mundo industrializado está evolucionando el concepto de “alimentación adecuada” al concepto de “alimentación óptima”, es decir, se ha pasado de la preocupación por la seguridad alimentaria y la satisfacción del hambre, a la búsqueda del potencial de los alimentos para promover y mejorar la salud. Debido a esta tendencia, se han desarrollado los alimentos funcionales, basados en el principio de valor añadido vinculado a beneficios para la salud del consumidor.

No existe una definición universalmente aceptada para los alimentos funcionales. Un alimento puede ser denominado como “funcional” si se demuestra que tiene un efecto beneficioso sobre una o más funciones del organismo, más allá de los efectos nutricionales tradicionales, de manera que sea relevante tanto para mejorar el estado de salud como para reducir el riesgo de enfermedad. Además, los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos y deben demostrar sus efectos en cantidades que normalmente se pueden esperar en un patrón de alimentación normal. Las bebidas de soja, bebidas para deportistas y bebidas ricas en antioxidantes son un ejemplo de este tipo de alimentos.

Un antioxidante es una molécula capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas al oxidarse ella misma, por lo que puede actuar como agente reductor. Ejemplos de antioxidantes son el ácido ascórbico, la vitamina E y los polifenoles.

Los compuestos polifenólicos se encuentran de forma natural en plantas, frutas, verduras y en los productos obtenidos a través de ellas, como el aceite de oliva, el vino tinto, el té y los zumos de frutas. Los flavonoides son el mayor grupo de polifenoles, y numerosos estudios han demostrado tanto su actividad *in vitro* como *in vivo* para prevenir o reducir los efectos nocivos de moléculas altamente oxidantes, como son las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, y de moléculas proinflamatorias.

En el organismo, un desequilibrio entre las sustancias oxidantes y antioxidantes, a favor de las oxidantes, se conoce como estrés oxidativo. El aumento del estrés oxidativo está asociado con el envejecimiento, pero este aumento es más pronunciado en enfermedades como el cáncer, la arteriosclerosis, y en desórdenes neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo crónico, caracterizado por una pérdida progresiva de las funciones cognitivas e intelectuales, especialmente la memoria. Las principales características neuropatológicas de esta enfermedad consisten en una pérdida de células neuronales, así como un depósito de placas seniles extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares. Debido a estas lesiones, la neuroinflamación es una característica patológica de la enfermedad de Alzheimer. Además de la neuroinflamación, existe un incremento importante del estrés oxidativo, evidenciado por el incremento, tanto en la sangre como en el cerebro del enfermo, de los niveles de biomarcadores de peroxidación lipídica, oxidación del ADN y ARN, oxidación proteica y glicoxidación, así como alteraciones en las defensas antioxidantes del organismo.

Por lo tanto, la posibilidad del uso terapéutico de alimentos ricos en antioxidantes, como el té verde y la manzana, parece ser racional para atenuar los efectos del estrés oxidativo y la inflamación en los enfermos de Alzheimer.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1.1. Historia de la enfermedad

El 3 de noviembre de 1906, en la ciudad alemana de Tubinga, durante la XXXVII Reunión de Psiquiatras del Suroeste de Alemania, el neuropatólogo alemán Dr. Alois Alzheimer (Figura 2.1) presentó la comunicación “Sobre un proceso patológico peculiar grave de la corteza cerebral”, la cual fue publicada un año después (Alzheimer, 1907). En dicho trabajo, Alois Alzheimer describió por primera vez los hallazgos clínicos y neuropatológicos de un trastorno neurológico, entonces novedoso, en una de sus pacientes, la Sra. Auguste Deter (Figura 2.2). El caso clínico era el de una mujer de 51 años, que comenzó a sufrir un delirio de celos contra su marido, seguido de una pérdida de memoria y de un rápido declive cognitivo, desorientación, agresividad, manía persecutoria, llanto y alteraciones del sueño, falleciendo en estado de total invalidez tras cuatro años y medio de evolución por una septicemia.



Figura 2.1: Dr. Alois Alzheimer
(Fuente: Ezquerro, 2007).



Figura 2.2: Sra. Auguste Deter
(Fuente: Ezquerro, 2007).

En el estudio histopatológico del cerebro de Auguste se advirtieron, por primera vez, las características neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer (EA): atrofia de la corteza cerebral (Figura 2.3), placas seniles (Figura 2.4) y ovillos neurofibrilares (Figura 2.4). Aunque las características clínicas de la enfermedad eran conocidas desde la antigüedad, Alzheimer fue probablemente el primero en correlacionar estas tres características histopatológicas con el diagnóstico y la gravedad de la enfermedad (Hardy, 2006; Iqbal & Grundke-Iqbal, 2006; Tanzi & Bertram, 2005).

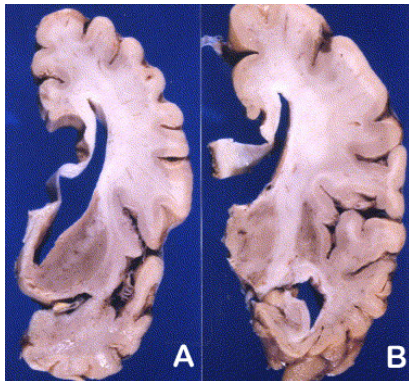


Figura 2.3: Atrofia de la corteza cerebral en la EA. (A) Sección de los ventrículos laterales de un cerebro con EA; (B) Sección de los ventrículos laterales de un cerebro sano (Fuente: Adaptado de Blennow, de Leon, & Zetterberg, 2006).

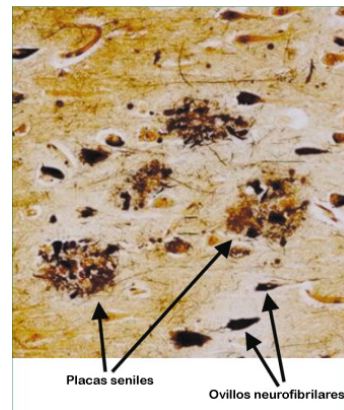


Figura 2.4: Placas seniles y ovillos neurofibrilares en la corteza cerebral de un paciente con EA (Fuente: Adaptado de Armstrong, Boada, Rey, Vidal, & Ferrer, 2004).

El nombre de “enfermedad de Alzheimer” fue acuñado posteriormente por el Profesor Kraepelin, maestro de Alois, en la 8ª Edición de su texto “Manual de Psiquiatría para médicos y estudiantes” en 1910.

La EA fue considerada durante muchas décadas una anomalía rara de escasa presencia en la población. Este concepto sobre la EA se mantuvo durante casi 70 años. Al cabo de ese tiempo, se observó que la demencia que afectaba a la mayoría de personas de edad avanzada con declive cognitivo global, era

equivalente, clínica y patológicamente, a la descrita por Alois Alzheimer, y se estableció la EA como causante del 60% de los casos de demencia (Ezquerro, 2007). Así, lo que durante muchos años se consideró una anomalía poco frecuente, pasó a ser un problema notable para la salud pública.

2.1.2. Aspectos generales de la enfermedad

La EA es la enfermedad neurodegenerativa más común, ya que es responsable de aproximadamente dos de cada tres casos de demencia, aunque esta cifra puede variar. Según diferentes estudios, la EA representa entre el 42 y el 81% de todas las demencias (Nussbaum & Ellis, 2003).

Es un proceso neurodegenerativo que se caracteriza por provocar un déficit progresivo e irreversible de la función cognitiva, pérdida de memoria y cambios en la personalidad, con alteraciones en la capacidad de juicio, toma de decisiones, orientación y lenguaje. También pueden surgir alteraciones neuropsiquiátricas como depresión, retraimiento, alucinaciones, delirios, agitación, insomnio y desinhibición.

Anatomopatológicamente, la EA se caracteriza por la pérdida neuronal, y la presencia de placas seniles extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares. La mortalidad en la EA es una consecuencia indirecta, debida principalmente a las secuelas negativas derivadas de la pérdida de autonomía, siendo la desnutrición y la aparición de infecciones los sucesos más perjudiciales.

El diagnóstico clínico de la EA se basa en el examen neurológico y en la exclusión de otras causas de demencia. Los criterios clínicos están establecidos por el DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition) (American Psychiatric Association, 2013) y por el NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) (McKhann et al., 1984).

Las pruebas de neuroimagen (tomografía axial computarizada o resonancia nuclear magnética cerebral) desempeñan una parte importante en el diagnóstico de la EA. En las fases iniciales de la enfermedad, sus resultados pueden ser normales, pero al evolucionar la EA, se advierte atrofia cortical difusa, con

dilatación del sistema ventricular. Sin embargo, estas características también pueden aparecer en el envejecimiento normal y en otras demencias. La neuroimagen ayuda a excluir otras causas de deterioro cognitivo, como hematoma subdural, tumor cerebral y enfermedad cerebrovascular.

El grado de fiabilidad de este diagnóstico no es absoluto, ya que únicamente la detección postmortem de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares permiten el diagnóstico definitivo, y la exclusión de otros tipos de demencia (Bacskai, Klunk, Mathis, & Hyman, 2002; Chui et al., 1993).

Para establecer el diagnóstico de la EA, se están investigando nuevos biomarcadores, tanto para respaldar el diagnóstico clínico, como para predecir una incipiente EA en los casos de deterioro cognitivo leve. Los criterios de un biomarcador ideal para la EA fueron propuestos por el Consensus Group on Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's disease (1998). Este grupo de trabajo recomendó que un biomarcador ideal debería discernir una característica fundamental de la neuropatología de la EA, y ser validado en casos neuropatológicamente confirmados, con una sensibilidad y especificidad no menor del 80%. Se han valorado algunos métodos diagnósticos como la medición de la atrofia del lóbulo temporal por resonancia nuclear magnética, la tomografía por emisión de positrones para la determinación del metabolismo de la glucosa y los depósitos β -amiloides, y la medición de biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Hasta ahora ninguno ha sido recomendado como criterio diagnóstico (Blennow et al., 2006).

La prevalencia de la enfermedad es difícil de determinar de forma definitiva porque la medida depende de varios factores: el criterio de diagnóstico usado, la edad de la población superviviente e, incluso, factores geográficos y étnicos (Hendrie et al., 2001).

2.1.3. Epidemiología y prevalencia

Después de más de un siglo desde su descripción, la EA es una de las más graves e incapacitantes enfermedades a nivel mundial. Se estima que la demencia contribuye al 11,2% de los años vividos con incapacidad, en personas mayores de 60 años, por encima del ictus (9,5%), enfermedades musculoesqueléticas (8,9%),

cardiovasculares (5%) y de todas las formas de cáncer (2,4%) (World Health Organization, 2003).

Los estudios epidemiológicos de las demencias han sido un área de investigación controvertida y polémica, hasta principios de los años ochenta, debido a la disparidad de criterios diagnósticos utilizados, y a la dificultad de establecer el diagnóstico de demencia leve. Para la EA, la unificación en 1984 de los criterios diagnósticos aceptados por la comunidad científica internacional (McKhann et al., 1984) y, posteriormente, la declaración del consenso de 1997 para el diagnóstico y el tratamiento de la EA (Small et al., 1997), han supuesto que los estudios epidemiológicos realizados por cualquier grupo de investigación, tengan una gran fiabilidad, a pesar de las diferencias culturales de las distintas regiones geográficas.

Conocer la prevalencia de la EA en las distintas regiones del mundo resulta difícil, ya que los datos pueden ser incompletos o insuficientes. Incluso en países con amplios trabajos publicados, sus datos son de áreas específicas, por lo que se generaliza realizando estimaciones de las cifras globales de la población afectada. De ahí la importancia de establecer métodos de estimación consensuada para conocer la prevalencia de la enfermedad, como el Delphi consensus study (Ferri et al., 2005).

De las estimaciones realizadas, se sabe que la EA es la causa más frecuente de demencia en los países occidentales, y supone el 50-60% de todos los casos. En 2010, hubo más de 35 millones de casos de EA en el mundo, y se prevé que esa cifra casi se duplique cada 20 años, llegando a 66 millones de personas con EA en 2030 y 115 millones en 2050 (World Health Organization & Alzheimer's Disease International, 2012).

Por sexo, las mujeres parecen tener mayor prevalencia, si bien es un hecho controvertido. En algunos trabajos se expone que la superioridad numérica es debida a la mayor esperanza de vida de las mujeres, y también a la mayor demanda asistencial de este género. En Europa, parece haber un incremento del riesgo significativo de EA en mujeres (Launer et al., 1999).

Por edades, la prevalencia de la demencia es menor del 1% en individuos entre 60-64 años, pero experimenta un incremento exponencial con la edad, de modo que en sujetos mayores de 85 años alcanza entre el 24 y 33% (Ferri et al.,

2005). Se considera que la incidencia de EA se dobla cada cinco años a partir de los 65 años de edad, salvo en el grupo de 80 a 84 años que se triplica (Andersen et al., 1999).

Por áreas geográficas, aunque se consideraba que las más altas tasas de prevalencia de demencia correspondían a países desarrollados, es China y sus vecinos del Pacífico Oeste, los que tienen el más alto número de personas con demencia (6 millones), seguido de Europa Occidental (4,9 millones) y Norteamérica (3,4 millones). Los 7 países con más alto número de demencia en 2001 fueron: China (5 millones), Unión Europea (5), USA (2,9), India (1,5), Japón (1,1), Rusia (1,1) e Indonesia (1). Las predicciones son que para 2040, China y los países del Pacífico Oeste tendrán 3 veces más personas con demencia que Europa Occidental. Latinoamérica, actualmente, tiene la mitad de pacientes con demencia (1,8 millones) que Norteamérica (3,4), pero en 2040 la cifra será muy similar (9,1 y 9,2 respectivamente). De los países en vías de desarrollo, se estima que el 60% de los pacientes con demencia viven en esta parte del mundo, y alcanzará el 71% en 2040 (Ferri et al., 2005).

Esto implica un gran impacto social, familiar y económico. A nivel mundial, los costos que representa la demencia han aumentado de US\$ 604 billones en el 2010 a US\$ 818 billones en el 2015, lo que significa un incremento del 35,4%. Actualmente se calcula que US\$ 818 billones representan el 1,09% del Producto Bruto Interno (PBI) a nivel mundial, visualizándose un incremento de lo estimado en el 2010 que fue del 1,01%. Si excluimos los costos por cuidados informales, el monto total de los costos directos representa el 0,65% del PBI mundial. Los costos se han incrementado en todas las regiones del mundo, siendo mayor en África y el Este de Asia (debido, en gran medida, a la alta prevalencia de demencia estimada para estas regiones). Se estima que la EA es la tercera enfermedad más cara en USA, con un coste anual de US\$ 100 billones, donde cada paciente supone un gasto total de US\$ 195.000 (Schumock, 1998). El coste estimado en Europa es de 6.000 a 19.000 € anuales por paciente. Estas estimaciones de costes varían entre los diferentes países, dependiendo de las diferencias en la estructura para la atención de demencia (Jonsson & Berr, 2005). En España los gastos ocasionados por paciente y año se sitúan entre los 12.000 y 24.000 €, que se podrían desglosar

en el 16% de este coste de índole sanitario y el 84% restante en asistencia social (Atance Martínez, Yusta Izquierdo, & Grupeli Gardel, 2004).

2.1.4. Factores predisponentes

A lo largo de los últimos años, se han realizado múltiples estudios epidemiológicos para intentar establecer la etiología y los factores predisponentes de esta severa enfermedad. Se han sugerido numerosos factores medioambientales como causa de la EA, tales como el aluminio, el mercurio, los virus y los priones, pero no se ha demostrado que ninguno de ellos desempeñe un papel importante. Estudios longitudinales han destacado la asociación entre la EA y algunos factores de riesgo cardiovascular, como son la hipertensión arterial, diabetes, obesidad, y niveles elevados de homocisteína y lípidos en sangre (Vogel et al., 2006). Sin embargo, un gran número de estudios realizados en distintas áreas geográficas, coinciden en que los factores de riesgo más importantes para desarrollar la EA son la edad avanzada y los antecedentes familiares de EA.

Se estima que más del 90% de los pacientes con EA debutan después de los 65 años, lo que se denomina EA de aparición tardía. Antes de esta edad también puede iniciarse, y su presentación en menores de 65 años se conoce como EA de aparición precoz. Ningún grupo de edad adulta está exento de padecerla, pero es poco frecuente entre los 40 y 65 años, aunque en algunos casos la enfermedad ha debutado a los 30 años.

La edad media de aparición es de 80 años (Helmer, Joly, Letenneur, Commenges, & Dartigues, 2001). En un estudio francés, en el que se consideró la EA de aparición precoz a los 61 años, la prevalencia en este grupo de edad fue del 41 por 100.000, lo que supone del 6 al 7% de todos los casos de EA (Campion et al., 1999).

Otro importante factor de riesgo es la historia familiar de EA. Se comprobó a través de varios estudios epidemiológicos, que la presencia de uno o más sujetos con EA dentro de una misma familia era un importante factor de riesgo para desarrollar esta enfermedad neurodegenerativa. Tal observación impulsó la búsqueda de una causa genética de esta patología. Se encontró que había determinadas familias con aparición precoz de la enfermedad (menores de

65 años) y con un patrón de herencia autosómica dominante. Posteriormente, se conocieron 3 genes cuyas mutaciones están implicadas en la génesis de la EA familiar de aparición temprana. De los genes implicados en la EA, se podrían distinguir tres como “genes causantes” de EA, y uno como “gen de susceptibilidad”. Los genes causantes han sido identificados en la EA de aparición temprana y son el gen de la proteína precursora del amiloide (APP) (Goate et al., 1991), el gen PS-1 o presenilina-1 (Sherrington et al., 1995), y el PS-2 o presenilina-2 (Levy-Lahad et al., 1995). El gen de susceptibilidad es el gen de la apolipoproteína E (Apo E) (Corder et al., 1993).

El conocimiento de estos genes ha supuesto un importante avance etiopatogénico, pero son la causa de apenas el 0,1% de los casos de EA (Harvey, Skelton-Robinson, & Rossor, 2003).

Uno de estos genes, el de la APP, está situado en el cromosoma 21 y su mutación condiciona la aparición de la EA. Otra conocida patología relacionada con este cromosoma es el síndrome de Down. Existen una serie de características comunes en estas dos enfermedades, la más remarcable es la acumulación de β -amiloide a nivel cerebral. En los pacientes con trisomía del cromosoma 21, después de los 35 años, aparecen las lesiones neuropatológicas de la EA, y la aparición de demencia oscila entre los 40 y 70 años, con deterioro de las funciones intelectuales (Lai et al., 1999).

La influencia genética de la EA también parece tener un papel importante a nivel mitocondrial. La única localización extranuclear de información genética se encuentra en el ADN de las mitocondrias. Algunos trabajos han sugerido que la disfunción mitocondrial puede contribuir a la progresión de la EA y de otras enfermedades neurodegenerativas (Beal, 1998). Estos hallazgos apoyan la teoría de que el estrés oxidativo (EO) relacionado con los trastornos mitocondriales y la edad, representan un importante papel en las enfermedades neurodegenerativas (Manczak et al., 2006; Mecocci et al., 1997).

El factor de riesgo o susceptibilidad genética más frecuente es el genotipo Apo E4. A principios de los años 90, se identificó este genotipo como factor de riesgo de EA familiar de aparición tardía (Corder et al., 1993; Saunders et al., 1993), y posteriormente se relacionó también con las formas esporádicas de EA y EA de aparición precoz (van Duijn et al., 1994). El gen de Apo E, situado en el

cromosoma 19, presenta un polimorfismo determinado por el cambio de un aminoácido en los codones 112 y 158, resultando tres isoformas llamadas Apo E2, E3 y E4. De ellas, es la Apo E4 la que se relaciona con la EA (Corder et al., 1993; Saunders et al., 1993). La presencia de Apo E4 no determina la aparición de EA, pero incrementa el riesgo de padecerla. La posesión de un alelo Apo E4 (sujeto heterocigoto) aumenta de 2 a 3 veces el riesgo de padecer EA, y si tiene los 2 alelos (homocigoto) se incrementa de 5 a 15 veces el riesgo (Corder et al., 1993; Farrer et al., 1997).

Así mismo, la presencia de un alelo Apo E4 incrementa el riesgo de EA en familiares de primer grado en todos los grupos étnicos (Devi et al., 1999). Apo E4 actúa modificando la edad de aparición de EA, y se estima que cada alelo descendería la edad de aparición en casi 10 años (Corder et al., 1993). Es uno de los más importantes factores de riesgo de EA en la vejez (Slooter et al., 1998).

2.1.5. Cambios neuropatológicos macroscópicos

Los cambios macroscópicos que se pueden observar en los cerebros de los pacientes con EA son: (1) tamaño medio del cerebro más pequeño que el de las personas sanas, (2) atrofia cortical considerable y simétrica, con afectación de todos los lóbulos, (3) atrofia del lóbulo temporal medio y (4) afectación desproporcionada de las áreas de asociación, con respecto a las áreas motoras y sensoriales (Hof, Cox, & Morrison, 1990). Las estructuras subcorticales se hallan normalmente conservadas, excepto la amígdala, que se encuentra gravemente afectada. En general, la atrofia es simétrica entre los dos hemisferios, aunque no necesariamente entre los lóbulos. Además, prácticamente todos los casos de EA desarrollan un déficit de perfusión en las regiones parietotemporales posteriores.

2.1.6. Cambios neuropatológicos microscópicos

La EA es una compleja patología, que por su alta incidencia e impacto en la salud pública, provoca un gran interés. En los últimos años se han puesto en marcha múltiples estudios orientados fundamentalmente al conocimiento de los aspectos etiopatogénicos, básicos para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Para comprender las diversas líneas de investigación en la EA, resulta de gran importancia conocer los hallazgos microscópicos en los cerebros afectados por la EA. A nivel neuropatológico, se producen alteraciones en la estructura microtubular neuronal, con cúmulos neurofibrilares intracitoplasmáticos, depósitos amiloides extracelulares, degeneración neuronal, e importantes pérdidas de conexiones neuronales. Varios mecanismos patogénicos que subyacen en estos cambios han sido estudiados, incluyendo la agregación y depósito del amiloide $A\beta$ ($A\beta$), con el desarrollo de la placa senil, la hiperfosforilación de la proteína tau (τ), con la formación del ovillo neurofibrilar, la disfunción neurovascular, y otros mecanismos tales como anomalías del ciclo celular, procesos inflamatorios, EO y disfunción mitocondrial.

2.1.6.1. Ovillos neurofibrilares y τ .

Los ovillos neurofibrilares intracitoplasmáticos están compuestos, principalmente, de filamentos dobles enrollados en espiral, que representan una τ hiperfosforilada. τ es una proteína axonal que cumple la función de estabilizar y unir a los microtúbulos axonales, a través de sus dominios de unión, y transportar las organelas celulares, las glucoproteínas, y otros materiales a través de la neurona. Las formas hiperfosforiladas de la τ restan eficacia a los microtúbulos y facilitan el cúmulo de dobles filamentos helicoidales intraneuronales. Estos ovillos neurofibrilares se depositan predominantemente en el hipocampo y la amígdala, y posteriormente en las áreas de asociación neocortical.

Las neuronas afectadas, combaten a la τ tóxica sintetizando τ normal, y envolviendo la τ hiperfosforilada en polímeros inertes como los ovillos neurofibrilares de dobles filamentos helicoidales, cintas enrolladas y filamentos rectos. Estos hechos patológicos comienzan de manera temprana en la EA, y progresivamente, las neuronas afectadas experimentan degeneración (Blennow et al., 2006; Iqbal & Grundke-Iqbal, 2006).

2.1.6.2. Depósitos amiloides y A β .

Los depósitos amiloides extracelulares o placas neuríticas seniles, se componen de un núcleo central que contiene A β , proteoglicanos, Apo E, α 1-antiquimiotripsina y otras proteínas. El mayor componente proteico es el A β , un péptido que se agrega en grupos llamados oligómeros, de 4 kDa y de 39 a 43 aminoácidos, con heterogeneidad en la secuencia de aminoácidos, pero con idéntico extremo carboxiterminal, que deriva de la APP. El núcleo de la placa está rodeado por neuronas degeneradas y macrófagos. Las placas se encuentran predominantemente en el hipocampo y en la corteza del lóbulo temporal, también se encuentran cúmulos de A β en las arteriolas cerebrales, lo que se denomina angiopatía amiloide.

Inicialmente, el A β encontrado en las placas seniles, fue considerado una proteína anormal, pero posteriormente se descubrió que el A β se producía durante el metabolismo celular normal (Haass et al., 1992). Este hallazgo llevó a investigar acerca de dos enzimas que escindían el A β de APP, y se designaron β -secretasa y γ -secretasa. APP es una proteína transmembrana con un largo extremo N-terminal extracelular. El dominio del A β está parcialmente alojado en la membrana plasmática, e incluye 28 residuos justo fuera de la membrana, y los primeros 12-14 residuos en el dominio transmembrana. APP puede ser procesada por 2 patrones. El patrón no amiloidogénico o de α -secretasa, donde esta enzima escinde APP en el dominio de A β , liberando el fragmento largo soluble de APP (α -sAPP). El restante dominio APP intracelular es metabolizado en el citoplasma. APP fragmentada por α -secretasa impide la generación de A β . En el patrón amiloidogénico o de β -secretasa, esta enzima actúa justo antes del dominio A β , liberando β -sAPP soluble. El restante dominio es fragmentado por el complejo γ -secretasa liberando el péptido A β de 40 o 42 aminoácidos. El complejo γ -secretasa es una proteasa intramembrana con cuatro componentes: presenilina, nicastrina, PEN-2 y faringe anterior defectuosa-1, siendo la presenilina el sitio activo (Gandy, 2005).

2.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO

2.2.1. Los radicales libres

Los radicales libres (RL) fueron descritos por primera vez por Moses Gomberg hace más de un siglo (Gomberg, 1900). Durante un largo periodo de tiempo, no se consideró que los RL estuvieran presentes en los sistemas biológicos debido a su alta reactividad y, consecuentemente, a su corto tiempo de vida. Más de 30 años después, Leonor Michaelis (Michaelis, 1939) propuso que todas las reacciones de oxidación que implican moléculas orgánicas, podrían estar mediadas por RL. Aunque esta afirmación tan general era errónea, estimuló el interés sobre el papel de los RL en los procesos biológicos. En los años 50, los RL fueron encontrados en los sistemas biológicos (Commoner, Townsend, & Pake, 1954) lo que supuso inmediatamente el pensamiento de que estuvieran involucrados en diversos procesos patológicos (Gerschman, Gilbert, Nye, Dwyer, & Fenn, 1954) y en el envejecimiento (Harman, 1956). Desde entonces, nuestro conocimiento sobre la participación de los RL en los procesos de la vida se ha extendido enormemente, sugiriéndose que desempeñan funciones dañinas. Este punto de vista se vio reforzado por el descubrimiento de McCord y Fridovich (McCord & Fridovich, 1969), quienes describen la primera enzima protectora contra los RL, la superóxido dismutasa (SOD).

Un RL es un átomo o molécula, neutra o cargada, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo, ya sea por pérdida o ganancia de estos (Borut Poljsak et al., 2013) y es, al mismo tiempo, capaz de existir de forma independiente (Gutteridge, 1994). La existencia de electrones desapareados incrementa la reactividad de la especie química, pues estos electrones tienden a aparearse con un electrón libre de otro átomo o molécula. La producción de RL ocurre por la adición o privación de un electrón en una reacción de óxido-reducción y se producen normalmente durante el metabolismo de la célula (Halliwell & Gutteridge, 2007). Su pequeño tamaño hace posible que muchos de ellos puedan penetrar en las membranas celulares. Los RL tienen una vida media del orden de milisegundos debido a su gran reactividad, aunque varía según el tipo de RL. En general, son más peligrosos cuanto mayor es su reactividad, concentración, vida media y duración de su acción (Ballester, 1996).

A pesar del daño oxidativo que pueden producir los RL, debe mencionarse que también poseen efectos beneficiosos, ya que desempeñan un papel importante en multitud de reacciones biológicas. Por ejemplo, en la fagocitosis de los leucocitos, los RL destruyen los microorganismos invasores mediante un proceso conocido como explosión respiratoria (Lilius & Marnila, 1992). Los RL también actúan como mediadores esenciales en la apoptosis, y participan en el sistema de metabolización de productos tóxicos que elimina numerosas sustancias nocivas del organismo. También es posible que el papel fisiológico de algunos RL potencie la vasorregulación (Halliwell, 1989). Otros RL inorgánicos como el óxido nítrico (ON), actúan como factor de relajación endotelial, participando además como neurotransmisor en el sistema nervioso central (Zentella & Saldaña, 1996) y en la respuesta fagocítica de algunos macrófagos (Knowles & Moncada, 1994). Además, los RL tienen funciones fisiológicas necesarias para el desarrollo del metabolismo celular, tales como la transducción de señales, la expresión génica y la activación de factores transcripcionales (Zentella & Saldaña, 1996).

2.2.2. Especies oxidantes

En la mayoría de los casos, los términos “radicales libres” y “especies reactivas de oxígeno” (ERO) se utilizan indistintamente. Si en muchos casos esto es correcto, en algunos es un error. El análisis de la generación de las ERO, su interconversión y su eliminación se presenta esquemáticamente en la Figura 2.5. En los organismos que viven en condiciones aeróbicas, más del 90% del oxígeno consumido se reduce directamente a agua por el citocromo oxidasa en la cadena de transporte de electrones (CTE), a través de mecanismos de cuatro electrones sin liberación de ERO (Ott, Gogvadze, Orrenius, & Zhivotovsky, 2007; Skulachev, 2012). En los eucariontes, el sistema está representado por la CTE, situada en la membrana mitocondrial interna, mientras que en los procariontes los componentes de la CTE se encuentran en la membrana plasmática. La operación de la CTE se acopla con la fosforilación oxidativa para producir energía en forma de ATP. Mucho menos del 10% del oxígeno consumido se reduce a través de vías sucesivas de un electrón, dando como resultado la conversión del oxígeno molecular al radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), seguido de la reducción de un

electrón con la concomitante aceptación de dos protones para producir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 2.5). Este compuesto no es un radical libre, pero es químicamente más activo que el oxígeno molecular, por lo que se incluye dentro del grupo de las ERO. La molécula de H_2O_2 , al aceptar un electrón más, se divide hasta el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y el anión hidroxilo (OH^-). Finalmente, el $\text{HO}\cdot$ interactúa con un electrón y protón más, formándose la molécula de agua. En los sistemas biológicos, esta reacción se realiza principalmente a través de la abstracción del átomo de hidrógeno a partir de diferentes compuestos, tales como proteínas y lípidos, resultando, con frecuencia, en la iniciación de procesos de cadena. Resumiendo lo descrito anteriormente, al $\text{O}_2\cdot^-$, H_2O_2 , y $\text{HO}\cdot$ se les llaman ERO, pero sólo el $\text{O}_2\cdot^-$ y el $\text{HO}\cdot$ son RL, mientras que el H_2O_2 no lo es. Las ERO no sólo incluyen las especies antes mencionadas, sino también diversos peróxidos, como los peróxidos de lípidos, y los peróxidos de proteínas y ácidos nucleicos. Además, su homeostasis está estrechamente relacionada con muchas otras especies reactivas, tales como las especies reactivas de carbonilo (Semchyshyn & Lozinska, 2012). Hay también muchas otras especies reactivas de nitrógeno (ERN) (ON , peroxinitrito y compuestos relacionados) (Bild, Ciobica, Padurariu, & Bild, 2013; Radi, 2013), de carbono (Bild et al., 2013), azufre (Jacob, 2006), etc.

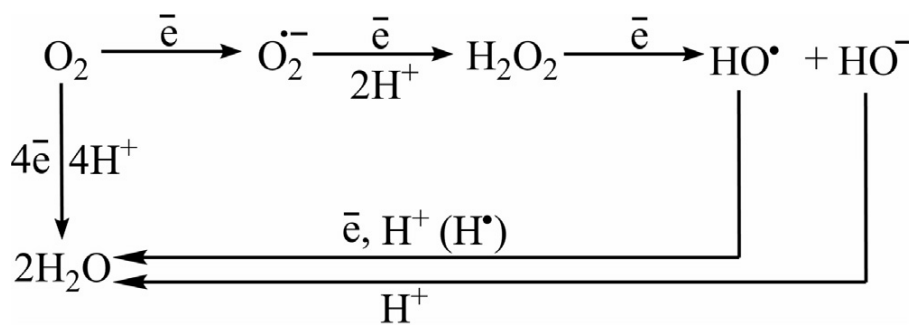


Figura 2.5: La reducción del oxígeno molecular. Descripción en el texto (Fuente: Lushchak, 2014).

Existe una gran variedad de ERO y ERN citotóxicas, tanto RL como especies moleculares (Tabla 2.1). Algunas de las más importantes son:

2.2.2.1. Radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Consiste en una forma reducida del oxígeno molecular, constituida por dos átomos de oxígeno, 17 electrones y una carga eléctrica negativa. En el organismo se forma a partir del O_2 por captura de un electrón, cedido por ciertos sustratos (Ballester, 1996). Este radical se produce, por ejemplo, en la oxidación de la xantina y la hipoxantina a ácido úrico, por la acción de la enzima xantina oxidasa. En la CTE de las mitocondrias, algunos electrones se fugan para combinarse con oxígeno, para así formar $O_2^{\bullet-}$. Esto ocurre en todos los organismos aerobios, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria salen de ésta y son captados por el O_2 . Además de la mitocondrial, las CTE del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear también pueden generar $O_2^{\bullet-}$. Ciertos iones metálicos libres como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} , pueden ceder un electrón al oxígeno para formar $O_2^{\bullet-}$. Este radical también puede ser segregado por los leucocitos que migran hacia las lesiones tisulares, a partir del H_2O_2 .

Al contrario de lo que generalmente se piensa, este radical es relativamente poco reactivo, pero potencialmente tóxico, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos. Después de la producción de $O_2^{\bullet-}$, varios mecanismos de defensa celular se activan. Las actividades enzimáticas de la SOD, catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) representan unos mecanismos ejemplares para la desintoxicación de las ERO. La SOD combina el $O_2^{\bullet-}$ con protones para formar H_2O_2 , que actúa como sustrato tanto para la CAT como para la GPx, pero también puede reaccionar con el hierro (Pong, 2003).

Tabla 2.1: Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno citotóxicas.

RADICALES LIBRES		ESPECIES NO-RADICALES	
O ₂ •	Radical anión superóxido	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
OH•	Radical hidroxilo	HClO	Ácido hipocloroso
ROO•	Radical peroxilo	ONOO•	Peroxinitrito
RO•	Radical alcoxilo	O ₃	Ozono
RS•	Radical tiilo	O ₂	Oxígeno molecular
NO•	Radical óxido nítrico	¹ O ₂	Oxígeno singlete
NO ₂ •	Radical dióxido de nitrógeno		
ONOO•-	Radical peroxinitrito		
CCl ₃ •	Radical triclorometilo		

2.2.2.2. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Es una especie no radical dentro de las ERO, ya que no presenta electrones desapareados, que se forma a partir de RL, como por ejemplo el radical O₂•-. La reacción de dismutación del O₂•- catalizada por la SOD genera H₂O₂, siendo su toxicidad importante ya que atraviesa fácilmente las membranas celulares. El H₂O₂ también se forma por la acción de algunas oxidasas como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa. El H₂O₂ es un precursor del radical HO• (en presencia de metales de transición, y de oxígeno que facilitan esta reacción) y del ácido hipocloroso (Dhalla, Tamsah, & Netticadan, 2000).

A muy baja concentración (micromolar) el H₂O₂ también es muy reactivo, y a concentraciones elevadas puede dañar los sistemas celulares productores de energía, por ejemplo, inactivando la enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa (Aruoma, 1998).

La CAT utiliza el H₂O₂ para producir oxígeno molecular y agua, mientras que la GPx utiliza el H₂O₂ y el glutatión reducido (GSH) para formar agua y glutatión oxidado (GSSG). El hierro ferroso reacciona con el H₂O₂ en una reacción de Fenton, generando OH• y OH•-. El hierro férrico también puede reaccionar con el H₂O₂ para generar OOH• y H⁺ (Winterbourn, 1995).

2.2.2.3. Radical hidroxilo (OH•)

Es el estado de reducción por tres electrones de la molécula de oxígeno. Es uno de los RL más lesivos, que ataca a las proteínas y lípidos de las membranas celulares, debido a su semejanza fisicoquímica con el agua y a su pequeño tamaño, lo que facilita su penetración en las membranas celulares, produciendo en éstas efectos tóxicos. Tiene una vida media muy corta en las células, alrededor de 10^{-9} segundos (Aruoma, 1998). Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ) que pueden provocar rotura hemolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el H_2O_2 en dos moléculas de OH•. Otro proceso todavía más importante en la formación del radical OH• es la llamada reacción de Fenton:



También a partir de H_2O_2 y del radical $O_2\bullet^-$ puede formarse el radical OH•, por la reacción de Haber-Weiss:



Esta reacción es catalizada por metales como hierro o cobre.

2.2.2.4. Radical peroxilo (ROO•)

Estos radicales son especies intermedias, formadas durante las reacciones en cadena de la oxidación lipídica, como en la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

La peroxidación lipídica puede ser iniciada por especies suficientemente reactivas, capaces de sustraer un átomo de H de la cadena de AGPI (por ejemplo ácido araquidónico y ácido linolénico) de los lípidos de la membrana celular. El ácido araquidónico es un precursor de las prostaglandinas y los leucotrienos, que contiene grupos metilenos alternados con dobles enlaces, que son particularmente susceptibles de la abstracción del átomo de H.

La formación de los ROO• *in vivo* se relaciona con las condiciones de EO, como sucede en situaciones patológicas asociadas con la inflamación (Aruoma, 1998). Este RL tiene una vida media relativamente larga (del orden de segundos).

2.2.2.5. Oxígeno singlete (1O_2)

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un RL y se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. Su vida media es alrededor de 10^{-6} segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, y también gracias a la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras (Kanofsky, 1989).

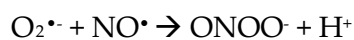
2.2.2.6. Radical óxido nítrico (NO•)

El ON ha cobrado gran relevancia en los últimos años por la importante función fisiológica que desempeña, ya que es un importante agente vasodilatador, neurotransmisor, y tiene acción protectora frente a microorganismos patógenos, pero además por ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de RL.

Es un gas lipofílico e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 segundos). La formación del RL tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina dando como subproducto NO• en numerosos tipos celulares (Nisoli et al., 2003).

NO• es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, oxidar grupos tioles y guanosinas, degradar carbohidratos y fragmentar ADN (Beckman, Chen, Crow, & Ye, 1994).

Este radical genera peroxinitrito (ONOO•) al reaccionar con el $O_2^{\bullet-}$ (Miles et al., 1996), tal como se muestra en la siguiente reacción:



2.2.2.7. Dióxido de nitrógeno (NO_2^*)

El dióxido de nitrógeno es un RL contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO^* atmosférico (Postlethwait, Langford, Jacobson, & Bidani, 1995). Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (Kaur & Halliwell, 1994).

2.2.3. Concepto de estrés oxidativo

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas ERO y ERN también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Moorhouse, Grootveld, Halliwell, Quinlan, & Gutteridge, 1987).

El EO se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Ballester, 1996; Chance, Sies, & Boveris, 1979). Así pues, el EO puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez.

Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que puede afectar a diversas moléculas, y que puede reflejarse en sus funciones fisiológicas.

Las células sanas son capaces de neutralizar determinados niveles de especies reactivas. Cuando estos niveles sobrepasan la capacidad de acción de los mecanismos de defensa, se produce la lesión celular (Orrenius & Nicotera, 1987); si la exposición persiste o es suficientemente intensa, la célula es incapaz de reparar el daño, se produce una lesión irreversible y finalmente muere (Halliwell & Gutteridge, 2007).

El daño celular se produce fundamentalmente a nivel de cuatro sistemas o estructuras celulares: la membrana, el proceso respiratorio aerobio a través de la fosforilación oxidativa, la síntesis de proteínas enzimáticas o estructurales y el aparato genético de la misma (Comporti, 1987).

Los RL pueden ocasionar daño en la mayoría de los componentes celulares, pero son las proteínas, los ácidos grasos insaturados y los ácidos nucleicos los más afectados (Figura 2.6).

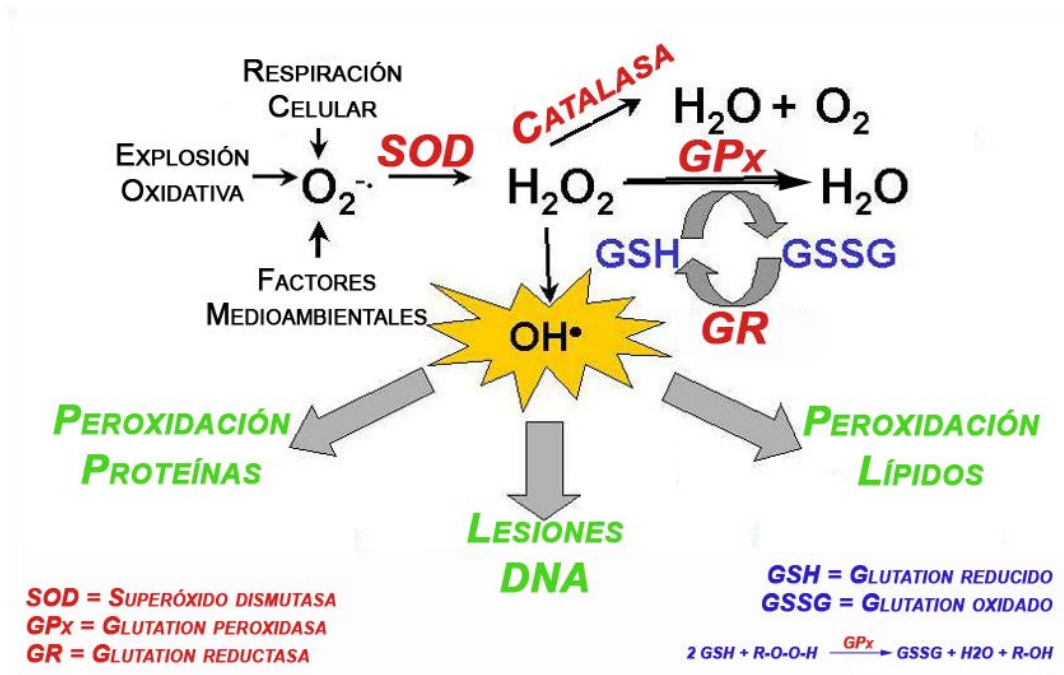


Figura 2.6: Posibles lesiones celulares debidas al estrés oxidativo (Fuente: Adaptado de De la Fuente, 2008).

Los efectos de los RL en estas moléculas se manifiestan en una alteración de sus estructuras químicas y, por tanto, en un mal funcionamiento de los sistemas celulares en los que participan. La alteración del funcionamiento celular conlleva a la disfunción del órgano o sistema al que pertenecen las células dañadas, lo que se manifiesta a través de síntomas clínicos apreciables.

2.2.4. Daño sobre biomoléculas

Ante una determinada tensión oxidativa, los organismos se suelen adaptar rápidamente. En general, un estímulo oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir después condiciones más oxidantes. Sin embargo, las ERO que se producen en cualquier estado fisiológico, producen continuamente daño al

ADN, a las proteínas y a los lípidos. Así, se pueden detectar en individuos sanos bases nitrogenadas alteradas en el ADN, aminoácidos modificados en las proteínas y peroxidación de lípidos. Actividades fisiológicas como, por ejemplo, una actividad física intensa, también conlleva la aparición de EO, que se cuantifica mediante el análisis de los productos de oxidación de proteínas, lípidos y ADN (Morillas-Ruiz et al., 2005; Morillas-Ruiz, Villegas Garcia, Lopez, Vidal-Guevara, & Zafrilla, 2006).

2.2.4.1. Daño oxidativo a lípidos

Los lípidos, y sobre todo los AGPI de las membranas celulares, son las biomoléculas más susceptibles a ser atacadas por los RL. Los RL que pueden empezar esta reacción son: el radical $\text{OH}\cdot$, el $\text{ROO}\cdot$, el $\text{RO}\cdot$ y el alquílico ($\text{R}\cdot$). El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica (Figura 2.7). Esta es una reacción en cadena, de modo que el ataque por un solo RL da lugar a la formación de un gran número de especies activadas, lo cual desemboca en la oxidación de una gran cantidad de especies, sobre todo aldehídos. Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, causando daños en los mismos.

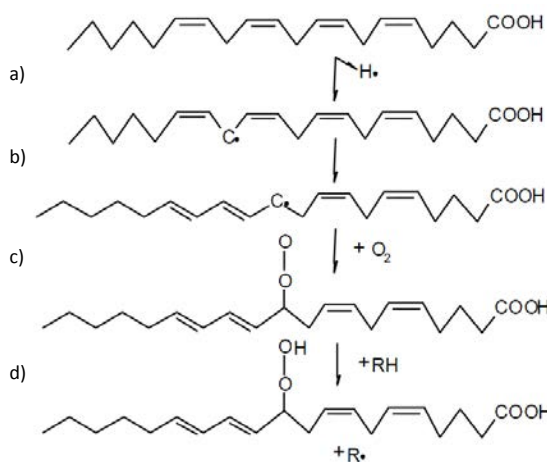


Figura 2.7: Oxidación de lípidos. Se ejemplifica una posible modificación del ácido araquidónico: a) la salida de un átomo de hidrógeno genera un radical en un carbono, b) éste puede migrar, con lo cual hay un reacomodo de los dobles enlaces y c) en presencia del dióxígeno se genera un radical $\text{ROO}\cdot$ que d) se puede apropiarse de un hidrógeno de otro lípido, con lo que se propaga la reacción (Fuente: Adaptado de Hansberg, 2002).

Los parámetros que se miden con más frecuencia para cuantificar el grado de daño oxidativo a los lípidos son los productos derivados de la oxidación lipídica, como el MDA (malondialdehído), pero su baja especificidad ha recibido críticas por parte de investigadores (Frijhoff et al., 2015), y por ello en la actualidad se consideran biomarcadores de oxidación lipídica más adecuados, por ejemplo, los isoprostanos (Frijhoff et al., 2015).

2.2.4.2. Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los RL (principalmente por el OH^\bullet), formándose diferentes productos. Muchos de estos productos oxidativos forman grupos carbonilo. La detección de estos grupos carbonilo es una medida eficaz de la oxidación proteica (Chang, Chou, & Chang, 2000). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína, y por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica.

2.2.4.3. Daño oxidativo al ADN

El ADN también es susceptible al daño oxidativo en todos sus componentes. Se sabe que el oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del ADN formándose radical ROO^\bullet . Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el ADN dan lugar a un gran número de productos.

La alteración de este tipo que más se observa es la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG). Su importancia reside en su poder mutagénico, ya que durante la replicación producirá transversiones G-T (Kasai, 1997). La cantidad de 8-OHdG se utiliza como índice del daño oxidativo al ADN.

El ADN mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el ADN nuclear (Hellsten, Frandsen, Orthenblad, Sjodin, & Richter, 1997). El genoma mitocondrial presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del ADN (Johns, Neufeld, & Park, 1992); el sistema de reparación es poco efectivo (Suter & Richter, 1999) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de ERO (Giulivi & Cadenas, 1998). Otro factor distintivo del ADN mitocondrial es que no

posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta a una zona de ADN codificante (Shigenaga, Boujaoude, Chen, & Ames, 1994) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

2.2.4.4. Daño oxidativo a glúcidos

Los glúcidos reaccionan fácilmente con los radicales OH[•]. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares. El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que da lugar a procesos degenerativos.

2.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En algunas situaciones, la producción de moléculas oxidantes puede exceder la capacidad antioxidante endógena del organismo para destruirlas, produciéndose un desequilibrio oxidativo. Este episodio da lugar a un EO, y al daño posterior sobre las biomoléculas, que se traduce en funciones celulares alteradas y en la muerte celular (Praticò, 2001).

El sistema nervioso central (SNC) está predispuesto al daño oxidativo debido a que es rico en AGPI, tiene un alto contenido de metales de transición y tiene una alta actividad metabólica oxidativa, que en su conjunto, actúan como potentes prooxidantes.

La fuente de especies oxidantes en el SNC incluye la presencia de metales de transición, una función mitocondrial alterada y los péptidos A β (Reddy & Beal, 2008). Todos estos factores no son independientes y, sobre todo en las primeras etapas de la EA, A β podría entrar en la mitocondria donde podría aumentar la generación de las ERO y causar un daño oxidativo.

Dependiendo del sustrato atacado por las ERO, el EO se manifestará como una oxidación del ADN y ARN, una oxidación de las proteínas, una oxidación de los glúcidos o una oxidación lipídica. Todos estos marcadores de EO han sido descritos en el cerebro de pacientes con EA, lo que ha dado lugar a la “hipótesis del estrés oxidativo” en la EA (Butterfield, 1997; Markesbery, 1997; Smith, Rottkamp, Nunomura, Raina, & Perry, 2000).

2.3.1. Oxidación de las proteínas

Las modificaciones oxidativas de las proteínas son importantes en el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, como la EA (Markesbery, 1997; Stadtman, 1992), por lo que la investigación en la oxidación de las proteínas es esencial para la comprensión de cómo el EO afecta a las funciones celulares y, finalmente, conduce a la muerte neuronal.

Las ERO pueden atacar las cadenas laterales de las proteínas, lo que conlleva a la introducción de grupos OH o a la generación de carbonilos proteicos. Los grupos carbonilo se introducen en las proteínas mediante la oxidación de residuos de aminoácidos de la cadena lateral de OH, en derivados de cetonas o aldehídos (Berlett & Stadtman, 1997). Una variedad de vías oxidativas conducen a la carbonilación de las proteínas (Isabella Dalle-Donne et al., 2006). Los grupos carbonilo también se pueden introducir en las proteínas por la oxidación directa de residuos de lisina, arginina, prolina y treonina.

El aumento de los carbonilos proteicos reactivos fue la primera forma de daño oxidativo identificada en la EA (Smith et al., 1992), siendo entonces detectados los daños producidos por los carbonilos en las placas seniles (Smith et al., 1994; Vitek et al., 1994), en los ovillos neurofibrilares (Smith et al., 1994; Yan et al., 1994) y en el componente primario de la τ (Ledesma, Bonay, Colaco, & Avila, 1994; Yan et al., 1994). La oxidación proteica está vinculada al cerebro con EA, por un aumento de proteínas modificadas carboniladas (Hensley et al., 1995). Los estudios han demostrado un aumento de carbonilos proteicos en el hipocampo y en la corteza parietal de pacientes con EA, pero no en el cerebelo, donde hay menos indicios de patología en la EA (Hensley et al., 1995).

El primer uso de la proteómica para identificar específicamente proteínas oxidadas en el cerebro con EA, mostró varias proteínas como la creatina quinasa (CK) y la glutamina sintasa (GS) (Butterfield, Boyd-Kimball, & Castegna, 2003). Estas proteínas se ven más afectadas por la oxidación en la EA y, por lo tanto, son más propensas a la inactivación, lo que representa un paso importante en la vinculación de la neurodegeneración en la EA con el EO. Se ha encontrado un exceso de oxidación proteica y una disminución de la actividad de la GS y la CK en los lóbulos frontal y occipital de sujetos ancianos y pacientes con EA, en comparación con controles jóvenes (Smith et al., 1991). El hallazgo de que la

actividad de la GS se redujo en el lóbulo frontal en la EA ha sugerido que la neuropatología característica de la EA, puede representar una vulnerabilidad específica de las áreas o células cerebrales a la oxidación relacionada con la edad. De acuerdo con esta idea, el hipocampo y el lóbulo parietal inferior, en los pacientes con EA, tuvieron mayor contenido de carbonilos proteicos y menor actividad de la GS y la CK que el cerebelo (Hensley et al., 1995; Smith et al., 1996), lo que refleja, de nuevo, que el aumento de la oxidación de proteínas se correlaciona con la histopatología de la EA.

Se cree que la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es un mecanismo importante en muchas enfermedades degenerativas, incluida la EA (Arlt, Kontush, Muller-Thomsen, & Beisiegel, 2001). La paraoxonasa-1 (PON-1) es una esterasa dependiente del calcio, la cual contribuye a la protección antioxidante conferida por las lipoproteínas de alta densidad sobre la oxidación de las LDL. Además, la PON-1 es un potente inhibidor de la colinesterasa y una arilesterasa que hidroliza el paraoxón, un metabolito tóxico activo del paratión, para así proporcionar protección contra el envenenamiento por organofosforados y la metabolización de las neurotoxinas ambientales, que podrían ser responsables de neurodegeneración. Se ha sugerido que la actividad paraoxonasa es significativamente menor en los pacientes con EA (Schuessel, Leutner, Cairns, Muller, & Eckert, 2004).

El aumento de la nitración de proteínas en el cerebro con EA apoya la teoría de que el estrés nitrosativo también contribuye a la neurodegeneración en la EA (Castegna et al., 2003; Dalle-Donne et al., 2005; Sultana et al., 2006). La nitración de proteínas también aumenta la susceptibilidad de las proteínas del cerebro a la degradación proteosomal (Gow, Duran, Malcolm, & Ischiropoulos, 1996). La sobreexpresión de la óxido nítrico sintasa inducible y la óxido nítrico sintasa neuronal podría ser responsable de un aumento de los niveles de ERN. Se han observado niveles elevados de proteínas nitradas presentes en el cerebro y en el LCR de pacientes con EA, lo que implica un papel importante de las ERN en la EA (Castegna et al., 2003; Hensley et al., 1998; Sultana et al., 2006). Otro mecanismo potencial de la oxidación de las proteínas está relacionado con el radical tóxico ONOO⁻, formado en la reacción del O₂^{•-} con el ON (Teunissen, de Vente, Steinbusch, & De Bruijn, 2002). La formación de ONOO⁻ puede ocurrir bajo

condiciones de EO en combinación con la síntesis continua de ON (Chiueh, 1999; Dawson & Dawson, 1998). Aunque el mecanismo no es universalmente aceptado, se cree que la formación de la 3-nitrotirosina (3-NT) se produce por la reacción del ONOO⁻ con los residuos de tirosina de las proteínas (Teunissen et al., 2002). La 3-NT y la o-tirosina son productos finales de los carbonilos, los cuales son resistentes a la hidrólisis ácida, y normalmente no están presentes en las proteínas, pero son ampliamente utilizados como marcadores de la oxidación de proteínas (Praticò & Delanty, 2000). Se han observado niveles elevados de 3-NT en el hipocampo, lóbulo parietal inferior, en regiones neocorticales del cerebro con EA y en el LCR ventricular, en comparación con controles de la misma edad (Smith, Richey Harris, Sayre, Beckman, & Perry, 1997; Tohgi et al., 1999). Sorprendentemente, se observó que los niveles de 3-NT disminuyeron con el curso de la EA y la formación de la lesión, lo que sugiere que la histopatología de la EA está ligada a cambios compensatorios intracelulares contra el EO (Nunomura et al., 2001). Estas observaciones indican que el EO en las proteínas es un evento temprano en la patogénesis de la EA.

2.3.2. Oxidación de los lípidos

La peroxidación lipídica es un proceso donde los lípidos reaccionan con el oxígeno molecular. Es un proceso donde están implicadas las ERO, las cuales atacan a los átomos de hidrógeno de los lípidos, principalmente lípidos poliinsaturados, para formar un ROO[•] (Gutteridge, 1995). Como resultado de la peroxidación de los lípidos, se puede observar un daño estructural de las membranas celulares y la generación de productos oxidados, algunos de los cuales son químicamente reactivos y modifican covalentemente a las macromoléculas, por lo que se cree que son los principales efectores del daño tisular (Montine et al., 2004). En la circulación sanguínea, se cree que la oxidación de los ácidos grasos insaturados, transportados en las lipoproteínas, juega un papel clave en el desarrollo y la progresión de la EA (Mielke & Lyketsos, 2006). Las placas seniles, los ovillos neurofibrilares y la pérdida de neuronas en el cerebro con EA, son el resultado de anomalías en la peroxidación lipídica y el metabolismo, que pueden ser causadas o incrementadas por A β (Lane & Farlow, 2005; Smith, Cappai, & Barnham, 2007).

El grado de peroxidación lipídica se puede evaluar cuantitativamente mediante la medición de los niveles de sus productos finales, por ejemplo, la medición del MDA por el test de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), o la medición de aldehídos e isoprostanos (Praticò & Delanty, 2000). La mayoría de los estudios han demostrado niveles altos de MDA y/o TBARS en el cerebro con EA (Lovell, Ehmann, Butler, & Markesbery, 1995), aunque otros estudios no han encontrado alteraciones o han encontrado una reducción de los niveles de este biomarcador (Hayn et al., 1996; Schuessel et al., 2004). Algunos investigadores han demostrado un claro incremento en la producción de TBARS en los eritrocitos (Kawamoto et al., 2005), y en los niveles de MDA en los fibroblastos y linfocitos (Cecchi et al., 2002), pero se observó que los niveles plasmáticos de MDA en la EA eran normales (Kalman et al., 1994).

La oxidación de los AGPI, da como resultado la producción de múltiples aldehídos, por ejemplo, el 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), el cual puede modificar las proteínas, promoviendo la agregación de las mismas (Camandola, Poli, & Mattson, 2000). El análisis de cerebros con EA ha demostrado un aumento del HNE libre en la amígdala, el hipocampo y en el giro parahipocampal, en comparación con controles de la misma edad (Markesbery & Lovell, 1998). Este aumento de la concentración se corresponde con las regiones que muestran las alteraciones histopatológicas más llamativas de la EA. Un aumento significativo del HNE libre en el LCR y en el suero de enfermos de Alzheimer proporciona un biomarcador potencial para la enfermedad (Lovell, Ehmann, Mattson, & Markesbery, 1997; McGrath et al., 2001). Además, el HNE está elevado en las neuronas tratadas con A β (1-42) (Boyd-Kimball, Abdul, Reed, Sultana, & Butterfield, 2004; Lauderback et al., 2001). El HNE es capaz de la inhibición de los transportadores neuronales de glucosa y glutamato, de la inhibición de las Na-K ATPasas, la activación de quinasas y de la desregulación de la señalización de calcio intracelular que, en última instancia, induce un mecanismo de cascada apoptótica (Mattson & Chan, 2003; Tamagno et al., 2003). Por lo tanto, la evidencia muestra que el HNE es uno de los principales productos citotóxicos de la peroxidación lipídica. Después de la peroxidación lipídica, el único aducto conocido actualmente, formado a partir de la modificación de proteínas por el HNE en los casos de EA, es una modificación 2-pentilpirrol de la lisina. Estos hallazgos, junto con la demostración de que el HNE es citotóxico para las

neuronas e impide la función de las proteínas de membrana, incluyendo el transportador de glucosa neuronal GLUT 3, indican que el HNE es un marcador característico y una toxina que conduce a la neurodegeneración en la EA (Bruce-Keller et al., 1998).

Los isoprostanos son isómeros de las prostaglandinas, y son productos finales, químicamente estables, de la oxidación de los AGPI, catalizada por las ERO. Han sido detectados niveles elevados de F2-isoprostanos en el cerebro con EA (Praticò, Lee, Trojanowski, Rokach, & Fitzgerald, 1998) y en la orina de pacientes con EA (Praticò et al., 1998). También se observaron niveles elevados de 8,12-iso-iPF 2α -VI y iPF 2α -III como F2-isoprostanos específicos, en el LCR, sangre y orina de individuos con EA (Praticò et al., 2000; Tuppo et al., 2001), aunque otros investigadores no pudieron confirmar estos hallazgos respecto a las concentraciones de F2-isoprostano en plasma y orina (Montine et al., 2002).

La Apo E es la principal apolipoproteína en el SNC, capaz del transporte de lípidos y de la regulación del metabolismo lipídico. El aumento del riesgo de EA asociado a la Apo E4 puede ser modulado por la dieta, por los factores de riesgo vascular, y por los polimorfismos genéticos que afectan la función de otras proteínas transportadoras y enzimas implicadas en la homeostasis de lípidos del cerebro (Dietrich et al., 2005; Galbusera et al., 2004). Por otra parte, la herencia del alelo Apo E4 representa el factor de riesgo genético más fuerte para la EA esporádica. Las evidencias sugieren que las isoformas de Apo E pueden influir en la distribución celular de productos de la peroxidación de lípidos en el cerebro y, por lo tanto, pueden contribuir al riesgo de EA asociado con la Apo E4 (Bassett & Montine, 2003). Además, la enzima lipoxigenasa 12/15 está aumentada en las regiones frontal y temporal afectadas de los cerebros con EA, y la activación de esta enzima se produce de forma temprana en el curso de la EA, antes de la aparición de la demencia, lo que implica a la lipoxigenasa 12/15 en la peroxidación lipídica, en la patogénesis de la EA (Yao, Clark, Trojanowski, Lee, & Praticò, 2005).

2.3.3. Oxidación de los glúcidos

La glicación ha sido responsable de muchas enfermedades relacionadas con la edad (Kuhla et al., 2007; Sato et al., 2006). La glicación de las proteínas comienza como una reacción no enzimática, con la condensación espontánea de grupos cetona o aldehídos de azúcares, con un grupo aminoácido libre, para formar una base de Schiff lábil. Después, una cascada de reacciones da como resultado la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE), como por ejemplo la pentosidina y la N-epsilon-carboximetil-lisina (Richter et al., 2005), que están compuestas de agregados de proteínas heterogéneas irreversiblemente reticuladas. El receptor de los AGE, conocido como RAGE, es también un receptor del A β (Geroldi, Falcone, & Emanuele, 2006; Sato et al., 2006). La combinación de los AGE y la RAGE puede causar EO, causado por la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, por la producción de hemooxigenasa-1, y por la activación del factor de transcripción nuclear kappaB (NF-kB). La unión del A β con el RAGE también induce la expresión del factor estimulante de colonias de macrófagos, que media la activación microglial (Huang, Liu, Grundke-Iqbal, Iqbal, & Gong, 2005; Yan et al., 1997). Esto introduce una vía inflamatoria, de acuerdo con un procedimiento que vincula los procesos oxidativos y la inflamación en la EA (Boissiere et al., 1997; Gao et al., 2002). Además, se ha observado un aumento de las cantidades de AGE en las placas seniles y en los ovillos neurofibrilares en la EA (Girones et al., 2004; Vitek et al., 1994), mientras que los niveles cerebrales de pentosidina y N-epsilon-carboximetil-lisina fueron similares en los pacientes con EA y en los controles (Seidl, Schuller, Cairns, & Lubec, 1997), refutando la hipótesis de la glicación.

También se han observado cantidades elevadas de proteínas oxidadas (Choi, Malakowsky, Talent, Conrad, & Gracy, 2002) y una mayor tasa de glicación de proteínas (Riviere, Birlouez-Aragon, & Vellas, 1998) en el plasma de pacientes con EA.

2.3.4. Oxidación del ADN y ARN

Las ERO también pueden causar daño oxidativo al ADN nuclear y mitocondrial. Dentro de este daño oxidativo se incluyen, las alteraciones de las

bases, la oxidación de la desoxirribosa, los intercambios de cromátidas hermanas, y el entrecruzamientos entre proteínas y ADN (Sohal & Weindruch, 1996). Las ERO, en particular los OH^\bullet , interactúan con el ADN, generando diversos productos de las bases del ADN, tales como la 8-OHdG, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina, 8,5'-ciclo-2'-desoxiguanosina, 8-hidroxiadenina, 2-hidroxiadenina, glicol timina, y glicol citosina (Wiseman & Halliwell, 1996). La guanina, al tener el potencial de oxidación más bajo de las cuatro bases del ADN, es la base que se oxida con más facilidad y, por lo tanto, es la más utilizada para el análisis de la oxidación del ADN. La 8-OHdG es el marcador más predominante del daño oxidativo del ADN *in vivo*, resultante del ataque del radical OH^\bullet a la desoxiguanosina, y se puede medir por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica, técnicas de cromatografía de gases/espectrometría de masas (Praticò & Delanty, 2000; Shigenaga, Aboujaoude, Chen, & Ames, 1994), y por ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas.

Se ha observado un aumento del daño oxidativo al ADN mitocondrial en el envejecimiento y en varias regiones del cerebro con EA, lo que indica que la oxidación del ADN tiene un papel en la patología de la EA (Lyras, Cairns, Jenner, Jenner, & Halliwell, 1997). Del mismo modo, el daño al ADN nuclear, producido por las ERO, se incrementa en la EA (Gabbita, Lovell, & Markesbery, 1998; Markesbery & Carney, 1999). La evidencia también muestra niveles elevados de los productos de la oxidación del ADN en el LCR de pacientes con EA (Lovell, Gabbita, & Markesbery, 1999). Se ha demostrado que la oxidación del ADN aumenta con la edad, observándose un aumento de la 8-OHdG en la corteza cerebral y el cerebelo (Mecocci, Macgarvey, & Beal, 1994).

También ha sido observado un efecto directo de $\text{A}\beta$ en la oxidación del ADN en las células PC12 neuronales, sugiriéndose que los RL generados por $\text{A}\beta$ causan alteraciones oxidativas del ADN, incluyendo dímeros de purina (Duker et al., 2001).

Un estudio que examinó la relación entre los productos de oxidación 8-OHdG, 8-hidroxiguanosina (8-OHG) y las lesiones de la EA en las etapas tempranas de la enfermedad, indicó que los marcadores de EO están presentes en las neuronas sin ovillos neurofibrilares (Nunomura et al., 1999), lo que confirma la primacía del EO, que se produce décadas antes de la aparición de la enfermedad.

Por otra parte, las neuronas que contienen ovillos neurofibrilares mostraron una disminución relativa en el nivel de 8-OHG, en comparación con las neuronas libres de ovillos neurofibrilares. Estas observaciones también apuntan a que el daño oxidativo es un evento temprano en la patogénesis de la EA, y que disminuye con la progresión de la enfermedad, lo que sugiere mecanismos intracelulares compensatorios que reducen el EO (Nunomura et al., 2001).

Los estudios han demostrado entre un 30-70% de oxidación del ARN mitocondrial en la corteza frontal del cerebro con EA, en comparación con un 2% de oxidación en los controles de la misma edad (Shan & Lin, 2006). También se ha observado un aumento de los niveles de 8-OHG en el hipocampo y el neocórtex del cerebro con EA, mientras que el nivel cerebral de 8-OHG no fue alterado en comparación con los controles (Ding, Markesbery, Cekarini, & Keller, 2006; Nunomura et al., 1999; Shan, Tashiro, & Lin, 2003). Se ha identificado un aumento de la 8-OHG, no sólo en el tejido cerebral, sino también en el LCR de los sujetos con EA (Abe, Tohgi, Isobe, Murata, & Sato, 2002). La oxidación del ARN en el cerebro con EA podría hacer que la célula fuese incapaz de iniciar la síntesis de proteínas, lo que dificultaría la defensa de la célula contra un mayor daño oxidativo, un efecto observado en la EA (Ding et al., 2006).

2.4. LA INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La inflamación es un proceso fisiológico en respuesta a un daño en los tejidos, que puede ser producido por una infección microbiana patógena, por una irritación química o directamente por heridas en los tejidos. En la etapa más temprana de la inflamación, los neutrófilos son las primeras células en migrar a los lugares inflamados, bajo la regulación de moléculas producidas por macrófagos y mastocitos, que se encuentran preestacionados en los tejidos. A medida que la inflamación progresa, varios tipos de leucocitos, linfocitos y otras células inflamatorias se activan y son atraídos por el sitio inflamado, a través de una red de señales que implican un gran número de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas (Belardinelli et al., 2006).

La inflamación puede ser local o sistémica, y puede ser clasificada como aguda o crónica. La inflamación aguda es una respuesta no específica y de corta duración a un estímulo dañino, iniciado por varios mediadores químicos que

promueven cambios celulares y vasculares, caracterizados por la vasodilatación, y el flujo de plasma y leucocitos al sitio de la lesión, seguido de la reparación del tejido dañado (Kundu & Surh, 2012). La inflamación aguda es fundamentalmente una respuesta protectora cuyo fin es prevenir el daño de los tejidos y/o iniciar el proceso de reparación. Si la respuesta inflamatoria aguda falla para eliminar el patógeno, el proceso inflamatorio persiste y adquiere nuevas características. La inflamación crónica puede producirse cuando hay una resolución inadecuada de la inflamación aguda, la cual puede resultar perjudicial y puede conducir a la enfermedad (Federico, Morgillo, Tuccillo, Ciardiello, & Loguercio, 2007). Muchas enfermedades crónicas inflamatorias, que no son causadas por una infección o por un daño, parecen estar asociadas a la disponibilidad continua de alimentos ricos en calorías, a un bajo nivel de actividad física, a la exposición a compuestos tóxicos y a una edad avanzada (Medzhitov, 2008).

Los procesos inflamatorios de la inmunidad innata participan en numerosos cambios de los tejidos, durante el envejecimiento normal y en la mayoría de las enfermedades degenerativas crónicas que ocurren durante el envejecimiento. El fenómeno del envejecimiento está asociado con una alta incidencia de enfermedades inflamatorias y tiene varios elementos de la respuesta inflamatoria crónica. Además del EO, se sabe que los eventos inflamatorios crónicos participan en el declive de las funciones fisiológicas del organismo.

Las respuestas inflamatorias son parte de las defensas inmunológicas del organismo hacia los patógenos, y son respuestas de los tejidos hacia un daño. A nivel molecular, las infecciones sistémicas y las heridas traumáticas pueden desencadenar respuestas inmunes innatas de forma rápida, con la secreción hepática de interleuquina (IL) -6 y factor de necrosis tumoral (TNF) - α que median en el metabolismo energético sistémico y la inmunidad adaptativa. IL-1, IL-6 y TNF- α son ejemplos de citoquinas proinflamatorias, mientras que IL-10, IL-13 y el inhibidor de proteasa de leucocitos de secreción entran en la categoría de las citoquinas antiinflamatorias. Estos mediadores pro y antiinflamatorios son sintetizados y liberados por una amplia variedad de células en respuesta a una infección, un daño tisular, y a otros estímulos bioquímicos.

Las prostaglandinas y los leucotrienos son metabolitos lipídicos, derivados del ácido araquidónico, con potentes características proinflamatorias y

potencialmente patogénicas. Estas sustancias son importantes mediadores proinflamatorios y pueden inducir la producción de ERO, conduciendo al daño de los tejidos (Yu & Chung, 2001).

La ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LOX), enzimas fundamentales en la cascada de síntesis de las prostaglandinas, convierten el ácido araquidónico a prostaglandinas H₂ y leucotrienos, y generan ERO, particularmente durante el envejecimiento, debido al incremento de las actividades de COX y LOX (Zou et al., 2009). Niveles elevados de COX y LOX son un importante factor en la inflamación molecular (Zou et al., 2009). Además, un incremento de las prostaglandinas proinflamatorias y un descenso de las prostaglandinas citoprotectoras han sido asociados con el envejecimiento (Choi & Yu, 1998).

La inflamación del cerebro es una característica patológica de la EA, sin embargo, las características inflamatorias tales como hinchazón, calor y dolor no están presentes en el cerebro y por lo tanto, nos referimos a una inflamación crónica en lugar de una inflamación aguda (Akiyama et al., 2000). Un rasgo característico de los tejidos inflamados de forma crónica es la presencia de un mayor número de monocitos, así como derivados de monocitos macrófagos tisulares, es decir, células de microglía en el SNC (Akiyama et al., 2000; Mitchell & Cotran, 2003). La inflamación se produce claramente en las regiones patológicamente vulnerables del cerebro con EA, con una mayor expresión de proteínas de fase aguda y citoquinas proinflamatorias que son apenas evidentes en el cerebro sano (Cacquevel, Lebourrier, Cheenne, & Vivien, 2004; Finch & Morgan, 2007; Griffin & Mrak, 2002; Mrak & Griffin, 2005). Microglía, astrocitos y neuronas son responsables de la reacción inflamatoria.

Las células fuertemente activadas producen mediadores inflamatorios tales como citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, proteínas inflamatorias de macrófagos, proteínas quimioatrayentes de monocitos, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, factores de coagulación, ERO (y otros radicales), ON, factores de complemento, proteasas, inhibidores de proteasa, pentraxinas, y la proteína C reactiva (Akiyama et al., 2000; Griffin et al., 1998; Town, Nikolic, & Tan, 2005; Tuppo & Arias, 2005).

La hipótesis es que la naturaleza de las placas de A β y los ovillos neurofibrilares estimulan una reacción inflamatoria crónica en el cerebro para

limpiar estos desechos (Town et al., 2005). Estas placas contienen neuritas distróficas, microglía activada y astrocitos reactivos (Akiyama et al., 2000; Dickson et al., 1988; Rogers, Lubernarod, Styren, & Civin, 1988). Las fibrillas amiloides agregadas y los mediadores inflamatorios secretados por las células microgliales y astrocíticas, contribuyen a la distrofia neuronal que aparece en el cerebro con EA (Findeis, 2007; Nussbaum & Ellis, 2003). La glía activada de forma crónica, además, puede matar a las neuronas adyacentes mediante la liberación de productos altamente tóxicos como ERO, ON, enzimas proteolíticas o aminoácidos excitatorios (Halliday, Robinson, Shepherd, & Kril, 2000). Los mediadores inflamatorios y las condiciones de estrés, a su vez, aumentan la producción de APP y el procesamiento amiloidogénico de APP para inducir la producción del péptido β -amiloide-42 ($A\beta$ -42). Estas circunstancias también inhiben la formación de la fracción de APP soluble que tiene un efecto protector neuronal (Atwood et al., 2003; Friedlander, 2003; Misonou, Morishima-Kawashima, & Ihara, 2000). Por otra parte, $A\beta$ induce la expresión de citoquinas proinflamatorias en las células gliales en un círculo vicioso (Griffin et al., 1998; Lindberg, Hjorth, Post, Winblad, & Schultzberg, 2005), la activación de la cascada del complemento (Aisen, 1997; McGeer et al., 1993), y la estimulación de los sistemas de enzimas inflamatorias tales como la óxido nítrico sintasa inducible y la enzima COX-2. Varias líneas de evidencia sugieren que todos estos factores pueden contribuir a la disfunción neuronal y a la muerte celular (Abbas et al., 2002; Brown & Bal-Price, 2003).

2.4.1. La microglía

La microglía constituye alrededor del 10% de las células en el sistema nervioso. Estas células representan la primera línea de defensa contra la invasión de agentes patógenos u otros tipos de lesiones en el tejido cerebral. En situaciones patológicas, tales como enfermedades neurodegenerativas, apoplejía, lesión traumática e invasión tumoral, estas células se activan, migran y rodean a las células dañadas o muertas, y posteriormente limpian los desechos celulares de esas zonas. Esta acción es similar a la realizada por los macrófagos fagocíticos activos del sistema inmune periférico (Fetler & Amigorena, 2005).

La evidencia actual apunta hacia un papel central de la inflamación en la EA. Esta inflamación está mediada por citoquinas proinflamatorias que crean una interacción inflamatoria crónica y autosostenible entre la microglía y los astrocitos activados, las neuronas estresadas y las placas de A β .

Se ha sugerido que la microglía se asocia, preferentemente, con ciertos tipos de placa amiloide (D'Andrea, Cole, & Ard, 2004), y que los péptidos amiloides y su proteína precursora APP son potentes activadores gliales (Barger & Harmon, 1997), sin embargo, la alteración del gen APP y sus productos proteolíticos retrasan y disminuyen la activación microglial (DeGiorgio et al., 2002). Esta activación es directamente dependiente de la carga amiloide. También se ha observado que el tratamiento con péptidos rompedores de hojas beta se traduce en la reducción de la inflamación cerebral (Permanne et al., 2002).

A β es capaz de estimular el NF-kB dependiente de la vía que se requiere para la producción de citoquinas (Combs, Karlo, Kao, & Landreth, 2001). La posterior activación de la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno, por la unión de A β a la superficie de la célula microglial, induce la expresión de genes proinflamatorios y conduce a la producción de citoquinas y quimioquinas (Ho, Drego, Hakimian, & Masliah, 2005).

En algunas situaciones el papel de la microglía es beneficioso, ya que la microglía activada puede reducir la acumulación de A β mediante el aumento de su fagocitosis, su aclaramiento y su degradación (Frautschy et al., 1998; Qiu et al., 1998). La microglía también puede secretar una serie de factores solubles, tales como los factores neurotróficos derivados de la glía, que son potencialmente beneficiosos para la supervivencia de las neuronas (Liu & Hong, 2003). Se propuso, por lo tanto, que la activación microglial por inmunización activa podría ser un mecanismo válido para la eliminación de las placas seniles (Gelinas, DaSilva, Fenili, St George-Hyslop, & McLaurin, 2004), sin embargo, debido a que un ensayo en humanos de una vacuna contra A β produjo en algunos pacientes meningoencefalitis, este tratamiento se interrumpió (Holmes et al., 2008). Se ha descubierto que la vacunación nasal en ratones es capaz de disminuir A β . El grado de esta reducción se correlacionó con la activación microglial, lo que sugiere que puede ser un enfoque prometedor para la inmunización humana contra A β (Frenkel, Maron, Burt, & Weiner, 2005).

2.4.2. Los astrocitos

Se sabe que los astrocitos son células importantes para el aclaramiento y la degradación de $A\beta$, para proporcionar soporte trófico a las neuronas, y para formar una barrera protectora entre los depósitos de $A\beta$ y las neuronas (Rossner, Lange-Dohna, Zeitschel, & Perez-Polo, 2005). La presencia de un gran número de astrocitos asociados con los depósitos de $A\beta$ en la EA sugiere que estas lesiones generan moléculas quimiotácticas que median el reclutamiento de astrocitos.

Bajo ciertas condiciones relacionadas con el estrés crónico, sin embargo, el papel de los astrocitos puede no ser beneficioso. Un estudio sugiere que los astrocitos también podrían ser una fuente de $A\beta$, debido a que sobreexpresan la enzima β -secretasa de APP BACE1 en respuesta al estrés crónico (Rossner et al., 2005). Experimentos *in vitro* e *in vivo* sugieren, sin embargo, que los astrocitos inflamatorios activos no generan cantidades significativas de estas moléculas.

2.4.3. El sistema del complemento

El sistema del complemento representa un sistema de ataque complejo y regulado, diseñado para destruir a los patógenos y para ayudar en la fagocitosis de los materiales de desecho. Los componentes de este sistema llevan a cabo cuatro funciones principales: el reconocimiento, la opsonización, la estimulación inflamatoria y la destrucción directa a través del complejo de ataque de membrana (McGeer & McGeer, 2002). Las proteínas del complemento interactúan con receptores de superficie celular para promover una respuesta inflamatoria local, que contribuye a la protección y a la curación del huésped. La activación del complemento produce inflamación y daño celular, sin embargo, es esencial para eliminar restos de células y agregados de proteínas potencialmente tóxicas (Shen & Meri, 2003).

El sistema del complemento se compone de unas 30 proteínas asociadas a la membrana celular que pueden ser activadas por diferentes vías: la vía clásica (que implica a los componentes C1q, C1r, C1s, C4, C2 y C3) se activa principalmente por la interacción de C1q con complejos inmunes (antígenos de anticuerpos), pero la activación también se puede lograr después de la interacción de C1q con moléculas no inmunes, tales como moléculas de ADN, ARN, proteína C reactiva,

amiloide P del suero, lipopolisacáridos bacterianos, y algunas membranas de hongos y virus. El inicio de la vía alternativa (que implica a C3, factor B, factor D, y properdina) no requiere la presencia de complejos inmunes y conduce a la deposición de fragmentos de C3 en las células diana. La red molecular de las cascadas del complemento clásica y alternativa, con el reconocimiento de patrones, la activación proteolítica, las funciones de los fragmentos en la fagocitosis y estimulación de la defensa inmune del huésped, se han revisado en detalle en otros estudios (Bohlsón, Fraser, & Tenner, 2007; Gasque, 2004; Kohl, 2006).

Muchas proteínas y receptores del complemento pueden sintetizarse localmente en el cerebro (Barnum, 1995; Morgan & Gasque, 1996; Nataf, Stahel, Davoust, & Barnum, 1999). La activación del sistema del complemento se ha observado en el cerebro en diferentes enfermedades inflamatorias y degenerativas, por ejemplo, en la EA, en la esclerosis múltiple y en el derrame cerebral (Bonifati & Kishore, 2007; Morgan & Gasque, 1996; Shen & Meri, 2003). Sorprendentemente, la defensa del complemento más potente en el cerebro humano parece estar localizada en los astrocitos, los cuales pueden expresar todos los componentes de las vías clásica y alternativa, tales como C1-C9, factores reguladores B, D, H, I, y varios receptores del complemento, como por ejemplo, C1qR, C3aR y C5aR (Barnum, 1995; Morgan & Gasque, 1996). En cambio, las células microgliales exhiben un conjunto más reducido de las proteínas del complemento, como por ejemplo, C1q, C3 y los receptores C1qR, CR3, y C5aR, que apoyan la captación fagocítica de estructuras específicas. Curiosamente, las neuronas también expresan varias proteínas reguladoras, tales como factores H y S, así como los receptores C1qR, C3aR y C5aR (Benard et al., 2008; O'Barr et al., 2001).

Diversos artículos de investigación han descrito como el sistema del complemento del cerebro está activado en la EA (Bonifati & Kishore, 2007; Shen & Meri, 2003; Tenner, 2001). Además, parece ser que este sistema es activado en una etapa muy temprana de la enfermedad. Los péptidos A β pueden activar la cascada del complemento sin la presencia de anticuerpos. Estos péptidos, además, pueden producir componentes del complemento (Rogers et al., 1992). La proteína C1q se localiza principalmente en las neuronas, junto con las placas neuríticas,

tanto en la corteza frontal como en el hipocampo (Afagh, Cummings, Cribbs, Cotman, & Tenner, 1996). Curiosamente, la proteína C1q está presente sólo en las placas amiloides tioflavina-positivas que contienen la conformación de hojas beta (Afagh et al., 1996), mostrando que C1q puede afectar el proceso de agregación de amiloide.

Por otro lado, existe una amplia literatura que demuestra que el sistema del complemento también tiene un papel neuroprotector en la neuroinflamación (Bohlsón et al., 2007; Mukherjee & Pasinetti, 2000; Shen & Meri, 2003; Tenner, 2001). Por ejemplo, la inhibición del sistema del complemento claramente podría aumentar la formación de la placa amiloide y la neurodegeneración en ratones transgénicos con EA (Maier et al., 2008). Se observó también que la inhibición del complemento C3 agravó la neuropatología en ratones con EA (Wyss-Coray et al., 2002). La actividad de la proteína C1q en el aclaramiento de las células apoptóticas y los agregados de A β en las células gliales, puede ser la causa principal de la neuroprotección.

2.4.4. Las quimioquinas

Experimentos recientes se han centrado en comprender el papel que juegan las quimioquinas y sus receptores en la neuroinflamación que aparece en la EA.

La familia de las quimioquinas se compone de más de 50 moléculas diferentes que se encargan de la quimiotaxis, de la extravasación de tejidos, y de la modulación de la función de los leucocitos durante la inflamación (Luster, 1998; Owens, Babcock, Millward, & Toft-Hansen, 2005). La importancia de la generación de quimioquinas en el cerebro de pacientes con EA está remarcada por el hecho de que estas moléculas pueden ser fuertes reguladores de la migración microglial y del reclutamiento de los astrocitos en el área de la neuroinflamación. Por tanto, son responsables de la extensión de la inflamación local.

Si bien se ha informado de que las quimioquinas ejercen una acción fisiológica en el cerebro sano (Hesselgesser & Horuk, 1999), la mayoría de los estudios se han centrado en el patrón de expresión de las quimioquinas y de sus respectivos receptores en enfermedades neurológicas, tales como la esclerosis

múltiple, la lesión cerebral traumática y el derrame cerebral. Todos estos trastornos comparten la interrupción de la barrera hematoencefálica como un suceso patogénico importante, permitiendo posteriormente que los leucocitos periféricos se infiltren en el lugar de la lesión (Glabinski & Ransohoff, 1999). Por el contrario, no existe evidencia convincente para la alteración de la barrera hematoencefálica o la infiltración significativa de leucocitos en el cerebro con EA.

Sin embargo, se ha observado que varias quimioquinas y receptores de quimioquinas pueden ser reguladas en el cerebro con EA (Xia & Hyman, 1999). Las quimioquinas pueden desempeñar un papel importante en el reclutamiento de la microglía y astrogía al lugar de la deposición de A β . A β estimula los monocitos humanos generando quimioquinas como la IL-8, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP) -1, la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) -1 α y MIP-1 β *in vitro*. La microglía cultivada a partir de autopsias de pacientes con EA y pacientes sin demencia revelan un aumento de la expresión de IL-8, MCP-1 y MIP-1 α después de la exposición experimental a A β . Apoyando la hipótesis de que los astrocitos contribuyen activamente al componente inflamatorio de la enfermedad, se ha detectado la proteína MIP-1 α en astrocitos reactivos cercanos a las placas de A β .

2.4.5. Las neuronas

Antiguamente se creía que las neuronas eran meros espectadores pasivos en la neuroinflamación, sin embargo, la evidencia más reciente sugiere que las neuronas pueden generar moléculas inflamatorias. Así, las neuronas pueden servir como fuente de complemento, de prostanoïdes derivados de COX-2 (Davis & Laroche, 2003; Pavlov & Tracey, 2005), de varias citoquinas (Gong, Qin, Betz, Liu, & Yang, 1998; Orzylowska, Oderfeld-Nowak, Zaremba, Januszewski, & Mossakowski, 1999; Suzuki et al., 1999; Yermakova & O'Banion, 2000) y del factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF) (Du Yan et al., 1997).

Aunque la expresión de COX-2 es impulsada por la actividad fisiológica sináptica (Yermakova & O'Banion, 2000), y por lo tanto puede ser considerada como una proteína expresada de forma fisiológica en una subclase de neuronas, la inflamación inducida por la generación de prostanoïdes puede contribuir a la destrucción neuronal. Como un factor adicional, la expresión de la enzima

inflamatoria óxido nítrico sintasa inducible, puede degenerar neuronas en el cerebro con EA (Heneka et al., 2001; Lee, Zhao, Hirano, & Dickson, 1999; Vodovotz et al., 1996). También existen pruebas contundentes sobre la óxido nítrico sintasa inducible, relacionadas con la formación a largo plazo de ON y la liberación de ON dependiente del ONOO⁻ (Smith et al., 1997). Se ha demostrado que los derivados gliales y neuronales de ON son la causa de disfunción neuronal y muerte celular *in vitro* e *in vivo* (Boje & Arora, 1992; Heneka et al., 1998).

2.4.6. Las citoquinas

Las citoquinas son pequeñas proteínas no estructurales, con pesos moleculares que varían de 8 a 40 kDa. Originalmente llamadas linfoquinas y monoquinas para indicar sus fuentes celulares, pronto quedó claro que el término "citoquina" era la mejor descripción, ya que casi todas las células nucleadas son capaces de sintetizar estas proteínas y, a su vez, también son capaces de responder a estas moléculas. Sus actividades biológicas nos permiten agruparlas en clases diferentes.

Las citoquinas son secretadas por una variedad de células inmunes (por ejemplo, linfocitos T, macrófagos, células asesinas naturales) y células no inmunes (por ejemplo, células de Schwann y fibroblastos). Los efectos biológicos inducidos por las citoquinas incluyen la estimulación o inhibición de la proliferación celular, la citotoxicidad/apoptosis, la actividad antiviral, el crecimiento y la diferenciación celular, las respuestas inflamatorias, y la regulación de la expresión de proteínas de membrana de superficie. La función principal de las citoquinas es la regulación de la diferenciación de células T a partir de células no diferenciadas, para dar células T-helper 1 y 2, células T reguladoras, y células T-helper 17 (Steinman, 2007). Estas proteínas reguladoras incluyen IL, interferones (IFN), factores estimulantes de colonias (CSF), TNF, y ciertos factores de crecimiento (GF) (Meager, 2004, 2005).

Se ha demostrado que muchas de estas citoquinas son producidas por las neuronas o células gliales, y hay una serie de estudios que indican cambios en sus niveles en la sangre, LCR y en el cerebro con EA. Los niveles de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GMSF), IFN- α , el tipo B del receptor de IL-8, y el receptor de CSF-1, se encuentran aumentados

en el tejido cerebral con EA (McGeer & McGeer, 1997; Walker, McGeer, & McGeer, 1997).

Se han descrito un gran número de interacciones entre las citoquinas y los componentes de las placas seniles en la EA, sugiriéndose que podría generarse un círculo vicioso (McGeer & McGeer, 1997). Así, la proteína A β de las placas seniles potencia la secreción de IL-6 e IL-8 por la IL-1 β activada por las células de astrocitoma, la secreción de IL-6 y TNF- α por los astrocitos (Forloni, Mangiarotti, Angeretti, Lucca, & De Simoni, 1997), y la IL-8 por los monocitos. Las citoquinas también pueden estimular la secreción de otras proteínas que se encuentran en las placas seniles (McGeer & McGeer, 1997). Por otra parte, también se pueden producir efectos sinérgicos entre las citoquinas y A β . Por ejemplo, IFN- γ está en sinergia con A β para provocar la liberación de TNF- α y ERN que son tóxicas para las neuronas, y la IL-1 aumenta la toxicidad de A β en las células PC12.

Algunas citoquinas promueven claramente la inflamación y se denominan citoquinas proinflamatorias, mientras que otras citoquinas suprimen la actividad de las citoquinas proinflamatorias y son llamadas citoquinas antiinflamatorias. Por ejemplo, IL-4, IL-10, e IL-13 son potentes activadores de los linfocitos B, sin embargo, IL-4, IL-10 e IL-13 también son potentes agentes antiinflamatorios. Estas son citoquinas antiinflamatorias en virtud de su capacidad para suprimir los genes de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, TNF, y las quimioquinas. IFN- γ es otro ejemplo de la naturaleza pleiotrópica de las citoquinas. IFN- γ posee actividad antiviral, de la misma manera que IFN- α e IFN- β . IFN- γ es también un activador de la vía que afecta a las células T citotóxicas, sin embargo, se considera a IFN- γ una citoquina proinflamatoria, ya que aumenta la actividad de TNF e induce ON. El concepto de que unas citoquinas tienen la función de inducir la inflamación, mientras que otras citoquinas tienen la función principal de suprimir la inflamación es fundamental para la biología de las citoquinas y también para la medicina clínica.

Este concepto se basa en los genes que se codifican para la síntesis de pequeñas moléculas mediadoras que están reguladas durante la inflamación. Por lo tanto, un "balance" entre los efectos de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias puede determinar el resultado de la enfermedad, ya sea a corto o a largo plazo. De hecho, los datos de algunos estudios sugieren que la

susceptibilidad a la enfermedad está genéticamente determinada por el equilibrio o la expresión de cualquiera de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Sin embargo, se debe considerar que algunos estudios genéticos a menudo son difíciles de interpretar.

2.4.6.1. Citoquinas proinflamatorias

El grupo de citoquinas de mediadores inflamatorios es secretado por la microglía y los astrocitos que rodean a las placas neuríticas de A β . Su producción se incrementa en los estados inflamatorios y funcionan mediante la regulación de la intensidad y duración de la respuesta inmune (Tuppo & Arias, 2005). La familia de las citoquinas IL-1 incluye dos proteínas agonistas, la IL-1 α y la IL-1 β , las cuales desencadenan la activación celular tras la unión con receptores específicos de membrana. También se incluye a la IL-1ra, que es una proteína secretora glicosilada de 23 kDa que contrarresta la acción de la IL-1 (Boraschi et al., 1995).

La IL-1 es una importante citoquina iniciadora de la respuesta inmune, que juega un papel clave en la aparición y desarrollo de una compleja cascada inflamatoria hormonal y celular. Se han detectado elevados niveles de IL-1 α en el LCR y el parénquima cerebral dentro de las primeras horas después de una lesión cerebral, tanto en seres humanos como en roedores (Winter et al., 2002; Woodroffe et al., 1991). Sin embargo, se ha documentado que la IL-1 desempeña un papel importante en la degeneración neuronal. En los astrocitos, la IL-1 induce la producción de IL-6, estimula la actividad de óxido nítrico sintasa inducible (Rossi & Bianchini, 1996), e induce la producción de MCSF. Además, la IL-1 aumenta la actividad de la acetilcolinesterasa neuronal, la activación microglial y una producción adicional de IL-1, la activación de más astrocitos, y la expresión de la subunidad beta de la proteína S100, estableciéndose de ese modo un ciclo de autopropagación (Griffin et al., 1998; Mrazek & Griffin, 2001).

La citoquina IL-6 es una citoquina multifuncional que desempeña un papel importante en la defensa del organismo (Hammacher et al., 1994), con importantes efectos reguladores de la respuesta inflamatoria (Raivich et al., 1999). La IL-6 pertenece a la familia de las citoquinas neuropoietinas (Hopkins & Rothwell, 1995), y tiene efectos neurotróficos directos e indirectos en las neuronas (Benveniste, 1998). Esta citoquina promueve, además, la astrogliosis (Selmaj,

Farooq, Norton, Raine, & Brosnan, 1990), activa la microglía (Heyser, Masliah, Samimi, Campbell, & Gold, 1997), y estimula la producción de proteínas de fase aguda (Castell, Andus, Kunz, & Heinrich, 1989).

TNF- α juega un papel central en la iniciación y regulación de la cascada de citoquinas durante una respuesta inflamatoria. Esta citoquina se produce como una molécula precursora unida a la membrana celular de 26 kDa que se escinde por una enzima de conversión para producir una citoquina activa de 17 kDa (Perry, Collins, Wiener, Acton, & Go, 2001). Los niveles de TNF- α en el cerebro sano son bajos, lo que hace difícil determinar su función en condiciones fisiológicas. En estados inflamatorios o de enfermedad, TNF- α , junto con otros mediadores proinflamatorios y sustancias neurotóxicas, es producido por la microglía activada. Se ha demostrado la producción neuronal de TNF- α (Breder, Tsujimoto, Terano, Scott, & Saper, 1993), aunque su producción en el cerebro se realiza principalmente en las células gliales en respuesta a estímulos patológicos. Estas células gliales secretan tanto TNF- α como IL-1, que a su vez, activan estas células de una manera autocrina para inducir la producción de más citoquinas y más astrogliosis, aunque, por otra parte, TNF- α también puede tener propiedades neuroprotectoras (Akiyama et al., 2000) en el cerebro con EA.

Además de la función general de las citoquinas, las interacciones específicas en la EA de ciertas citoquinas y quimioquinas con A β pueden ser fisiopatológicamente relevantes. Por ejemplo, la IL-1 puede regular el procesamiento de APP y la producción de A β *in vitro* (Blasko, Marx, Steiner, Hartmann, & Grubeck-Loebenstein, 1999). A su vez, A β puede aumentar los niveles de productos neurotóxicos, citoquinas proinflamatorias y ERO (Eikelenboom & van Gool, 2004). Se ha observado, en el cultivo de células gliales corticales de ratas, niveles elevados de mRNA de IL-6 tras su exposición a APP (Chong, 1997). En la misma situación, los niveles de IL-1, IL-6, TNF- α , MIP-1 α y MCP-1 estaban aumentados después de la incubación de microglía cultivada con A β . La producción de IL, otras citoquinas y quimioquinas también puede conducir a la activación microglial, a la astrogliosis, y a la secreción adicional de moléculas proinflamatorias y amiloide, lo que perpetúa la cascada inflamatoria (Ho et al., 2005).

2.4.6.2. Citoquinas antiinflamatorias

Una segunda categoría general de la acción de las citoquinas es manifestada por las citoquinas antiinflamatorias, tales como IL-1ra, IL-4, IL-10 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Estas citoquinas inhibitoras pueden suprimir la producción y la acción de las citoquinas proinflamatorias, un efecto que es fundamental para el concepto de equilibrio entre las citoquinas pro y antiinflamatorias. La consecuencia clínica de una desregulación de este equilibrio en el SNC (niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, y bajos niveles o baja actividad de citoquinas antiinflamatorias) puede conducir a la producción de citoquinas y a la actuación sinérgica de citoquinas, y puede inducir un ciclo de amplificación de la activación celular y la citotoxicidad (Plata-Salaman, Ilyin, & Gayle, 1998). Por lo tanto, las interacciones citoquina-citoquina y las interacciones de las citoquinas con la patología de la EA, pueden jugar un papel crítico en la neuroinflamación en la EA.

La citoquina IL-1ra es una proteína de 152 aminoácidos que funciona como un inhibidor específico de los otros dos miembros funcionales de la familia IL-1, la IL-1 α y la IL-1 β (Dinarello, 1998). La IL-1ra es producida por monocitos y macrófagos y es liberada en la circulación sistémica, bloqueando la acción de los ligandos funcionales de la IL-1 α y de la IL-1 β , por inhibición competitiva a nivel del receptor de la IL-1. IL-1ra se une con una afinidad igual o mayor que la unión de la IL-1 α e IL-1 β con el tipo I (80 kDa) del receptor de membrana de IL-1. En cambio, la IL-1ra no se une con tan alta afinidad al tipo II (68 kDa) del receptor de membrana de IL-1 (Dinarello, 1997).

Las acciones biológicas de la IL-1 β son reguladas *in vivo* por la citoquina IL-1ra (Carter et al., 1990). Esta acción se lleva a cabo mediante la prevención de la unión de IL-1 β al receptor tipo I de la IL-1 (Lundkvist et al., 1999). *In vitro*, IL-1ra suprime la producción de TNF- α inducida por la IL-1 β , y la expresión de óxido nítrico sintasa inducible en los astrocitos (Liu, Zhao, Brosnan, & Lee, 1996). IL-1ra también protege contra neurotoxicidad de la IL-1 β (Thornton, Pinteaux, Gibson, Allan, & Rothwell, 2006). Además, se ha observado *in vivo* que la IL-1ra atenúa el daño neuronal isquémico y excitotóxico (Relton & Rothwell, 1992).

IL-4 es una glicoproteína de 20 kDa producida por las células Th2 maduras y por las células procedentes de los mastocitos o del linaje basófilo, que es capaz

de influir en la diferenciación de las células Th. La IL-4 dirige las respuestas de las Th2, media el reclutamiento y la activación de los mastocitos, y estimula la producción de anticuerpos IgE a través de la diferenciación de las células B en células secretoras de IgE (Brown & Hural, 1997; Wang, Wu, Siegel, Egan, & Billah, 1995). Además, la IL-4 tiene importantes efectos inhibitorios sobre la expresión y la liberación de citoquinas proinflamatorias, es capaz de bloquear o suprimir las citoquinas derivadas de los monocitos, incluyendo la IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, y MIP-1 α (Brown & Hural, 1997; Wang et al., 1995), y estimula la síntesis de la citoquina IL-1ra (Hart et al., 1989). Otro mecanismo por el cual IL-4 podría ejercer su efecto neuroprotector está relacionado con la inhibición de la IFN- γ , y la consiguiente disminución de la concentración de TNF- α y ON (Chao, Molitor, & Hu, 1993).

La citoquina IL-10 es una de las principales citoquinas antiinflamatorias. El mRNA de IL-10 es detectable en el lóbulo frontal y parietal del cerebro sano (Szczepanik, Funes, Petko, & Ringheim, 2001), y se ha sugerido que desempeña un papel importante en la homeostasis neuronal y en la supervivencia celular (Strle et al., 2001). La IL-10 media en las células mediante la interacción con receptores específicos de la superficie celular, presentes en todas las poblaciones principales de células gliales en el cerebro (Strle et al., 2001), y limita la inflamación mediante la reducción de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 y TNF- α , por la supresión de la expresión de receptores de citoquinas y la inhibición de la activación de estos receptores en el cerebro. A β no parece estimular la producción de IL-10 por las células gliales *in vitro* (Franciosi, Choi, Kim, & McLarnon, 2005), pero la preexposición de las células gliales a la IL-10 inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias inducidas por A β o lipopolisacáridos (Szczepanik et al., 2001), lo que sugiere que los receptores de la citoquina IL-10 están presentes en los cultivos de células gliales (Ledebuer et al., 2002). IL-10 inhibe las citoquinas TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, GMSF, MIP-1 α , y MIP-2 α derivadas de los monocitos/macrófagos (Clarke, Hales, Hunt, & Foxwell, 1998; Marchant et al., 1994). Además de estas actividades, IL-10 atenúa la expresión de los receptores de superficie de TNF y promueve el desprendimiento de estos receptores en la circulación sistémica (Dickensheets, Freeman, Smith, & Donnelly, 1997; Joyce et al., 1994).

TGF- β es sintetizado como un precursor inactivo y requiere la activación antes de ejercer su efecto (Norgaard, Hougaard, Poulsen, & Spang-Thomsen, 1995). La molécula activa es un homodímero de 25 kDa formado por dos monómeros unidos por disulfuro de 12,5 kDa, y pertenece a una familia de más de 20 proteínas diméricas que comparten una estructura similar (Kingsley, 1994). TGF- β es un importante regulador de la proliferación celular, la diferenciación, y la formulación de la matriz extracelular (Letterio & Roberts, 1997). También es capaz de convertir un sitio activo de inflamación en uno dominado por reparaciones (Letterio & Roberts, 1997). Además, el TGF- β suprime la proliferación y diferenciación de células T y células B, y limita la producción de IL-2, IFN- γ , y TNF.

Las tres isoformas conocidas en mamíferos de TGF- β , es decir, TGF- β 1, 2, y 3, se expresan en el SNC y están implicadas en la patogénesis de la EA. Se ha demostrado que TGF- β modula una amplia gama de procesos que están implicados en la EA, incluyendo la respuesta a la lesión cerebral y astrocitosis, la respuesta inflamatoria cerebral y la activación microglial, la producción de matriz extracelular, la distribución y acumulación de amiloide, la regulación de conocidos o potenciales factores de riesgo en la EA (por ejemplo, APP, COX-2), y la inhibición de la muerte celular. Por ejemplo, en la EA, TGF- β 1 ha sido detectado en las placas de A β (van der Wal, Gomez-Pinilla, & Cotman, 1993), y se han encontrado niveles superiores de TGF- β 1 en el LCR (Chao, Hu, et al., 1994) y en el suero (Chao, Ala, et al., 1994) de pacientes con EA respecto a controles sin demencia. La inmunotinción para el TGF- β 2 fue observado en astrocitos reactivos, microglía ramificada, y en una parte de las neuronas en los casos de EA (Wyss-Coray et al., 2000). Por último, hay que señalar que las inmunoreactividades para los receptores de TGF- β 1 y 2 fueron más altas en las células gliales reactivas de los casos de EA que en los de los controles sin demencia (Lippa et al., 1998).

2.4.7. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas que mantienen la supervivencia de las células del SNC y periférico. Los factores de crecimiento juegan un papel en el desarrollo del cerebro, estimulando el crecimiento axonal y regulando el crecimiento de diferentes tipos de células en el cerebro y la periferia. En muchos

casos, el mismo factor de crecimiento y el correspondiente sistema de señalización del receptor pueden desarrollar diferentes funciones en el organismo.

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es el factor de crecimiento más potente, capaz de contrarrestar la muerte celular de neuronas colinérgicas *in vitro* e *in vivo* (Levi-Montalcini, 1987). Se ha encontrado un aumento de NGF en el LCR de pacientes con EA (Blasko et al., 2006; Marksteiner et al., 2008). A pesar de que se ha sugerido la disfunción de NGF como uno de los factores de desarrollo de la EA, se observó que los ratones con el NGF bloqueado no mostraban claros déficits cognitivos. NGF ha sido considerado, no obstante, como un candidato para el tratamiento de la EA, de hecho, el NGF purificado se infundió en algunos pacientes con EA (Olson et al., 1992). Este factor de crecimiento está sobre-regulado en el cerebro (Fahnestock, Michalski, Xu, & Coughlin, 2001) y en el LCR (Hock et al., 2000) de los pacientes con EA, mientras que el receptor de alfa afinidad de NGF está infra-regulado (Mufson et al., 2002). Curiosamente, el aumento de NGF fue específico para la EA en comparación con controles sanos y fue dependiente del alcance de la neurodegeneración, expresado como el ratio τ fosforilada 181/A β -42 (Blasko et al., 2006). Aunque los datos aislados de NGF no revelaron una diferencia significativa, la comparación de NGF en pacientes con EA que tenían un ratio τ fosforilada 181/A β -42 > 10 con controles sanos (ratio < 6) reveló una diferencia significativa (Blasko et al., 2006). Esto podría sugerir que el NGF se acumula en la neurodegeneración sólo en una cierta etapa de la enfermedad.

El factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF es un factor de crecimiento importante, que regula la angiogénesis en el sistema nervioso, y se encuentra incrementado en la EA (Fukumura et al., 2001; Tarkowski et al., 2002), lo que da como resultado una densidad microvascular mejorada en el desarrollo de la enfermedad. La desregulación de otros factores de crecimiento también puede contribuir en la EA. Por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF, el cual es mitogénico para las células de origen mesenquimal, sobre-regula APP en el hipocampo mediante la inducción de secretasas (Gianni et al., 2003; Lim et al., 2007; Zambrano et al., 2004). Finalmente, el factor de crecimiento insulínico tipo I regula los niveles de A β y muestra efectos protectores contra su toxicidad (Aguado-Llera, Arilla-Ferreiro, Campos-Barros,

Puebla-Jimenez, & Barrios, 2005; Carro, Trejo, Gomez-Isla, LeRoith, & Torres-Aleman, 2002).

2.5. SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES

2.5.1. Definiciones y clasificaciones

El concepto de antioxidante biológico se refiere a cualquier compuesto que, estando presente en una concentración inferior en comparación con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación del sustrato (Godic, Poljsak, Adamic, & Dahmane, 2014). Las funciones de los antioxidantes implican la reducción del EO, de las mutaciones de ADN, así como de otros parámetros de daño celular. Los estudios epidemiológicos han demostrado la capacidad de los antioxidantes para contener los efectos de las ERO, y disminuir la incidencia de cáncer y de enfermedades degenerativas. Sin embargo, la capacidad del sistema de defensa contra las ERO puede ser mermada, sobre todo por la acción prolongada de los RL, lo que lleva a la aparición de la enfermedad (Godic et al., 2014).

Los primeros tipos de sistemas de defensa antioxidante desarrollados contra el daño oxidativo, son los que impiden la acción de las ERO, y los que bloquean y capturan los radicales que se forman (Cheeseman & Slater, 1993). Estos sistemas, presentes en compartimentos celulares acuosos y de membrana, pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Otro sistema antioxidante importante de la célula está representado por los procesos de reparación, que eliminan las biomoléculas dañadas antes de que su agregación permita la alteración del metabolismo celular (Cheeseman & Slater, 1993). Este sistema consiste en la reparación de los ácidos nucleicos dañados por la oxidación, por enzimas específicas (Poljsak, Suput, & Milisav, 2013), la eliminación de proteínas oxidadas por los sistemas proteolíticos, y la reparación de los lípidos oxidados por fosfolipasas, peroxidasas o aciltransferasas (Hitchon & El-Gabalawy, 2004). Se ha asumido que el deterioro de los sistemas de reparación conduce al envejecimiento y a las enfermedades relacionadas con la edad, más que los cambios moderados en el potencial de la defensa antioxidante contra la acción de las ERO (Gems & Doonan, 2009; Perez et al., 2009).

Se ha observado que, en condiciones fisiológicas, el equilibrio entre compuestos prooxidantes y antioxidantes favorece moderadamente a los prooxidantes, engendrándose así un EO leve, lo que requiere la intervención de los sistemas antioxidantes endógenos del organismo (Droge, 2002). Bajo estas circunstancias, el EO se hace más agudo con la edad, cuando los antioxidantes endógenos y los sistemas de reparación no pueden contrarrestarlo de manera eficaz. Por lo tanto, las diversas intervenciones que limitan o inhiben estos factores agresivos, están dirigidas hacia la disminución de la incidencia de enfermedades.

La homeostasis óxido-reducción de la célula está asegurada por su sistema de defensa antioxidante endógeno, que incluye enzimas antioxidantes endógenas como la SOD, CAT, GPx, y compuestos no enzimáticos como el glutatión, proteínas (ferritina, transferrina, ceruloplasmina, e incluso la albúmina) y neutralizadores de bajo peso molecular como el ácido úrico, la coenzima Q y el ácido lipoico (Poljsak et al., 2013).

Se ha confirmado que los antioxidantes exógenos presentes en frutas y verduras tienen una actividad equivalente a la de la defensa antioxidante endógena mencionada. Los antioxidantes como la vitamina C y E, carotenoides, y compuestos fenólicos (estilbenos, ácidos fenólicos como los ácidos benzoico y hidroxibenzoico, derivados del ácido cinámico e hidroxicinámico y flavonoides, flavonoles, flavanonas, flavanos, flavonas y antocianidinas como las agliconas de las antocianinas), están considerados actualmente como los principales antioxidantes exógenos. Los estudios clínicos han demostrado que una dieta rica en frutas, verduras, granos enteros, legumbres y ácidos grasos omega-3, podría funcionar como agente preventivo contra la aparición de enfermedades (Willett, 2006).

Otra fuente de antioxidantes exógenos está constituida por los suplementos dietéticos, como proveedores de nutrientes tales como vitaminas, minerales, fibras, ácidos grasos o aminoácidos, que pueden faltar o no encontrarse en las cantidades suficientes en la dieta. Los complementos alimenticios pueden constar de una serie de antioxidantes como la vitamina A (retinoides y carotenos), vitaminas C y E (tocoferoles), licopeno, luteína, ubiquinona, glutatión, polifenoles

(flavonoides y no flavonoides), el resveratrol y la N-acetilcisteína (Poljsak et al., 2013).

Los suplementos antioxidantes pueden mejorar la capacidad del organismo para contener el EO, que no puede ser modificado por la intervención de las defensas antioxidantes endógenas. Sin embargo, la cuestión de los antioxidantes sintéticos ha sido objeto de controversias, por ejemplo, hay afirmaciones de que las cantidades diarias recomendadas de vitamina C y E no son suficientes para contrarrestar el EO. Por otra parte, se ha estipulado que la ingesta de grandes cantidades de suplementos antioxidantes puede tener efectos prooxidantes, o conducir al llamado “estrés antioxidante” (Poljsak & Milisav, 2012). Roy y Mark (2002) sugieren que la mayoría de los organismos son capaces de mantener sus puntos de ajuste del EO, independientemente de la suplementación con antioxidantes. También atribuyen a estos suplementos un efecto mínimo en la longevidad y postulan que la mayoría de los seres humanos mantienen su nivel de EO, incluso si consumen suplementos antioxidantes adicionales. El uso de la suplementación antioxidante demuestra su eficacia si el nivel inicial de EO está por encima de lo normal (Richard, 2002; Roy & Mark, 2002). Por lo tanto, los suplementos antioxidantes pueden reducir el aumento de los niveles de EO que no puede ser inactivado por las fuentes endógenas (Poljsak et al., 2013).

Los antioxidantes dietéticos pueden actuar como inhibidores de la reacción en cadena de los radicales, quelantes de metales, inhibidores de enzimas oxidativas y como cofactores de enzimas antioxidantes (Huang, Ou, & Prior, 2005).

Los antioxidantes biológicos (tanto endógenos como exógenos) se pueden clasificar en dos grupos principales: los antioxidantes enzimáticos (por ejemplo, la SOD, CAT y GPx) y los antioxidantes no enzimáticos tales como los inhibidores de enzimas oxidativas (por ejemplo, la COX o la LOX), cofactores de enzimas antioxidantes (selenio, coenzima Q₁₀), eliminadores de ERO y ERN (vitamina C, vitamina E), y quelantes de metales de transición (por ejemplo, el ácido etilendiaminotetraacético o EDTA) (Huang et al., 2005).

Se hicieron intentos para clasificar los sistemas antioxidantes desde el punto de vista de su reactividad: la llamada “primera línea de defensa” ha sido identificada como el sistema enzimático antioxidante, incluyendo la SOD, la cual

agota el radical O_2^{\bullet} , la CAT que descompone el H_2O_2 , y también el sistema GPx/GR. La “segunda línea de defensa” está representada principalmente por tiores reducidos y antioxidantes de bajo peso molecular. Estos últimos incluyen una amplia gama de moléculas que son, o bien componentes que se encuentran en los productos dietéticos, tanto hidro como liposolubles (tocoferoles, ascorbato, retinoides, polifenoles, etc.) o compuestos metabólicos (urato, ascorbato, y GSH). Estos compuestos imparten básicamente la capacidad antioxidante a los medios biológicos y pueden llegar a determinados lugares en las células afectadas por el ataque oxidativo (Bencini, Failli, Valtancoli, & Bani, 2010; B Halliwell & Gutteridge, 2007; Kohen & Nyska, 2002; Tessutti, Macedo, Kubota, & Alves, 2013).

Por otra parte, otra clasificación de los antioxidantes (refiriéndose tanto a endógenos y exógenos, como a naturales o sintéticos) es la que tiene en cuenta su solubilidad, clasificándose en antioxidantes solubles en agua (flavonoides, ácido ascórbico, ácido úrico, glutatión) y antioxidantes solubles en lípidos (carotenoides, tocoferoles).

2.5.2. Mecanismo de acción

Los antioxidantes pueden actuar en diferentes etapas del proceso oxidativo de los radicales, y esto puede ser descrito teniendo en cuenta la peroxidación de los lípidos en las membranas celulares o en los productos alimenticios (Yin, Xu, & Porter, 2011).

Las descripciones detalladas de las etapas que forman parte de la secuencia del radical, especialmente centradas en la iniciación y la propagación, revelaron que la oxidación de lípidos en las membranas celulares puede ser promovida por factores físicos y químicos exógenos, tales como la contaminación del aire, el tabaquismo, la luz ultravioleta, la radiación de ionización, los sistemas endógenos de enzimas (la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa desacoplada y el citocromo P450), así como la CTE en la mitocondria (Yin et al., 2011).

Se ha descrito que la etapa de propagación de la peroxidación comienza mediante la adición de oxígeno a los radicales de carbono, que se producen a una velocidad de difusión controlada. La propagación se produce a una velocidad

generalmente lenta, y está representada por la transferencia de un átomo de hidrógeno a la cadena que lleva el ROO•. Los RL ROO• pueden adicionar dobles enlaces entre dos carbonos. Se puede producir la sustitución radical intramolecular sobre las reacciones de ciclación del peróxido y el radical, dando peróxidos cíclicos, mientras que los lípidos poliinsaturados participan en las reacciones de peroxidación (Yin et al., 2011).

Los antioxidantes pueden reaccionar agotando el oxígeno molecular o disminuyendo su concentración local, eliminando los iones metálicos prooxidativos, atrapando las ERO agresivas como el H₂O₂ o el radical O₂•, recogiendo los radicales iniciadores de cadena como el OH• o el ROO•, rompiendo la cadena de una secuencia radical o aplacando el ¹O₂ (Martysiak-Zurowska & Wenta, 2012).

Los antioxidantes que inhiben la peroxidación lipídica mediante la eliminación de oxígeno, los que actúan aplacando el O₂ disminuyendo su concentración, o los que eliminan los iones de metales de transición prooxidantes, se llaman antioxidantes preventivos. Aquellos que son capaces de agotar catalíticamente las ERO son también preventivos, y ya que están representados por las enzimas (por ejemplo, CAT, SOD y GPx) no se consumen en la reacción. En muchos casos, el mismo antioxidante puede tener más de un mecanismo de acción, por ejemplo, el galato de propilo, un antioxidante fenólico parcialmente soluble en agua, es un antioxidante rompedor de cadena, un eliminador de radicales y tiene capacidad para unirse al hierro (Gutteridge, 1994; Martysiak-Zurowska & Wenta, 2012).

Los antioxidantes rompedores de cadena, capaces de recoger especies de radicales, se llaman antioxidantes primarios. Los antioxidantes secundarios son aplacadores del ¹O₂, descomponedores de peróxidos que producen especies no radicales, quelantes de metales, inhibidores de enzimas oxidativas (por ejemplo la LOX) o absorbentes de radiación UV.

Los antioxidantes secundarios pueden exhibir efectos sinérgicos en combinación con antioxidantes primarios, siguiendo varios mecanismos posibles:

- Estabilizando los antioxidantes primarios mediante la creación de un ambiente ácido.

- Regenerando los antioxidantes primarios por donación de hidrógeno.
- Quelando los cationes de metales de transición prooxidativos.
- Bloqueando el oxígeno molecular.

Por otra parte, se ha observado que las enzimas antioxidantes pueden catalizar la síntesis o la regeneración de los antioxidantes no enzimáticos (Martysiak-Zurowska & Wentz, 2012).

2.5.3. Antioxidantes endógenos

2.5.3.1. SOD

Las SOD son parte del sistema de defensa enzimático contra el deterioro oxidativo, transformando el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . En los tejidos de los mamíferos pueden encontrarse tres tipos de SOD: la SOD que contiene cobre-zinc (SOD1) presente en el citosol, la SOD que contiene manganeso (SOD2) presente en la matriz mitocondrial, y la SOD extracelular (SOD3). Las tres son altamente expresadas, principalmente en los túbulos renales de los riñones sanos (Ghezzi, Bonetto, & Fratelli, 2005; Sung, Hsu, Chen, Lin, & Wu, 2013).

Se ha observado una reducción de la actividad SOD1 en el tejido del lóbulo frontal de pacientes con EA post-mortem, así como en ratones transgénicos con EA (Marcus et al., 1998; Murakami et al., 2011). También han sido detectados patrones de localización y expresión alterados tanto de la SOD1 como de la SOD2 en el neocórtex y el hipocampo del tejido cerebral post-mortem en la EA (Furuta et al., 1995). Otros estudios muestran, tanto niveles reducidos de las enzimas SOD, como un aumento de los niveles de marcadores de EO en el torrente sanguíneo de los pacientes con EA, en comparación con grupos de controles sanos de la misma edad (Padurariu et al., 2010; Rinaldi et al., 2003; Torres et al., 2011).

2.5.3.2. CAT

La CAT es la enzima implicada en catalizar la descomposición del H₂O₂ hasta agua y oxígeno.

Se expresa en la mayoría de las células, órganos y tejidos, y en concentraciones elevadas en el hígado y en los eritrocitos (Sung et al., 2013).

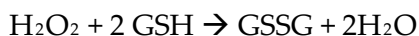
Para mantener la actividad catalítica, la CAT requiere que el Fe³⁺ se una al sitio activo de la enzima. Aunque la función de la CAT y de la GPx podrían solaparse, las dos enzimas tienen diferente afinidad por el H₂O₂ como sustrato: la GPx de mamíferos tiene mayor afinidad por el H₂O₂ a bajas concentraciones, comparada con la CAT. Esto hace que a bajas concentraciones la GPx juegue un papel más activo en la eliminación del H₂O₂.

Otros antioxidantes enzimáticos como la peroxirredoxina y la tiorredoxinoreductasa son responsables de la inactivación del H₂O₂ y también de peróxidos orgánicos, produciendo agua/alcoholes y oxígeno (Sung et al., 2013).

Se ha encontrado que la actividad de la CAT está significativamente elevada en el hipocampo y en las circunvoluciones temporales superior y medio de los cerebros de enfermos de EA (Lovell et al., 1995). También se ha observado que los niveles de CAT en sangre en pacientes con EA, se relacionan positivamente con la ingesta de vitamina A, C y E, lo que apoya la relevancia de la suplementación con antioxidantes en la EA (Tabet, Mantle, Walker, & Orrell, 2002).

2.5.3.3. GPx y glutatión reductasa

La GPx, una enzima selenio-dependiente, cataliza tanto la reducción del H₂O₂ como los hidroperóxidos orgánicos, a agua o a los alcoholes correspondientes, utilizando el GSH como donante de electrones. Las funciones del GSH como donante efectivo de electrones en el proceso ocurren de la siguiente manera (Droge, 2002):



Aunque la GPx es muy específica con el donante de electrones GSH, tiene una baja especificidad con los hidroperóxidos. La GPx reduce un amplio rango de hidroperóxidos (desde el H₂O₂ hasta complejos hidroperóxidos orgánicos) y esta característica hace de la GPx un importante protector celular frente a las ERO.

La GPx necesita un suministro de GSH, (que es oxidado por esta enzima hasta GSSG), por lo que las células deben poseer una vía capaz de regenerar el GSH. Esta función se consigue mediante la enzima glutatión reductasa (GR) que utiliza NADPH como agente reductor. En muchos tejidos el NADPH se produce mayoritariamente a través de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, por la vía de las pentosas.

La GR tiene una distribución celular similar a la GPx y, aunque no se considera una enzima antioxidante primaria, es esencial para la correcta función antioxidante de la GPx.

Diferentes estudios han demostrado que los enfermos de EA presentan menores niveles de GPx en plasma (Rinaldi et al., 2003) y suero (Guidi et al., 2006), respecto a personas que no padecen la enfermedad.

2.5.3.4. GSH

El GSH es la mayor fuente no proteica de grupos tiol en las células. Se sintetiza continuamente dentro de la célula y se degrada fuera de ella. Se sintetiza principalmente en el hígado y es transportado por la circulación sanguínea hasta los tejidos.

Cumple varias funciones en la defensa antioxidante celular. En primer lugar, el GSH interacciona fácilmente con los RL, incluidos los OH• y los peróxidos orgánicos, como donante de átomos de H. En segundo lugar, una de las funciones antioxidantes más importantes del GSH es eliminar el hidrógeno y los peróxidos orgánicos (como los lipoperóxidos) durante la reacción catalizada por la GPx (Butterfield et al., 2002), formando agua y alcohol, respectivamente. Por donación de dos átomos de H, dos moléculas de GSH se oxidan hasta GSSG. La reducción del GSSG es catalizada por la GR, una enzima que contiene flavina, usando el NADPH como reductor. Esta reacción tiene lugar junto a la catalizada por la GPx, lo que permite la regeneración del GSH mediante un ciclo redox.

Se ha descrito que el GSH actúa como reductor de varios antioxidantes celulares. Por ejemplo, se ha postulado que el GSH reduce los radicales de la vitamina E (radical α -tocoferoxil) que se forman en la cadena de reacciones con los radicales alcoxilo o con los radicales lipoperoxilo. El GSH también puede ser usado para reducir el radical de la vitamina C (semidehidroascorbato) producido en el reciclado de la vitamina E y en la reducción del ácido lipoico a dihidrolipoato. Esta última reacción juega un papel importante en la recuperación del ácido ascórbico (Packer, 1991).

En los eritrocitos de pacientes con EA, el contenido de GSH resultó ser más bajo y se asoció con la infra-regulación de la glutamato cisteína ligasa y la glutatión sintetasa, las dos enzimas involucradas en la síntesis de GSH (Liu, Harrell, Shenvi, Hagen, & Liu, 2005). Por lo tanto, unos niveles cerebrales elevados de GSH pueden resultar beneficiosos contra el EO, y contra las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el EO.

2.5.3.5. Melatonina

La melatonina es una hormona de los mamíferos que se sintetiza principalmente en la glándula pineal, y es capaz de captar tanto las especies oxigenadas como las especies nitrogenadas, tales como el OH^\bullet , el radical O_2^\bullet o el ON (Arnao & Hernandez-Ruiz, 2006; Poeggeler et al., 1994), y exhibir excelente actividad protectora contra el EO mitocondrial (Lowes, Webster, Murphy, & Galley, 2013). La capacidad de captación de RL de la melatonina se puede ampliar a sus metabolitos secundarios, terciarios y cuaternarios. Los metabolitos de la melatonina, AFMK (N(1)-acetil-N(2)-formil-5-metoxiquinuramina) y AMK (N1-acetil-5-metoxiquinuramina), con conocida actividad reductora y antirradical, también regulan enzimas prooxidantes y proinflamatorias como la óxido nítrico sintasa inducible y la COX-2 (Tan, Manchester, Terron, Flores, & Reiter, 2007). AMK conserva la capacidad de su precursor para activar el complejo I mitocondrial, la mejora de la producción de ATP mediante la limitación del flujo de salida de electrones, e impide la apertura del poro de transición mitocondrial (Acuna-Castroviejo, Escames, Leon, Carazo, & Khaldy, 2003; Hardeland, 2005). Estudios previos han caracterizado a la melatonina como dos veces más eficaz

que la vitamina E, que había sido clasificada como el antioxidante lipofílico más potente (Pieri, Marra, Moroni, Recchioni, & Marcheselli, 1994).

La melatonina mejora el potencial antioxidante celular, mediante la estimulación de la síntesis de SOD y GPx, y mediante el aumento de los niveles de GSH (Srinivasan et al., 2005). Por lo tanto, se ha sugerido que la disminución de la producción de melatonina en individuos de edad avanzada, puede ser uno de los factores principales que contribuyen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, como por ejemplo la EA. Actualmente, los estudios han demostrado que la melatonina podría inhibir la toxicidad inducida por A β (Zhou, Zhang, Zhao, & Wei, 2008) y mitigar la hiperfosforilación de τ (Wang & Wang, 2006). La melatonina alivia los déficits conductuales (aprendizaje y memoria), y reduce el número de neuronas apoptóticas y los depósitos de A β en el modelo de ratón transgénico APP 695 de la EA (Feng et al., 2004), proporcionando una estrategia prometedora para retardar o prevenir la progresión de la enfermedad.

2.5.3.6. *Ácido α -lipoico*

El ácido α -lipoico está disponible fácilmente en la dieta y, además, se sintetiza en la mitocondria (Butterfield et al., 2002). Este antioxidante es capaz de capturar especies reactivas oxigenadas y nitrogenadas, según lo confirmado por ensayos bioquímicos que implican largos tiempos de incubación, pero no hay evidencias significativas que apoyen su capacidad de captación de radicales dentro de la célula (Shay, Moreau, Smith, Smith, & Hagen, 2009). El ácido α -lipoico y otros antioxidantes, como la vitamina E o los flavonoides, podrían fortalecer indirectamente el sistema de defensa antiglicación, cuando el GSH está limitado en condiciones de EO e inflamación en la EA (Munch, Kuhla, Luth, Arendt, & Robinson, 2003).

Como un poderoso antioxidante terapéutico, puede reciclar otros antioxidantes tales como las vitaminas C y E, GSH, y aumentar la producción de acetilcolina. Como un quelante de metales activos puede combatir la acumulación de productos de la peroxidación de lípidos (Siedlak et al., 2009).

Se ha observado que la administración crónica de ácido α -lipoico disminuyó la expresión de marcadores de peroxidación de lípidos, pero no la carga de A β

dentro de los cerebros, tanto de los controles como de modelos de ratones con EA (Quinn et al., 2007).

2.5.3.7. Ubiquinona

La ubiquinona es un potente antioxidante y también un importante cofactor de la CTE, en la que acepta electrones del complejo I y II. Conserva el potencial de membrana mitocondrial durante el EO y protege a las células neuronales a través de la atenuación de la sobreproducción de A β , y de los depósitos intracelulares de placas de A β . Un estudio ha demostrado que el ubiquinol (la forma reducida de la ubiquinona) elimina los radicales de peróxido más rápido que el α -tocoferol (Niki, 1997) y, como la vitamina C, puede regenerar a la vitamina E en un ciclo redox (Chen, Huang, & Chu, 1997).

La ubiquinona es el único antioxidante lipofílico endógeno, y es capaz de prevenir eficientemente la oxidación proteica, la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN, en especial el ADN mitocondrial.

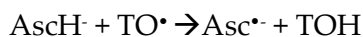
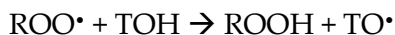
2.5.4. Antioxidantes exógenos

2.5.4.1. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico, uno de los antioxidantes hidrosolubles más extendidos, puede oxidarse fácilmente a ácido dehidroascórbico. Este último sufre una hidrólisis irreversible a ácido 2,3-diceto-L-gulónico con la subsiguiente descarboxilación, dando como resultado dióxido de carbono y componentes del ciclo de la pentosa fosfato, o ácido oxálico y ácido treónico. El enantiómero L del ácido ascórbico (vitamina C) está implicado en el mantenimiento de la integridad del tejido vascular y conectivo, en la absorción del hierro y la biosíntesis de colágeno, en la neuroprotección, pero también en la hematopoyesis y en el funcionamiento de los leucocitos (Agus et al., 1997; Englard & Seifter, 1986; May, 2012; Padh, 1990; Spector & Johanson, 2014). La vitamina C cumple un papel esencial en el cerebro, siendo cofactor de la dopamina beta-hidroxilasa y, por lo tanto, participa en la biosíntesis de las catecolaminas. También protege los fosfolípidos de membrana de daños peroxidativos, y se ha demostrado que la vitamina C es un eliminador eficiente de RL en el cerebro (Englard & Seifter, 1986;

May, 2012; Padh, 1990). Se ha observado un gradiente 10 veces superior entre la concentración de ácido ascórbico en el cerebro y en el suero, lo que indica un mecanismo de transporte activo del ácido ascórbico en el cerebro (Kaufman, 1966; Schreiber & Trojan, 1991; Spector & Johanson, 2014).

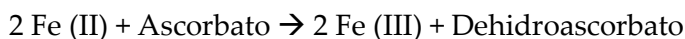
La vitamina C no sólo neutraliza los radicales OH^\bullet , alcoxilo y el O_2^\bullet en medios biológicos, sino también las ERN, mediante la formación del ácido semidehidroascórbico y, por lo tanto, evita la descomposición oxidativa de biomoléculas esenciales (Du, Cullen, & Buettner, 2012; Sung et al., 2013). Aunque el ácido ascórbico no es un eliminador directo de radicales lipofílicos, tiene un efecto sinérgico en combinación con el tocoferol. En la interfase lípido-acuosa, el ácido ascórbico reacciona con el radical tocoferoxilo oxidado reduciéndolo, y regenera el tocoferol activo, capaz de cumplir sus funciones antioxidantes (Du et al., 2012; Kojo, 2004).



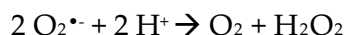
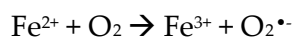
donde TO^\bullet representa el radical tocoferoxilo, formado por la reacción del tocoferol (TOH) con el ROO^\bullet , AscH^- es el monoaniónascorbato y $\text{Asc}^{\bullet-}$ es el radical anión ascorbato.

El antioxidante primario más eficiente en el plasma es el ácido ascórbico, seguido de la bilirrubina, ácido úrico, la coenzima Q, y la vitamina E (Beyer, 1994).

Un problema con el ácido ascórbico es su actividad prooxidante, exhibida en la presencia de cationes de metales de transición: el ión ascorbato puede reducir el hierro trivalente a su forma divalente, autooxidándose a dehidroascorbato (Carr & Frei, 1999; Du et al., 2012; Valko, Morris, & Cronin, 2005).



El ión metálico puede ser en consecuencia reducido, reoxidado y otra vez reducido, en un ciclo de óxido-reducción, generando ERO (Carr & Frei, 1999; Du et al., 2012; Valko et al., 2005). En presencia de oxígeno molecular, se forma el radical O_2^{\bullet} , que se dismuta a H_2O_2 y oxígeno molecular (Du et al., 2012).



Las reacciones de tipo Fenton dan como resultado la generación de ERO, es decir, del radical OH^{\bullet} y del anión OH^- .



2.5.4.2. Vitamina E

La vitamina E (α -tocoferol) lucha contra la peroxidación lipídica de las membranas celulares y puede detener la cadena de radicales, formando un derivado de baja reactividad incapaz de atacar sustratos lipídicos (Descamps-Latscha, Drueke, & Witko-Sarsat, 2001). Por lo tanto, la vitamina E cumple su papel en la preservación de la membrana contra el daño de los RL, promovido por lipoproteínas de baja densidad. Esta vitamina puede alterar positivamente los biomarcadores de EO, y puede mejorar la eritropoyesis o puede bajar la dosis de eritropoyetina necesaria (Himmelfarb & Hakim, 2003). Se ha evaluado que con la ingesta de altas dosis de suplementos de vitamina E se puede lograr una inhibición de los procesos proaterogénicos, como la oxidación de lípidos, la agregación de plaquetas, la proliferación de células del músculo liso *in vivo*, y la adhesión de monocitos al endotelio. La vitamina E contribuye a la estabilización de la placa aterosclerótica (Devaraj & Jialal, 1998; Diaz, Frei, Vita, & Keaney, 1997).

2.5.4.3. Beta-caroteno

El beta-caroteno es un inhibidor altamente eficaz del $^1\text{O}_2$, siendo este último responsable de los daños en la piel provocados por la luz UV, de las cataratas, degeneración macular, y cuya adición a las estructuras de dienos da como resultado endoperóxidos (Huang et al., 2005; Sies & Stahl, 2004). El papel del beta-caroteno en la fotoprotección sistémica, procedente de sus propiedades antioxidantes, es contrarrestado por algunos efectos prooxidantes observados (Godic et al., 2014).

Los estudios de investigación se han centrado en otro potente carotenoide, el licopeno, y su presencia en el plasma y el suero se ha asociado inversamente con el riesgo de padecer cáncer (Gann et al., 1999; Wakai et al., 2005; Yuan et al., 2004). Se han establecido correlaciones similares para marcadores de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, función cognitiva y peso corporal (Andersen et al., 2006; Mecocci et al., 2002; Polidori et al., 2004; Sesso, Buring, Norkus, & Gaziano, 2004; Yang, Zhang, Penniston, Binkley, & Tanumihardjo, 2008).

Se ha observado que la actividad antioxidante del licopeno es superior a la del beta-caroteno y a la del α -tocoferol (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989; Miller, Sampson, Candeias, Bramley, & Rice-Evans, 1996). Las tareas preventivas del licopeno (Kelkel, Schumacher, Dicato, & Diederich, 2011) se basan en su capacidad de bloquear el $^1\text{O}_2$ (Krinsky, 1998), siendo el mejor de los 600 carotenoides naturales (Di Mascio et al., 1989), y es debido también a su estructura que implica una reactividad mejorada frente al oxígeno y a las ERO (Krinsky, 1998). Los carotenoides pueden reaccionar con los RL mediante tres mecanismos posibles: la transferencia de electrones, la abstracción de hidrógeno y la adición de radicales (Young & Lowe, 2001). El potencial de barrido del licopeno hacia el dióxido de nitrógeno, así como hacia los radicales tiilo y sulfonilo también ha sido confirmado (Mortensen & Skibsted, 1997). Se ha evaluado que el licopeno y el toruleno poseen una mejor reactividad que el beta-caroteno frente a los ROO^\bullet (Galano & Francisco-Marquez, 2009), y el licopeno también es capaz de secuestrar al ONOO $^-$, que destaca por su potencial de oxidación, *in vitro* e *in vivo* (Muzandu et al., 2006; Panasenko, Sharov, Briviba, & Sies, 2000). Se ha descrito que esta reacción puede conducir a productos oxidados de licopeno dotados de

actividad biológica (Kikugawa, Hiramoto, Tomiyama, & Asano, 1997). También se ha descrito que el licopeno podría mejorar la protección antioxidante de la célula, mediante la regeneración tanto de la vitamina E como de la vitamina C de sus formas radicales correspondientes (Bast, Haenen, van den Berg, & van den Berg, 1998). Cuando los tocoferoles no están presentes en el medio de reacción, los cationes radicales derivados del licopeno reaccionan, para producir finalmente productos estables (Mortensen & Skibsted, 1997).

2.5.4.4. *Compuestos polifenólicos*

Los flavonoides son el grupo más común de compuestos polifenólicos en la dieta humana, y se encuentran presentes en frutas, verduras, bebidas como el vino y el té, y en semillas como el cacao en grano y las semillas de las uvas (Spencer, 2010).

El té verde contiene un número importante de sustancias químicas bioactivas, y es particularmente rico en flavonoides (30% del peso seco de una hoja) incluyendo catequinas y sus derivados (Graham, 1992). El análisis por HPLC del té verde ha revelado que (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) es el principal constituyente polifenólico (más del 60% de las catequinas totales), representando más del 10% del peso seco del extracto, seguido de (-)-epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina (EC) y (-)-epicatequina-3-galato (ECG) (Moyers & Kumar, 2004). Otros compuestos del té verde son los flavonoles (quercetina, kaempferol y rutina), cafeína, ácidos fenólicos y teanina (Graham, 1992).

Las catequinas y polifenoles del té verde ejercen su acción antioxidante quelando iones metálicos, tales como el hierro (Fe^{2+}) y el cobre (Cu^{2+}), y previniendo la generación del OH^{\bullet} a través de la reacción de Fenton (Singh, Arseneault, Sanderson, Murthy, & Ramassamy, 2008). También puede evitar modificaciones oxidativas del ADN (Singh et al., 2008). Se ha demostrado que los extractos de té verde suprimen la propagación de la reacción en cadena de la peroxidación lipídica, promovida por el hierro-ascorbato, en homogeneizados de las membranas mitocondriales cerebrales (Levites, Youdim, Maor, & Mandel, 2002). La EGCG ha demostrado ser más eficaz como neutralizador de radicales que la ECG, EC y EGC, lo cual podría atribuirse a la presencia del grupo

trihidroxi en el anillo B y el resto del galato en la posición 3' en el anillo C (Mandel, Amit, Weinreb, Reznichenko, & Youdim, 2008). Se ha observado que la EGCG es capaz de impedir la formación de fibrillas de A β (Lee et al., 2009). A β aumenta los niveles de marcadores de peroxidación lipídica, como el MDA en las células, y EGCG atenúa esa peroxidación de los lípidos (Choi et al., 2001).

Un estudio *in vivo* con ratas mostró que el tratamiento con té verde protegía a las proteínas y los lípidos contra la oxidación, en comparación con los controles de la misma edad (Assuncao, Santos-Marques, Carvalho, Lukoyanov, & Andrade, 2011). Además, la capacidad de aprendizaje espacial de las ratas tratadas con té verde mejoró significativamente, en comparación con los animales no tratados (Assuncao et al., 2011). Recientemente se ha demostrado que la EGCG, un componente importante del té verde mejora las alteraciones de la memoria inducidas por A β (Lee et al., 2009). Estos efectos beneficiosos pueden ser atribuibles a la inhibición de la ruta de NF- κ B. La EGCG también mitiga el EO inducido por A β *in vivo*, reduciendo el peróxido lipídico del hipocampo en el cerebro de ratas (Haque, Hashimoto, Katakura, Hara, & Shido, 2008). Recientemente, Dragicevic et al. (2011) demostraron que la EGCG es uno de los compuestos protectores de la mitocondria más potentes. L-teanina, otro compuesto aislado del té verde, protege contra el deterioro cognitivo mediado por A β , gracias a sus propiedades antioxidantes (Kim et al., 2009). Este compuesto puede ser capaz también de inhibir la neuroinflamación mediante la supresión de la activación de la ruta de NF- κ B (Kim et al., 2009).

En numerosos estudios, la neuroprotección de los polifenoles del té verde se atribuye parcialmente a la regulación de enzimas protectoras antioxidantes, como la SOD y la CAT (Mandel et al., 2008). La EGCG es capaz de elevar la actividad de las enzimas antioxidantes en ratones (Levites, Weinreb, Maor, Youdim, & Mandel, 2001). Romeo et al. (2009) observaron que la EGCG rescata neuronas primarias de ratas del EO, a través de la inducción de la hemoxygenasa.

Un análisis transversal en Japón mostró que un mayor consumo de té verde, se asociaba con una menor prevalencia de deterioro cognitivo en ancianos japoneses (Kalfon, Youdim, & Mandel, 2007; Kuriyama et al., 2006). Existen deficiencias en los ensayos clínicos sistemáticos con polifenoles del té en las enfermedades neurodegenerativas, pero los estudios epidemiológicos con

humanos y los estudios con animales apoyan la idea de que el consumo de té se correlaciona inversamente con la incidencia de demencia y EA (Mandel et al., 2008).

También se ha observado que varios componentes polifenólicos del té poseen propiedades antiinflamatorias en animales y en modelos *in vitro* (Crouvezier, Powell, Keir, & Yaqoob, 2001; Kim, Cheon, Kim, Kim, & Kim, 1999; Varilek et al., 2001; Yang, de Villiers, McClain, & Varilek, 1998), en particular durante el EO (Rahman, Biswas, & Kirkham, 2006). La EGCG del té verde puede inhibir la expresión de la COX-2 y la óxido nítrico sintasa, mediante el bloqueo de la activación excesiva del NF- κ B (Surh et al., 2001). Por todo ello, es probable que la capacidad antioxidante de los polifenoles del té juegue un papel importante en las acciones antiinflamatorias.

La manzana (*Malus domestica* B.) es una fruta que se consume con frecuencia y es uno de los frutos más cultivados en el mundo (FAOSTAT, 2013). Se ha atribuido a su consumo, la prevención y protección contra varias enfermedades crónicas y degenerativas en los seres humanos, sobre todo debido a sus antioxidantes, que previenen los daños producidos por los RL (Bouayed & Bohn, 2010; Boyer & Liu, 2004; Di Pietro, Medeiros, Vieira, Fausto, & Bello-Klein, 2007). Los compuestos fenólicos en las manzanas son responsables de la mayor parte de la actividad antioxidante de la fruta (Lee, Kim, Kim, Lee, & Lee, 2003; Tsao, Yang, Xie, Sockovie, & Khanizadeh, 2005). El principal componente fenólico de esta fruta es el ácido clorogénico, junto con los flavonoles (quercetina y sus glicósidos), y la catequina y EC (Gliszczynska-Swiglo & Tyrakowska, 2003). El ácido ascórbico es otro importante compuesto antioxidante presente en la manzana (Gliszczynska-Swiglo & Tyrakowska, 2003; Miller & Rice-Evans, 1997).

El ácido clorogénico, aunque no es un flavonoide, es uno de los neutralizadores de RL más eficaces (Dias, 2012; Matsuzoe et al., 1999). Los efectos beneficiosos asignados al ácido clorogénico son una actividad antimutagénica, antimicrobiana, antiviral y una actividad anti-LDL (Matsuzoe et al., 1999). Investigaciones comparativas sobre la fuerza antioxidante de compuestos fenólicos no-flavonoides presentes en la dieta, se centraron en el ácido clorogénico y el ácido cafeico. Los estudios cinéticos mostraron la capacidad de eliminar los radicales $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} . El ácido clorogénico pudo inhibir la cadena de peroxidación

lipídica, atrapando ROO•. También se estableció que el ácido clorogénico puede reaccionar rápidamente con el ONOO• (Kono et al., 1997).

La quercetina y la rutina representan dos de los flavonoides más estudiados. Se ha investigado y comparado su comportamiento antioxidante en sistemas de peroxidación de lípidos con otros flavonoides (Peterson & Dwyer, 1998; Ramanathan, Das, & Tan, 1994). La quercetina y rutina, y también la apigenina y naringina, mostraron una mayor actividad antioxidante contra el O₂•• (Chen, Zheng, Jia, & Ju, 1990; Sichel, Corsaro, Scalia, Di Bilio, & Bonomo, 1991). En cambio, la hesperidina y naringenina, presentes principalmente en cítricos como el limón, exhibieron una baja actividad antioxidante en los sistemas de la peroxidación lipídica (Chen et al., 1990; Mora, Payá, Ríos, & Alcaraz, 1990). El limón también es una fuente de vitamina C y otros flavonoides (Gonzalez-Molina, Dominguez-Perles, Moreno, & Garcia-Viguera, 2010).

La quercetina inhibe la citotoxicidad y las alteraciones oxidativas de los macrófagos de lipoproteínas de baja densidad, preservando los niveles de α -tocoferol y retrasando la aparición de la peroxidación lipídica (de Whalley, Rankin, Hoult, Jessup, & Leake, 1990). A niveles elevados, la quercetina y rutina protegen contra el daño celular causado por las LDL oxidadas, mediante la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas. A bajas concentraciones, proporcionan una protección directa a las células de la citotoxicidad de las LDL oxidadas (Nègre-Salvayre & Salvayre, 1992). La quercetina también puede inhibir la COX y la LOX (de Whalley et al., 1990; Laughton, Evans, Moroney, Hoult, & Halliwell, 1991). La apigenina, kaempferol, naringenina y la rutina también resultaron inhibidores de la LOX (Hsieh, German, & Kinsella, 1988; Laughton et al., 1991).

El resveratrol ha sido clasificado como antioxidante, inhibidor de la COX, como fitoalexina, estimulador del receptor de proliferación activado del peroxisoma, así como inductor de la óxido nítrico sintasa endotelial (Nakata, Takahashi, & Inoue, 2012).

Las fuentes más importantes de este antioxidante son las pieles de la uva y el vino tinto. Este derivado del estilbeno atrapa las ERO, actúa como un quelante de metales y modula la actividad enzimática (Harikumar & Aggarwal, 2008; Venturini et al., 2010). Tanto el vino tinto como el resveratrol demostraron ser

capaces de disminuir la peroxidación lipídica en el hipocampo de ratas diabéticas. Estas propiedades antioxidantes que se exhiben en esta región del cerebro fueron certificadas por un aumento de la actividad CAT (Harikumar & Aggarwal, 2008).

2.5.4.5. Selenio

Se ha demostrado que el brócoli enriquecido en selenio puede disminuir el cáncer de colon y los tumores de mama en estudios con animales (Finley, Davis, & Feng, 2000; Finley et al., 2001). La cebolla y el ajo, cuando son cultivados en suelos ricos de selenio, pueden también almacenar selenio como selenocisteína y selenoproteínas (Dias, 2012).

Los estudios se han centrado en la comparación de la administración de suplementos de selenio orgánico, con suplementos de selenio mineral: se ha establecido que la suplementación con selenito de sodio (50 µg de selenio al día durante 28 días) es capaz de modular las actividades de la GPx a través de modificaciones agudas y transitorias en linfocitos, granulocitos y en la actividad de la fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa en plaquetas, observándose en el día 7 o 14 de la ingesta del selenito de sodio. En los linfocitos de personas tratadas con seleniometonina, tales modificaciones surgieron en el día 7 del tratamiento. La actividad de la GPx citosólica, en las células sanguíneas mencionadas, aumentó de forma continuada durante la suplementación (Brown et al., 2000).

2.5.4.6. Zinc

El zinc es muy conocido por su papel como cofactor de la enzima SOD. Con respecto a su potencial papel de antioxidante exógeno y antiinflamatorio como suplemento, se demostró que en los sujetos que recibieron suplementos de zinc (45 mg de zinc como gluconato), los niveles plasmáticos de productos de la peroxidación de lípidos (tales como hidroxialquenos o MDA) y de aductos de ADN disminuyeron respecto al grupo placebo. Las células mononucleares estimuladas con lipopolisacáridos de sujetos suplementados con zinc, presentaron niveles menores de ARN mensajero de TNF- α e IL-1 β , en comparación con el placebo (Prasad, Bao, Beck, Kucuk, & Sarkar, 2004).

En un estudio donde se evaluó la capacidad del zinc para inhibir la peroxidación lipídica en los liposomas, usando diversos iniciadores de oxidación, se demostró que el zinc sólo impide la oxidación de lípidos iniciada por el Cu^{2+} y el Fe^{2+} . Se observó que la inhibición de la oxidación de lípidos inducida por el hierro por la acción del α -tocoferol o de la EC se optimizó en presencia de zinc. La acción protectora del zinc contra la oxidación de lípidos iniciada con hierro fue debida a la capacidad para bloquear los sitios cargados negativamente con la capacidad de fijación de hierro (Zago & Oteiza, 2001).

2.5.4.7. Cobre

El cobre es un oligoelemento que se encuentra unido a proteínas, principalmente a la ceruloplasmina. El cobre es importante para el desarrollo y el mantenimiento del sistema inmune, en particular, para las funciones de los neutrófilos y monocitos, aunque su papel en la inmunidad es aún controvertido (Maggini, Wintergerst, Beveridge, & Hornig, 2007). Este oligoelemento es también esencial para una defensa antioxidante óptima, ya que funciona como cofactor de la cobre/zinc-SOD, una enzima importante para la erradicación de los RL (Prohaska & Gybina, 2004). Por lo tanto, la deficiencia de cobre puede comprometer las defensas antioxidantes de las células, a través de la disminución de la capacidad para producir SOD, lo que aumenta la susceptibilidad de las células al daño oxidativo del ADN y, en consecuencia, la deficiencia de las células inmunes (Pan & Loo, 2000).

2.6. BEBIDAS FUNCIONALES CON ANTIOXIDANTES

2.6.1. Definición de alimento funcional

La primera exploración sistemática de los aspectos positivos de la funcionalidad de los alimentos se llevó a cabo en Japón. Los programas de investigación financiados por el gobierno japonés durante los años 80, se centraron en la capacidad de algunos alimentos para influir en las funciones fisiológicas del organismo. Esto llevó, en 1991, a la definición en la ley japonesa de una categoría de “alimentos para un uso dietético especial”, lo que les permitió realizar alegaciones en el etiquetado sobre efectos específicos para la salud. Estas

alegaciones tuvieron que ser justificadas con el fin de recibir la aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar de Japón, consiguiendo ser designados posteriormente como “alimentos de uso específico para la salud” (FOSHU). Para que un alimento fuese considerado FOSHU, se requerían pruebas de que el alimento final, y no sus componentes individuales aislados, ejerciera un efecto saludable sobre el organismo cuando se consumiera como parte de una dieta normal (Howlett, 2008).

En la segunda mitad de los años 90, la Comisión Europea financió una actividad para explorar el concepto de alimento funcional, desde un enfoque basado en la ciencia. En esta acción concertada llamada “FUFOSE” (Functional Food Science in Europe), participó un gran número de expertos europeos en nutrición y ciencias afines, y produjo un informe de consenso que ha sido ampliamente utilizado como base para la discusión, y posterior evolución, del pensamiento sobre este tema (Howlett, 2008).

FUFOSE desarrolló una definición de alimento funcional como un alimento que está “satisfactoriamente demostrado que afecta beneficiosamente a una o más funciones diana en el organismo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de una manera que es relevante, ya sea para una mejora del estado de salud y bienestar y/o una reducción del riesgo de enfermedad”. En el contexto de esta definición, una “función diana” es una actividad biológica del organismo que es una diana para la intervención, con miras al mantenimiento o mejora de la salud y el bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermedad (Howlett, 2008).

Desde un punto de vista práctico, un alimento funcional puede ser (Howlett, 2008):

- Un alimento natural, sin modificaciones.
- Un alimento en el que uno de los componentes se ha mejorado a través de condiciones de cultivo o cría especiales, o medios biotecnológicos.
- Un alimento al que ha sido añadido un componente para proporcionar beneficios.
- Un alimento al que ha sido eliminado un componente, por medios tecnológicos o biotecnológicos, para que el alimento proporcione beneficios.

- Un alimento en el que un componente ha sido reemplazado por un componente alternativo con propiedades favorables.
- Un alimento en el que un componente ha sido modificado por medios enzimáticos, químicos o tecnológicos, para proporcionar un beneficio.
- Un alimento en el que la biodisponibilidad de un componente se ha modificado.
- Una combinación de cualquiera de los anteriores.

Sin embargo, el alimento funcional tiene que cumplir con el requisito imprescindible de ser seguro. En cualquier discusión sobre la funcionalidad de los alimentos, ya sea en un contexto regulador o científico, no existe la consideración de que un beneficio para el organismo compense un posible riesgo para la salud. Un alimento, ya sea considerado funcional o no, siempre debe ser seguro para el consumidor (Howlett, 2008).

Hoy en día, el concepto de alimento funcional se ha globalizado y se ha popularizado entre los consumidores, por lo que las industrias alimentarias ven la oportunidad de crear nuevos alimentos en un mercado de rápida expansión (Bigliardi & Galati, 2013). Actualmente, se comercializan en España algo más de 200 tipos de alimentos funcionales y alrededor de un 69% de los hogares los compran alguna vez. Los alimentos funcionales mueven anualmente en la Unión Europea alrededor de 25.000 millones de euros, de los que el 11% corresponde a España. A nivel mundial, esta cifra se aproxima a 100.000 millones de euros anuales.

2.6.2. Legislación

Actualmente, existen reglamentaciones específicas para los alimentos funcionales por grupos de países, como es el caso de Europa, Norteamérica y Asia.

Las normas para la autorización de nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios están armonizadas a nivel europeo. Antes de que estos productos se introduzcan en el mercado, debe quedar demostrada su inocuidad para la salud y

el medio ambiente, en los controles que efectúa la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

El Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 1997, regula estos nuevos productos. Los nuevos alimentos o ingredientes alimentarios afectados por este Reglamento son los que aún no se utilizan habitualmente para el consumo humano. Este Reglamento se aplica a los productos incluidos en las siguientes categorías:

- Alimentos e ingredientes alimentarios que tengan una estructura molecular primaria nueva o modificada.
- Alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en microorganismos, hongos o algas.
- Alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en vegetales u obtenidos a partir de éstos, y a los ingredientes obtenidos a partir de animales.
- Alimentos e ingredientes alimentarios cuyo valor nutritivo, metabolismo o contenido de sustancias indeseables han sido modificados de manera significativa por el proceso de producción.

El Reglamento no se aplica a los aditivos alimentarios, a los aromas alimentarios, a los disolventes de extracción ni a las enzimas alimentarias, que se regulan mediante el Reglamento (CE) n° 1332/2008. Los organismos modificados genéticamente ya no están regulados por este Reglamento sino por el Reglamento (CE) n° 1823/2003.

Por otra parte, los alimentos o ingredientes alimentarios incluidos en el presente Reglamento no deben suponer ningún peligro para el consumidor, inducirle a error, ni implicar desventajas desde el punto de vista de la nutrición.

La última modificación de este Reglamento se realizó en el año 2009, mediante el Reglamento (CE) n° 596/2009, que entró en vigor en agosto de ese año.

El Reglamento (CE) n° 258/97 establece también requisitos específicos de etiquetado de los nuevos alimentos y los nuevos ingredientes alimentarios, que se suman a los requisitos generales europeos en materia de etiquetado de productos alimenticios, regulados por la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del

Consejo de 20 de marzo de 2000 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios (modificada por el Reglamento (CE) n° 1332/2008).

Sin perjuicio de los requisitos generales de la legislación europea sobre el etiquetado de los productos alimenticios, en el etiquetado de los nuevos alimentos e ingredientes alimentarios debe indicarse:

- Todas las características, como la composición, el valor nutritivo o el uso al que se destina el alimento.
- La presencia de materias que puedan tener consecuencias para la salud de determinados grupos de población.
- La presencia de materias que planteen reservas de tipo ético.

El Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (modificado por el Reglamento (UE) n° 1047/2012), tiene por objeto garantizar que las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en las etiquetas, y la presentación y publicidad de los alimentos, sean claras y basadas en pruebas generalmente aceptadas por la comunidad científica.

Existe una amplia serie de sustancias, tales como vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos esenciales y extractos de hierbas con un efecto nutricional o fisiológico, que pueden estar presentes en un alimento y ser objeto de una declaración. Este Reglamento garantiza un elevado nivel de protección de los consumidores, les da la información necesaria para elegir con pleno conocimiento de causa y crea condiciones iguales de competencia para la industria alimentaria.

Respecto a los trámites para la aceptación de un nuevo alimento funcional, en primer lugar, las empresas deben presentar sus solicitudes a la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ésta remite la documentación a la EFSA, que es el organismo evaluador. A continuación, la Comisión Europea toma una decisión basándose en el dictamen de la EFSA, de acuerdo a los datos y estudios científicos presentados que avalan el nuevo

alimento, y da su aprobación o denegación al nuevo alimento funcional (Buttriss & Benelam, 2010).

2.6.3. Bebidas funcionales antioxidantes

Las bebidas se consumen regularmente en todo el mundo y constituyen un pilar importante en la dieta diaria de los seres humanos. Su popularidad se debe, principalmente, a la variedad de sabores y sensaciones agradables que producen, como el sabor dulce o la sensación refrescante. Sin embargo, las bebidas también se consumen por razones de salud, por ejemplo, para la suplementación de vitaminas, como los zumos de fruta, o para la ingesta de minerales y oligoelementos, que se puede encontrar en el agua mineral.

El consumo de productos de origen vegetal, tales como frutas y verduras, está asociado con un estilo de vida más saludable y con un menor riesgo de enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares (Thilakarathna & Rupasinghe, 2012). Los polifenoles son uno de los metabolitos secundarios más comunes de las plantas, de los cuales los flavonoides son una subclase con un creciente interés, debido a estas propiedades terapéuticas (Bravo, 1998). La manzana (*Malus domestica* B.), el arándano (*Vacciniummacrocarpon* L.) y el arándano azul (*Vacciniumangustifolium* Aiton.) son algunos de los frutos ricos en polifenoles bioactivos. Distintos estudios han demostrado beneficios para la salud asociados con el consumo de esas frutas (Duthie et al., 2006; Van Duyn & Pivonka, 2000). Es ampliamente aceptado que los flavonoides de la dieta mejora la salud cardiovascular y reducen la mortalidad por cardiopatía coronaria (Eilat-Adar & Goldbourt, 2010; Kastorini, Milionis, Goudevenos, & Panagiotakos, 2010), mediante la inhibición de los procesos fisiopatológicos, tales como la oxidación del colesterol LDL bajo condiciones de EO (Nijveldt et al., 2001).

Cada vez hay más evidencia de que los constituyentes de algunas bebidas poseen efectos anticancerígenos, antioxidantes y antimutagénicos. Por ejemplo, los polifenoles y flavonoides del té verde y negro tienen efectos inhibitorios sobre el cáncer (Yang et al., 2011), y tienen propiedades antimutagénicas (Gupta, Saha, & Giri, 2002). Otro ejemplo es el café, cuyo consumo puede reducir el riesgo de carcinoma hepatocelular (Gelatti et al., 2005).

El objetivo prioritario, sin embargo, debe ser la dieta en su conjunto. Emerge así el futuro reto de una dieta funcional.

3. JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

Una de las consecuencias del rápido desarrollo de las poblaciones durante el siglo pasado, ha sido el incremento de la calidad de vida de la sociedad, con el consecuente cambio en la estructura demográfica, provocando el envejecimiento de la misma. El 20% de la población europea cuenta con más de 65 años y en el año 2030 se espera que esta proporción aumente hasta el 30%. España se sitúa como uno de los países de la Unión Europea con la población más envejecida, llevando ello asociado un aumento en el coste sanitario. Según el Eurostat, España tendrá el mayor porcentaje de población octogenaria de Europa en el año 2060. Este envejecimiento progresivo de la población, junto con el incremento de los gastos sanitarios en las últimas décadas, sugieren la necesidad de establecer programas de desarrollo de nuevos productos alimentarios, que puedan ejercer un efecto positivo sobre la salud (alimentos funcionales), reduciendo a largo plazo los costosos gastos del sistema sanitario.

La gran cantidad de alimentos funcionales que encontramos en el mercado indica el auge que estos tienen dentro de la población. Actualmente, se comercializan en España algo más de 200 tipos de alimentos funcionales y alrededor de un 69% de los hogares los compran alguna vez. Esta cifra llega hasta el 80% de los hogares en Estados Unidos. Los alimentos funcionales mueven anualmente en la Unión Europea alrededor de 25.000 millones de euros, de los que el 11% corresponde a España. A nivel mundial, esta cifra se aproxima a 100.000 millones de euros anuales.

Se sabe que la EA es una entidad patológica multifactorial, donde el EO y el estado inflamatorio tienen un papel predominante. Es la enfermedad degenerativa cerebral más importante, responsable de más del 50% de todas las demencias. Aunque la EA no es exclusiva de las personas ancianas, sabemos que su frecuencia aumenta con el avance de la edad. En la EA se ha constatado la presencia de un EO, es decir, un daño producido por un aumento de la actividad de los RL sobre las biomoléculas, y en el caso del SNC, predominantemente sobre

las moléculas de ácidos grasos. Otras biomoléculas como las proteínas y el ADN también sufren un daño en su estructura molecular. De ahí la importancia de prevenir y paliar este proceso oxidativo, que juega un importante papel en el proceso neurodegenerativo, característico de esta enfermedad.

Los polifenoles que consumimos a través de la dieta, en alimentos y bebidas como las frutas, verduras y el vino, se absorben en nuestro organismo apareciendo en la sangre y en los tejidos. Simultáneamente, asociado a su consumo, se detecta un aumento de la capacidad antioxidante de la sangre, lo que sustenta la acción antioxidante de los polifenoles *in vivo*.

Esta Tesis Doctoral se plantea como continuación de otro proyecto realizado anteriormente en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, en el que se analizó la variación en el grado de EO que se produce en las tres fases de la EA: leve, moderada y avanzada, a través de diversos biomarcadores plasmáticos. Los resultados obtenidos permitieron afirmar que el EO se incrementa a medida que evoluciona la enfermedad, en las tres fases analizadas. Así pues, una vez determinado el grado de EO que se correlaciona con cada una de las fases de la enfermedad, resulta interesante estudiar el efecto de diversos compuestos con alta actividad antioxidante sobre el EO, en aquellas fases donde estos antioxidantes pueden atenuar o enlentecer el incremento del EO, es decir, la fase leve y moderada de la enfermedad.

El aspecto más relevante y novedoso del proyecto reside en la diversidad de antioxidantes utilizados en el diseño de la bebida, por disponer de una mayor capacidad antioxidante y por utilizar como vehículo un alimento, lo que constituye una ventaja, ya que así pueden actuar en sistemas integrados o en cascadas, en las que los antioxidantes transportan a los RL dentro del sistema biológico hacia destinos más seguros, pudiendo ser eliminados, por ejemplo, de un medio liposoluble hacia un medio hidrosoluble.

El estado actual de los conocimientos respecto al efecto de suplementos antioxidantes polifenólicos sobre el EO y el proceso inflamatorio en la EA, reside en estudios realizados con animales, habiéndose obtenido resultados alentadores, lo que sugiere pasar a estudios en humanos, tal y como se plantea en esta Tesis Doctoral.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. HIPÓTESIS

La hipótesis del estudio es que conocidos los hechos siguientes:

- Los enfermos de Alzheimer presentan un EO e inflamatorio asociado a la patología, que se va incrementando con el avance de la enfermedad a lo largo del tiempo.
- Los antioxidantes polifenólicos han mostrado en estudios con animales, en los que se ha provocado la EA, su capacidad de actuar frente al EO e inflamatorio asociado a esta patología.

Los conocimientos científicos anteriores nos llevan a pensar que la administración regular de antioxidantes, concretamente polifenólicos, a través de la dieta, podría atenuar el aumento del proceso oxidativo/inflamatorio en estos pacientes.

Esta hipótesis se concreta en que la ingesta diaria de una bebida rica en antioxidantes polifenólicos, diseñada en este proyecto, podría disminuir el incremento del EO y del proceso inflamatorio asociados a la EA, en los estados leve y moderado de la enfermedad.

4.2. OBJETIVO GENERAL

Diseñar una nueva bebida con alto poder antioxidante, en base a un elevado contenido en antioxidantes polifenólicos, y analizar su efecto sobre biomarcadores de EO e inflamación en enfermos de Alzheimer.

4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar la composición de la bebida desde un punto de vista teórico, con el fin de que tenga un elevado poder antioxidante, fundamentalmente en base a compuestos polifenólicos, contemplando la inclusión de componentes permitidos tanto en tipo como en cantidad dentro de la actual normativa legal alimentaria.
- Elaborar la bebida diseñada dentro de una planta piloto perteneciente a la industria alimentaria, relacionada con el sector de zumos y bebidas.
- Estudiar la actividad y composición antioxidante de la nueva bebida diseñada, así como sus propiedades organolépticas y su estabilidad durante el almacenamiento.
- Evaluar si el consumo diario de la nueva bebida antioxidante, durante un periodo de ocho meses, afecta a las concentraciones plasmáticas y urinarias de biomarcadores de EO en enfermos de Alzheimer, en diferentes fases de la enfermedad, respecto a un grupo control.
- Evaluar si el consumo diario de la nueva bebida antioxidante, durante un periodo de ocho meses, afecta a las concentraciones plasmáticas de biomarcadores de inflamación en enfermos de Alzheimer, en diferentes fases de la enfermedad, respecto a un grupo control.

5. ARTÍCULOS PUBLICADOS

FOOD COMPOSITION AND ANALYSIS

A new antioxidant beverage produced with green tea and apple

Jose M. Rubio-Perez¹, Maria L. Vidal-Guevara², Pilar Zafrilla¹, and Juana M. Morillas-Ruiz¹

¹Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, Facultad de Ciencias de la Salud, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos, s/n, Guadalupe 30107, Murcia, España and ²Departamento de Investigación y Desarrollo, Hero España, S.A. Avenida de Murcia, 1, Alcantarilla 30820, Murcia, España

Abstract

Green tea and apple are natural products with health benefits. These healthy properties are linked closely to the antioxidant compounds, mainly phenolic compounds. These antioxidant compounds have a potential for preventing and treating cancer, cardiovascular, inflammatory and neurodegenerative diseases in humans. The aim of the present work was to design a new beverage with high antioxidant power combining extracts of green tea and apple, studying the antioxidant composition and activity, organoleptic properties (colour) and stability status during storage at different temperatures. The majority compounds identified in the beverage were flavan-3-ols, being the (–)-epigallocatechin-3-gallate which had the highest concentration. After storage, floridzine was the compound with lower decrease of concentration. The new designed beverage had a good colour, and high antioxidant activity and stability at room temperature, so that the beverage needs no refrigeration, showing potential for the development of new healthy functional beverages.

Introduction

A functional beverage can be defined as a drink product that is non-alcoholic and includes in its formulation non-traditional ingredients (herbs, vitamins, minerals, antioxidants) to provide specific health benefits that go beyond general nutrition. Sports and performance drinks, energy drinks, ready to drink teas, enhanced fruit drinks, soy beverages and enhanced water, among others, are some of the product segments rolled out as functional beverages in the market space.

An antioxidant is a molecule capable of inhibiting the oxidation of other molecules. They do this by being oxidized themselves, so antioxidants are often reducing agents such as thiols, ascorbic acid or polyphenols (Sies, 1997).

An imbalance between oxidants and antioxidants in favour of the oxidants, potentially leading to damage, is termed as "oxidative stress". In humans, oxidative stress may be involved in many diseases. These include cancer (Halliwell, 2007), atherosclerosis, Parkinson's disease and Alzheimer's disease (Ramalingam & Kim, 2012; Valko et al., 2007).

Polyphenols are natural substances that are present in fruits, vegetables and products obtained from these, such as olive oil, red wine, tea and apple juice. Flavonoids are the largest group of polyphenols, a group that is mainly divided into anthocyanins, glycosylated derivative of anthocyanidin, present in colourful flowers and fruits, and anthoxantins, colourless compounds

Keywords

Antioxidant, apple, beverage, flavonoids, green tea, storage

History

Received 26 September 2013
Revised 19 January 2014
Accepted 26 January 2014
Published online 6 March 2014

further divided into several categories including flavones, isoflavones, flavanols and flavonols (Butterfield et al., 2002). The importance of polyphenolic flavonoids in enhancing cell resistance to oxidative stress goes beyond simple scavenging activity and is of most interest in pathologies in which oxidative stress plays an important role. Numerous studies in the past 15 years have shown that flavonoids have *in vitro* and *in vivo* activity in preventing or reducing the deleterious effects of oxygen-derived free radicals associated with several chronic and stress-related human and animal diseases (Kaur et al., 2007; Levites et al., 2003; Miura et al., 2000).

Green tea has attracted attention for its health benefits, particularly with respect to its potential for preventing and treating cancer, cardiovascular, inflammatory and neurodegenerative diseases in humans (Hollman et al., 1999; Tedeschi et al., 2004). The healthy properties of green tea are linked closely to the antioxidant compounds (mainly phenolic compounds) present in this natural beverage (Maron et al., 2003; Vinson et al., 2004). These properties have been attributed to the flavanols present in tea, specifically catechins (C) (mainly (–)-epicatechin (EC), (–)-gallocatechin (GC), (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (–)-epicatechin-3-gallate (ECG)), that are potent natural antioxidants (Bahorun et al., 2004). Green tea polyphenols are now being considered as therapeutic agents in well controlled epidemiological studies, aimed to alter brain ageing processes and to serve as possible neuroprotective agents in progressive neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases. In particular, the literature has studied the putative novel neuroprotective mechanism of the major green tea polyphenol: EGCG (Weinreb et al., 2004).

Apple (*Malus domestica* Borkh) is a frequently consumed fruit and one of the most cultivated tree fruit in the world (FAOSTAT, 2011). Apple consumption has been attributed to the prevention

Correspondence: Jose M. Rubio-Perez, Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, Facultad de Ciencias de la Salud, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos, s/n, Guadalupe 30107, Murcia, España. Tel: +34968278638. Fax: +34968278197. E-mail: jmrubio@ucam.edu

DOI: 10.3109/09637486.2014.893282

A new antioxidant beverage produced with green tea and apple 553

and protection from several chronic and degenerative diseases in humans, mainly because of their antioxidants that prevent free-radical damage (Bouayed & Bohn, 2010; Boyer & Liu, 2004; Di Pietro et al., 2007). The phenolic compounds in apples are responsible for most of the antioxidant activity of the fruit (Lee et al., 2003; Tsao et al., 2005). The major phenolic component of apple is chlorogenic acid, together with flavonols (quercetin and its glycosides) and C and EC (Gliszczynska-Swiglo & Tyrakowska 2003). Ascorbic acid is another important antioxidant compound present in apple (Gliszczynska-Swiglo & Tyrakowska, 2003; Miller & Rice-Evans, 1997).

Phenolic compounds derived from natural products like apple and green tea are widely studied for the treatment or prevention of cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases (Bhardwaj & Khanna, 2013; Lecumberri et al., 2013; Lim et al., 2013; McCann et al., 2007; Serra et al., 2012). Due to the importance of functional foods in the health, the introduction of these antioxidants in food products are increasing (Siró et al., 2008). The problem is that their antioxidant capacity is not stable over time, and need to be stored under refrigeration conditions.

The aim of the present work was to design a new beverage with high antioxidant power and stable at room temperature for a long period of time, combining extracts of green tea and apple, studying the antioxidant composition and activity, organoleptic properties and stability status during storage.

Materials and methods

Reagents and standards

Green tea extract Suphenon 90LB was purchased from Taiyo Green Power Co., Ltd (Jiangsu, China). Apple extract AF POMM 9050 was purchased from Diana Naturals (Antrain, France).

Standards: Quercetin 3-glucoside and quercetin 3-rhamnoside were purchased from Polyphenols Laboratories AS (Sandnes, Norway). Flordizine, procyanidin B2, gallic acid, chlorogenic acid, C, EC, ECG, GC and EGCG were purchased from Sigma-Aldrich Química SA (Madrid, Spain). 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH[•]) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Munich, Germany). Ascorbic acid was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Reagents: Formic acid, methanol and metaphosphoric acid of analytical grade were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Potassium dihydrogen phosphate was purchased from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain). Milli-Q system (Merck Millipore, Billerica, MA) ultrapure was used throughout this research.

Experimental design

The antioxidant beverage was manufactured in the industrial production plant of Hero Spain, S.A. (Alcantarilla, Murcia, Spain) and was composed of 84.29% of water, 10.16% of apple concentrate, 4.80% of trehalose, 0.42% of lemon concentrate, 0.16% of green tea extract, 0.08% of apple extract and minor quantities of vitamins, minerals, flavourings and sweeteners (Table 1) and contained into opaque aseptic tetra briks of 200 mL. Since lemon fruit is a rich source of vitamin C and flavonoids (González-Molina et al., 2010), such concentrate was added to increase the antioxidant power of the beverage and to improve its flavour. Tetra briks were picked up from the industrial production plant 1 h after packing and taken out of the production line by a plant supervisor to minimise variability between batches. The beverage was divided into two groups and stored at two different temperatures (4 °C and 25 °C) in darkness. A total number of 57 aseptic tetra briks were used in this study (24 tetra briks stored

Table 1. Ingredients used in the formulation of the antioxidant beverage (% of total).

Ingredients	Concentration
Water	84.29
Apple concentrate	10.16
Trehalose	4.80
Lemon concentrate	0.42
Green tea extract (Suphenon 90LB)	0.16
Apple extract (AF POMM 9050)	0.08
Vitamin C	0.05
Apple flavouring (24MA100 Dallant)	0.01
Vitamin E	<0.01
Niacin	<0.01
Acetylcholine K	<0.01
Vitamin B ₁₂	<0.01
Zinc	<0.01
Copper	<0.001
Folic acid	<0.001
Selenium	<0.001

at 4 °C and 33 tetra briks stored at 25 °C). Samples were collected monthly during 8 months for physicochemical measurements. At each sampling time, samples were randomly removed from storage and subjected to physicochemical (one tetra brik) analyses. All analyses in this study were done in triplicate and the results expressed as mean values ± standard deviation (SD).

pH and total soluble solids

pH and total soluble solids (TSS) were evaluated as quality indexes. The pH values were measured using a pH-meter (GLP 21, Crison Instruments, S.A., Barcelona, Spain). The TSS contents were recorded in a refractometer (Master-M, Atago Co., Ltd, Tokyo, Japan) at 20 °C with values being expressed as °Brix.

Colour measurement

Colour measurements were evaluated as organoleptic parameter and were determined in a MINOLTA CM-508i Colorimeter (Milton, Keynes, UK). The values of CIEL*, CIEa* and CIEb* were calculated in a rounded cuvette using illuminant D65 and 10° observer, according to the CIE L*a*b* 76 convention. Data were recorded and processed using the MINOLTA Software Chromacontrol S, PC-based colorimetric data system. Hue angle (H*) was calculated from $\tan^{-1}(b^*/a^*)$ and Chroma (C*) from $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$.

Analysis of ascorbic acid

Ascorbic acid content was determined by reversed phase UPLC-UV. 6 mL of antioxidant beverage was brought to a final volume of 50 mL with 1% (w/v) metaphosphoric acid solution. Homogenates were submitted to 2000 g in a refrigerated centrifuge (Universal 320 R, Hettich Instruments, Beverly, MA) for 10 min. The clear supernatant was filtered through a 0.22 µm filter (Millex-GV13, Millipore, Bedford, MA). Then, a 4 µL aliquot of this solution was injected into the UPLC system (Acquity UPLC, Waters Corporation, Milford, MA) equipped with a sample manager, binary solvent manager and PDA detector at 245 nm. Samples were analysed at 25 °C on an Acquity UPLC BEH C18 reversed-phase column (100 × 2.1 mm, particle size of 1.7 µm) (Waters Corporation, Milford, MA). The mobile phase was phosphate buffer solution 0.1 M, pH 3.5. The flow rate was kept at 0.4 mL min⁻¹. Aliquots of 4 µL of ascorbic acid standards solutions (6, 15, 30 and 60 µg/mL), prepared by appropriate dilution of working standard solution (600 µg/mL) in 1% (w/v) metaphosphoric acid solution, were used to do a standard curve by

554 J. M. Rubio-Perez et al.

Int J Food Sci Nutr, 2014; 65(5): 552-557

plotting peak area versus ascorbic acid amount after UPLC analysis. Results were expressed as mg per L.

Analysis of antioxidant activity

To analyse the antioxidant activity of the beverage samples, a DPPH[•] assay was used, following a previously-described protocol (Llorach et al., 2004). Briefly, all samples were centrifuged at 10 000 rpm (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Scientific, Osterode, Germany) for 10 min, at 4 °C. The DPPH[•] radical scavenging capacity was evaluated by measuring the variation in absorbance at 515 nm after 50 min of reaction in parafilm-sealed glass cuvettes (to avoid methanol evaporation), at 25 °C. All reactions started by adding 5 µL of the corresponding diluted sample (1:100 in methanol/water (80:20 v/v)) and 45 µL of methanol to the cuvette containing the diluted stock solution, up to absorbance 1 (950 µL, from 0.094 mM free radical DPPH[•] (Sigma, St. Louis, MO)). The final volume of the assay was 1 mL. The DPPH[•] reactions were carried out in a UV-Vis spectrophotometer (Cary 50 Bio, Varian, Melbourne, Australia) and results were expressed as mM Trolox.

HPLC analysis of phenolic compounds

Before HPLC analysis, the antioxidant beverage was filtered through a 0.45 µm filter (Millex-HV13, Millipore, Bedford, MA). 20 µL of every sample were injected for HPLC analysis on the equipment using a Merck-Hitachi pump L-6200 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) and a diode array detector Shimadzu SPD-M6A UV (Shimadzu, Kyoto, Japan) using a reversed-phase column Lichrochart 100 RP-18 column (Merck, Darmstadt, Germany) (25 × 0.4 cm, 5 µm particle size). Water plus 5% formic acid (solvent A) and HPLC grade methanol (solvent B) were used as solvents at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Elution was performed with a gradient starting with 2% B to reach 32% B at 30 min, 40% B at 40 min, and 95% B at 50 min and became isocratic for 5 min. Chromatograms were recorded at 280, 320 and 360 nm. The different compounds were characterised by chromatographic comparison with authentic standards, when available, and their spectra recorded with the diode array detector. Flavonols were quantified as quercetin 3-glucoside and quercetin 3-rhamnoside. Detection was achieved at 360 nm. Dihydroxychalcones were quantified as floridzine at 280 nm. Proanthocyanidins were quantified as procyanidin B2 at 280 nm. Phenolic acids were quantified as gallic acid at 280 nm and chlorogenic acid at 320 nm. Flavan-3-ols were quantified as C, EC, ECG, GC and EGCG at 280 nm. Total phenolic compounds were calculated as addition of the amounts of phenolic acids, flavan-3-ols, proanthocyanidins, dihydroxychalcones and flavonols detected in each chromatogram. The reproducibility of the HPLC analysis was within 6%, and results were expressed as mg per L.

Statistical analysis

All data were processed using the SPSS 17.0 software (LEAD Technologies, Inc., Chicago, IL). We carried out a multi-factorial analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Results and discussion

pH and TSS were evaluated as quality parameters. At initial time (day 0), the pH value was 3.18 and the average value of TSS was 10.70 °Brix. These values were unaffected over the storage period as previously reported in plant-based food products (García-Viguera et al., 1998). The TSS content of the new beverage was in accordance with the range established by the Spanish National Regulations for commercial beverages (Real Decreto 667/1983).

During the storage period, a decrease in colour lightness (CIEL^{*} value) was detected in the sample stored at 25 °C. This decrease was 10.73%. However, for the sample stored at 4 °C, there was no difference in this parameter of colour. At 240 days of storage, the lightness value of the sample stored at 25 °C was 8% lower than the sample refrigerated (Table 2). Alteration in redness (CIEa^{*} value) was also observed during the storage period, showing an increase for both samples. This increase was much higher for the sample stored at 25 °C, showing a value, at 240 days of storage, almost seven times the sample refrigerated (Table 2). Finally, during the storage period, an increase in yellowness (CIEb^{*} value) was detected in both samples, showing a final increase of 62% in both samples (Table 2). Equivalent effects

Table 2. Stability of CIEL^{*}a^{*}b^{*} values in the prepared beverage during the storage period.

Days	4 °C	25 °C
CIEL[*]		
0	47.91 ± 0.38 b	47.90 ± 0.22 c
30	47.70 ± 0.23 b	46.95 ± 0.31 b
60	45.68 ± 0.45 a	43.74 ± 0.25 a
90	47.58 ± 0.17 b	45.60 ± 0.19 b
120	49.86 ± 0.26 c	49.43 ± 0.26 d
150	49.24 ± 0.32 c	48.70 ± 0.14 d
180	47.70 ± 0.18 b	45.43 ± 0.32 b
210	46.69 ± 0.30 a	42.80 ± 0.27 a
240	46.57 ± 0.21 a	42.76 ± 0.16 a
CIEa[*]		
0	0.42 ± 0.001 a	0.43 ± 0.001 b
30	0.41 ± 0.001 a	0.09 ± 0.001 a
60	0.62 ± 0.003 c	0.84 ± 0.003 c
90	0.57 ± 0.002 c	1.68 ± 0.01 d
120	1.64 ± 0.01 d	1.66 ± 0.02 d
150	1.65 ± 0.02 d	1.59 ± 0.02 d
180	0.50 ± 0.001 b	2.84 ± 0.04 e
210	0.38 ± 0.002 a	3.61 ± 0.03 f
240	0.61 ± 0.001 c	3.82 ± 0.02 f
CIEb[*]		
0	14.72 ± 0.07 a	14.70 ± 0.06 a
30	16.96 ± 0.08 b	22.11 ± 0.09 b
60	17.40 ± 0.02 b	25.59 ± 0.13 d
90	21.10 ± 0.11 c	31.80 ± 0.18 e
120	14.38 ± 0.06 a	14.35 ± 0.08 a
150	14.12 ± 0.05 a	14.01 ± 0.05 a
180	17.68 ± 0.07 b	21.85 ± 0.03 b
210	23.63 ± 0.09 d	23.63 ± 0.11 c
240	23.71 ± 0.16 d	23.89 ± 0.09 c
Chroma		
0	14.73 ± 0.06 a	14.71 ± 0.05 a
30	16.96 ± 0.08 b	22.11 ± 0.09 b
60	17.41 ± 0.05 b	25.60 ± 0.12 d
90	21.11 ± 0.09 c	31.84 ± 0.14 e
120	14.47 ± 0.08 a	14.45 ± 0.04 a
150	14.22 ± 0.12 a	14.10 ± 0.07 a
180	17.69 ± 0.03 b	22.03 ± 0.09 b
210	23.63 ± 0.31 d	23.90 ± 0.08 c
240	23.72 ± 0.14 d	24.19 ± 0.05 c
Hue angle		
0	88.37 ± 0.62 b	88.32 ± 0.64 c
30	88.62 ± 0.59 b	89.77 ± 0.51 d
60	87.96 ± 0.43 b	88.12 ± 0.48 c
90	88.45 ± 0.65 b	86.98 ± 0.33 c
120	83.49 ± 0.44 a	83.40 ± 0.42 b
150	83.34 ± 0.32 a	83.52 ± 0.29 b
180	88.38 ± 0.41 b	82.59 ± 0.17 b
210	89.08 ± 0.63 b	81.32 ± 0.23 a
240	88.53 ± 0.55 b	80.91 ± 0.34 a

Values are mean (n=3) ± SD. Means in the same column followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's test.

DOI: 10.3109/09637486.2014.893282

A new antioxidant beverage produced with green tea and apple 555

were observed in CIEL^a*a^b* parameters in similar antioxidant beverages during storage (Gironés-Vilaplana et al., 2012). These results produced a parallel increase in C*, showing a higher saturation in the sample stored at 25 °C and in the sample stored at 4 °C. However, the rate of browning, determined by H* values, was affected by storage temperature, causing a decrease in H* values in the sample stored at room temperature. In contrast, the study of Gironés-Vilaplana et al. (2012) showed an increase in H* values for all the samples at all temperatures of storage in a similar beverage. Nevertheless, changes in the colour of the new beverage (significant for all of parameters measured) were impossible to evaluate by the human eye, without no appreciate browning.

Both samples showed an initial ascorbic acid content of 396.51 mg/L (Figure 1). A decrease in ascorbic acid content during the storage period was observed in both samples. This loss of ascorbic acid was higher in the sample stored at 25 °C (41.24%) in accordance with previous findings in other fruit beverages (Kabasakalis et al. 2000; Klimczak et al. 2007). The fall of the amount of ascorbic acid was progressive (not significant in the sample stored at 4 °C) until the seventh month of storage, at this point, a pronounced decrease in ascorbic acid content was observed in both samples ($p < 0.05$), showing a final value of 308.64 mg/L of ascorbic acid for the sample stored at 4 °C and 233.11 mg/L of ascorbic acid for the sample stored at 25 °C (Figure 1). This decrease in ascorbic acid content in both samples was lower and slower compared to the loss of ascorbic acid in lemon juice stored at the same temperatures (Gironés-Vilaplana et al., 2012), maybe due to the protective effect of phenolic compounds present in green tea and apple on ascorbic acid. Other authors have recorded the same protective effect in different models or beverages (Bordignon-Luiz et al., 2007; Poesi-Langston & Wrolstad, 1981).

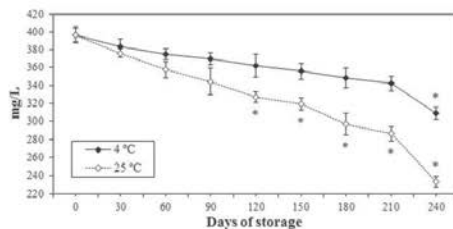


Figure 1. Changes in ascorbic acid content (mg/L) in the prepared antioxidant beverage during 240 days of storage at 4 °C and 25 °C in darkness. Values are mean ($n = 3$) \pm SD. * $p < 0.05$ versus day 0.

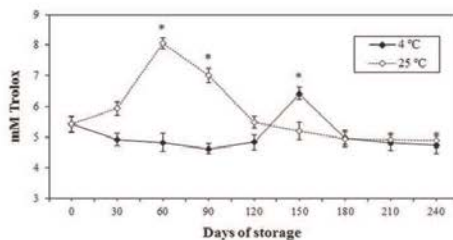


Figure 2. Changes in antioxidant activity (mM Trolox) in the prepared antioxidant beverage during 240 days of storage at 4 °C and 25 °C in darkness. Values are mean ($n = 3$) \pm SD. * $p < 0.05$ versus day 0.

Figure 2 presents the changes in the antioxidant activity of the prepared antioxidant beverage, measured by DPPH* assay, during 240 days of storage at 4 °C and 25 °C. An increase in antioxidant activity was observed during the first 2 months of storage at 25 °C, maybe due to increased amounts of antioxidant compounds (probably condensed tannins originated during storage and hydrolyzed subsequently, thereby decreasing the antioxidant capacity) after processing, as shown in reconstituted juices from concentrate (Arená et al., 1999). In the same period at 4 °C, the antioxidant activity decreased by 11.10% in accordance with previous findings in citrus juices (Del Caro et al., 2004). The antioxidant activity of beverage analysed in the present study decreased by 12.57% and 9.74% after 8 months of storage at 4 °C and 25 °C, respectively ($p > 0.05$). However, at 240 days of storage, the value of antioxidant activity was similar in both samples, about 4.82 mM Trolox, being a great value of antioxidant activity compared with other novel drinks rich in polyphenols (Gironés-Vilaplana et al., 2013) and vegetal samples with high antioxidant activity (Barreca et al., 2011), so that the beverage needs no refrigeration.

The phenolic compounds identified in the designed antioxidant beverage were: phenolic acids, flavan-3-ols, proanthocyanidins, dihydroxychalcones and flavonols (Table 3). Total phenolic compounds were expressed as the sum of individual concentrations. The initial concentration of total phenolic compounds identified was 1130.3 mg/L. These results were slightly higher than the results obtained by Dominguez-Perles et al. (2011) in a novel beverage produced with green tea and broccoli. After storage at 25 °C during 8 months, the concentration decreased to 35.42%. In identified phenolic acids, gallic acid (31.2 mg/L) and chlorogenic acid (52.5 mg/L) were found. After storage at 25 °C during 240 days, the concentration decreased to 30.77 and 27.24%, respectively. The majority compounds identified in the antioxidant beverage were flavan-3-ols, being the EGCG which had the highest concentration (674.8 mg/L) and the GC the lowest concentration (26.4 mg/L). After storage at 25 °C during 8 months, the initial concentration of EGCG decreased to 36.50%, in accordance with the data reported for green tea leaves (Friedman et al., 2009). The concentration of EC was 139.8 mg/L and decreased to 37.91% after 8 months of storage at

Table 3. Values of phenolic acids, flavan-3-ols, proanthocyanidins, dihydroxychalcones, flavonols and total phenolic compounds of the antioxidant beverage in the initial and final storage period at 25 °C in darkness.

	Initial	240 days
Phenolic acids		
Gallic acid	31.2 \pm 0.6	21.6 \pm 0.8
Chlorogenic acid	52.5 \pm 0.2	38.2 \pm 1.6*
Flavan-3-ols		
(-)-epigallocatechin-3-gallate	674.8 \pm 0.5	428.5 \pm 8.2*
(-)-gallocatechin	26.4 \pm 0.1	15.8 \pm 0.8*
(-)-epicatechin-3-gallate	47.6 \pm 0.3	32.5 \pm 1.1
(-)-epicatechin	139.8 \pm 0.2	86.8 \pm 1.1*
(+)-catechin	42.4 \pm 0.2	25.4 \pm 0.5*
Proanthocyanidins		
Procyanidin B2	46.5 \pm 0.1	29.8 \pm 1.0*
Dihydroxychalcones		
Floridzine	54.3 \pm 0.2	41.6 \pm 1.0*
Flavonols		
Quercetin 3-glucoside	5.5 \pm 0.2	3.2 \pm 0.2
Quercetin 3-rhamnoside	9.3 \pm 0.1	6.5 \pm 0.4*
Total phenolic compounds	1130.3 \pm 0.5	729.9 \pm 17.1*

Values are mean ($n = 3$) \pm SD, expressed as mg/L antioxidant beverage. An asterisk indicates significant difference from the mean value at initial time (ANOVA, $p < 0.05$).

556 J. M. Rubio-Perez et al.

Int J Food Sci Nutr, 2014; 65(5): 552-557

25 °C. ECG (47.6 mg/L) was the flavan-3-ols with lower decrease of concentration (31.72%) after 240 days of storage at 25 °C. In contrast, the study with green tea leaves of Friedman et al. (2009) showed that ECG was the least stable flavan-3-ols with a fall of 51%. GC and C decreased about 40% after storage in the same conditions. The identified proanthocyanidin was procyanidin B2, showing an initial concentration of 46.5 mg/L. After storage at 25 °C during 8 months, the concentration decreased to 35.91%. Flordizine is a dihydroxychalcone which had an initial concentration of 54.3 mg/L. After storage, the concentration decreased to 23.39%, being the compound with lower decrease of concentration of all identified in the antioxidant beverage. The flavonols identified in the antioxidant beverage were quercetin 3-glucoside and quercetin 3-rhamnoside, being the concentration of 14.8 mg/L. After the storage at 25 °C during 8 months, this concentration decreased to 34.46%, being quercetin 3-rhamnoside the flavonol with lower decrease of concentration (30.11%) (Table 3).

Although levels of ascorbic acid and total phenolic compounds decreased at 25 °C, 41.24 and 35.42%, respectively, the antioxidant activity of the prepared antioxidant beverage decreased only to 9.74%. This may be due to Maillard's reactions products (Anese et al., 1999) and by formation of condensed tannins during the storage period. These condensed tannins have been demonstrated to exhibit numerous biological and pharmacological activities that are of interest in human and medicine, such as inhibition of lipid oxidation, mutagenicity of carcinogens and tumor promotion (Higdon & Frei, 2003; Okuda, 2005) because are powerful antioxidants (Dixon et al., 2005).

Conclusion

The new designed beverage, based on extracts of green tea and apple, provided interesting results. This beverage is a food product with good organoleptic properties (colour), with high antioxidant activity and stability at room temperature, so that the beverage needs no refrigeration, showing potential for the development of new healthy functional beverages. Further studies of bioavailability and biological activity are guaranteed to evaluate *in vivo* its potential beneficial effects for human health.

Acknowledgements

Thanks to the Seneca Foundation (Regional Agency of Science and Technology of the Region of Murcia, Spain) for Jose Miguel Rubio-Perez fellowship.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

Our research has been supported financially by Directorate General of Investigation, Ministry of Education and Culture of the Autonomous Community of the Region of Murcia, Spain.

References

- Anese M, Manzocco L, Nicolini MC, Lerici CR. 1999. Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. *J Sci Food Agric* 79: 750-754.
- Arena E, Fallico B, Maccarone E. 1999. L'attività antiossidante dei succhi di arance pigmentate. In: Porretta S, editor. Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare, Vol. IV. Pinerolo, Italy: Chiriotti Editori. p 995-999.
- Bahorin T, Luximon-Ramma A, Crozier A, Aruoma OI. 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J Sci Food Agric* 84: 1553-1561.
- Barreca D, Bellocchio E, Caristi C, Leuzzi U, Gattuso G. 2011. Elucidation of the flavonoid and furocoumarin composition and radical-scavenging activity of green and ripe chinotto (*Citrus myrtifolia* Raf.) fruit tissues, leaves and seeds. *Food Chem* 129:1504-1512.
- Bhardwaj P, Khanna D. 2013. Green tea catechins: defensive role in cardiovascular disorders. *Chin J Nat Med* 11:345-353.
- Bordignon-Luiz MT, Gauche C, Gris EF, Falcão LD. 2007. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT-Food Sci Technol* 40:594-599.
- Bouayed J, Bohn T. 2010. Exogenous antioxidants - double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 3: 228-237.
- Boyer J, Liu RH. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J* 3:517S-520S.
- Butterfield D, Castegna A, Pocernich C, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V. 2002. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 13:444-461.
- Del Caro A, Piga A, Vacca V, Agabbio M. 2004. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chem* 84: 99-105.
- Di Pietro PF, Medeiros NI, Vieira FGK, Fausto MA, Belló-Klein A. 2007. Breast cancer in southern Brazil: association with past dietary intake. *Nutr Hosp* 22:565-572.
- Dixon RA, Xie DY, Sharma SB. 2005. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytol* 165:9-28.
- Dominguez-Perles R, Moreno DA, Carvajal M, Garcia-Viguera C. 2011. Composition and antioxidant capacity of a novel beverage produced with green tea and minimally-processed byproducts of broccoli. *Innovative Food Sci Emerg Technol* 12:361-368.
- FAOSTAT. 2011. Food and agricultural organization of the United Nations. Available at: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>. Accessed on 17 January 2014.
- Friedman M, Levin CE, Lee SU, Kozmike N. 2009. Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months. *J Food Sci* 74:H47-H51.
- García-Viguera C, Zafrilla P, Artes F, Romero F, Abellan P, Tomas-Barberan FA. (1998). Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *J Sci Food Agric* 78:565-573.
- Gironés-Vilaplana A, Mena P, García-Viguera C, Moreno DA. 2012. A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *LWT-Food Sci Technol* 47: 279-286.
- Gironés-Vilaplana A, Mena P, Moreno DA, García-Viguera C. 2013. Evaluation of sensorial, phytochemical and biological properties of new isotonic beverages enriched with lemon and berries during shelf life. *J Sci Food Agric*. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/jsfa.6370.
- Gliszczynska-Swiglo A, Tyrakowska B. 2003. Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. *J Food Sci* 68:1844-1849.
- González-Molina E, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C. 2010. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J Pharm Biomed Anal* 51:327-345.
- Halliwell B. 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 401:1-11.
- Higdon JV, Frei B. 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43: 89-143.
- Hollman PC, Feskens EJ, Katan MB. 1999. Tea flavonols in cardiovascular disease and cancer epidemiology. *Proc Soc Exp Biol Med* 220: 198-202.
- Kabasakalis V, Siopidou D, Moshatou E. 2000. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chem* 70:325-328.
- Kaur S, Greaves P, Cooke DN, Edwards R, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo TH. 2007. Breast cancer prevention by green tea catechins and black tea theaflavins in the C3(1) SV40 T,t antigen transgenic mouse model is accompanied by increased apoptosis and a decrease in oxidative DNA adducts. *J Agric Food Chem* 55:3378-3385.
- Klimczak I, Malecka M, Szlachta M, Gliszczynska-Swiglo A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J Food Compos Anal* 20: 313-322.
- Lecumberri E, Dupertuis YM, Miralbell R, Pichard C. 2013. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy. *Clin Nutr* 32:894-903.

DOI: 10.3109/09637486.2014.893282

A new antioxidant beverage produced with green tea and apple 557

- Lee KW, Kim YJ, Kim D, Lee HJ, Lee CY. 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 51:6516–6520.
- Levites Y, Amit T, Mandel S, Youdim MBH. 2003. Neuroprotection and neurorescue against amyloid beta toxicity and PKC-dependent release of non-amyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J* 17:952–954.
- Lim HJ, Shim SB, Jee SW, Lee SH, Lim CJ, Hong JT, Sheen YY, Hwang DY. 2013. Green tea catechin leads to global improvement among Alzheimer's disease-related phenotypes in NSE/hAPP-C105 Tg mice. *J Nutr Biochem* 24:1302–1313.
- Llorach R, Tomás-Barberán FA, Ferreres F. 2004. Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *J Agric Food Chem* 52:5109–5116.
- Maron DJ, Lu GP, Cai NS, Wu ZG, Li YH, Chen H, Zhu JQ, et al. 2003. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 163:1448–1453.
- McCann MJ, Gill CI, O'Brien G, Rao JR, McRoberts WC, Hughes P, McEntee R, Rowland IR. 2007. Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food Chem Toxicol* 45:1224–1230.
- Miller NJ, Rice-Evans CA. 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem* 60:331–337.
- Miura Y, Chiba T, Miura S, Tomita I, Umegaki K, Ikeda M, Tomita T. 2000. Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans. *J Nutr Biochem* 11:216–222.
- Okuda T. 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 66:2012–2031.
- Poi-lanston MS, Wrolstad RE. 1981. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavanol model system. *J Food Sci* 46:1218–1236.
- Ramalingam M, Kim SJ. 2012. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm* 119:891–910.
- Real Decreto 667/1983, de 2 de marzo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de zumos de frutas y de otros vegetales y de sus derivados. *Real Decreto*, BOE 77 of March 31, 1983; reference 1983/09198, p. 9196–9200 (in Spanish).
- Serra AT, Rocha J, Sepodes B, Matias AA, Feliciano RP, de Carvalho A, Bronze MR, et al. 2012. Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties – correlation of response with composition. *Food Chem* 135:2378–2386.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291–295.
- Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – a review. *Appetite* 51:456–467.
- Tedeschi E, Menegazzi M, Yao Y, Suzuki H, Forstermann U, Kleinert H. 2004. Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 α activation. *Mol Pharmacol* 65:111–120.
- Tsao R, Yang R, Xie S, Sockovie E, Khanizadeh S. 2005. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J Agric Food Chem* 53:4989–4995.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84.
- Vinson JA, Teufel K, Wu N. 2004. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *J Agric Food Chem* 52:3661–3665.
- Weinreb O, Mandel S, Amit T, Youdim MB. 2004. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Nutr Biochem* 15:506–516.

Artículo 2

Author's personal copy

Eur J Nutr
DOI 10.1007/s00394-015-1024-9

ORIGINAL CONTRIBUTION

Effects of an antioxidant beverage on biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's patients

Jose M. Rubio-Perez¹ · Maria D. Albaladejo² · Pilar Zafrilla¹ ·
Maria L. Vidal-Guevara³ · Juana M. Morillas-Ruiz¹Received: 19 May 2015 / Accepted: 17 August 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Purpose The purpose of the study was to test whether daily consumption of a beverage with high antioxidant power, combining extracts of green tea and apple over a period of 8 months, would affect blood and urinary concentrations of biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's patients.

Methods The study included 100 subjects, 48 of them were Alzheimer's patients, aged 76.5 ± 3.5 years, and 52 were control subjects, aged 79 ± 4 years, without dementia. Three blood and urine samples were taken from each participant, the first (T_i) before starting the antioxidant or placebo beverage intake, the second (T_m) 4 months after the antioxidant or placebo beverage intake and the third (T_f) 8 months after the antioxidant or placebo beverage intake, and concentrations of biomarkers of oxidative stress were measured on serum, lysed erythrocytes or urine by UV-Vis spectrophotometry or by competitive in vitro enzyme-linked immunosorbent assay, according to the parameter analyzed.

Results The administration of the antioxidant beverage to the Alzheimer's patients prevented the decrease in total

antioxidant status in the moderate phase of the disease ($T_i = 1.40 \pm 0.10$ mmol/L vs $T_f = 1.20 \pm 0.08$ mmol/L), increased values of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in initial (165 and 24 % respectively) and moderate phase (75 and 85 % respectively), and prevented the increase in protein carbonyls in moderate phase ($T_i = 0.17 \pm 0.07$ nmol/mg protein vs $T_f = 0.21 \pm 0.06$ nmol/mg protein), with a significant decrease in protein carbonyls since the fourth month of the intake in initial phase ($T_m = 0.21 \pm 0.06$ nmol/mg protein vs $T_f = 0.11 \pm 0.05$ nmol/mg protein).

Conclusion Our results suggest that antioxidant beverage could be used as a natural complementary therapy for alleviate or decrease the oxidative stress effects in the stages of Alzheimer's disease.

Keywords Alzheimer's disease · Oxidative stress · Antioxidant · Apple · Green tea · Beverage

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common progressive neurodegenerative disorders that predominantly affects the elderly populations and involves progressive cortical and hippocampal neuron loss and corresponding cognitive decline. As the world population grows and life expectancies increase, the number of AD patients is growing at an ever-increasing rate, since the most important contributing factor to AD is age. There were 35.6 million cases of AD in the world in 2010, and it is projected to almost double every 20 years, to 65.7 million in 2030 and 115.4 million in 2050 [1].

The histopathological hallmarks of AD are aggregation of amyloid β -peptide, the major constituent of

✉ Jose M. Rubio-Perez
jmrubio@ucam.edu

¹ Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, Facultad de Ciencias de la Salud, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos, s/n, 30107 Guadalupe, Murcia, Spain

² Servicio de Análisis Clínicos, Hospital General Universitario Santa Lucía, C/Mezquita, s/n, Paraje los Arcos, Santa Lucía, 30202 Cartagena, Spain

³ Departamento de Investigación y Desarrollo, Hero España, S.A., Avenida de Murcia, 1, 30820 Alcantarilla, Murcia, Spain

Author's personal copy

Eur J Nutr

extraneuronal senile plaques, which are generated from the cleavage of amyloid precursor protein, hyper-phosphorylation of Tau, which forms intracellular neurofibrillary tangles, neuronal and synaptic loss, proliferation of astrocytes and activation of microglia [2–4].

Oxidative stress is a condition in which there is an imbalance of reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species and antioxidant defenses [5, 6]. Increased oxidative stress is associated with normal aging, but it is further exacerbated in several neurodegenerative disorders including AD [7]. This pro-oxidative imbalance is associated with cellular damage, such as lipid peroxidation, DNA and RNA oxidation, protein oxidation and glycooxidation (both in the brain and in blood). Increased oxidative stress in AD brains is evidenced by increased levels of protein carbonyls and markers of oxidative damage to DNA and RNA, such as 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and 8-hydroxyguanosine [8–10]. Lipid peroxidation products such as malondialdehyde (MDA) and F_2 -isoprostanes are also elevated in brain and cerebrospinal fluid of patients with AD [11, 12]. Several studies have identified end products of biomolecular oxidation in the blood circulation of AD patients such as MDA, peroxynitrite, protein carbonyls and advanced glycation end products [13–15]. In addition, alterations in antioxidant defenses [16, 17] and reduction of antioxidant enzyme activity including superoxide dismutase (SOD) and catalase have been observed in AD patients [15, 18].

Therefore, the possibility of the therapeutic use of oral antioxidants seems to be rational, reducing the incidence and severity of disease. Current ROS-associated clinical research strategies are focused on the use of free radical scavengers, non-steroidal anti-inflammatory agents and neurotrophic factors or hormone (estrogen) replacement therapy. Another novel approach is the utilization of mainly bioactive phytochemicals in the non-vitamin category, i.e., polyphenols.

Polyphenolic compounds are found in plants, fruits, vegetables, oil, red wine, and tea. Based on their molecular structure, polyphenols are largely classified into flavonoids and non-flavonoids [19]. High consumption of foods rich in flavonoids such as vegetables and fruits has been positively correlated with cognitive performance in elderly people [20, 21]. In addition, dietary intake of vegetables or fruits may reduce decline rate of cognition or risk of dementia [22, 23]. Phenolic compounds derived from natural products like apple and green tea are widely studied for the treatment or prevention of cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases [24–28].

The aim of the present study was to test whether daily consumption of a beverage with high antioxidant power combining extracts of green tea and apple over a period of

8 months affects blood and urinary concentrations of biomarkers of oxidative stress in AD patients.

Subjects and methods

Subjects

The study included 100 subjects, 48 of them were patients (35 females and 13 males), aged 76.5 ± 3.5 years (mean \pm SD), with clinically probable AD diagnosed by the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke–Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria, and 52 were control subjects (40 females and 12 males), aged 79 ± 4 years, apparently healthy, asymptomatic and without dementia. All patients had a mini-mental state examination (MMSE) score <23 [29] and were selected from AD associations of the Region of Murcia, Spain. All subjects in the control group had a MMSE score >26 . For both groups of subjects, exclusion criteria were a positive history of cardiovascular or thyroid disease, chronic inflammatory disease (asthma and rheumatoid arthritis), hepatic or renal insufficiency, cancer and vascular dementia. Approval for the study was obtained from the Ethics Committee of Universidad Católica San Antonio de Murcia (Murcia, Spain), and all procedures on human subjects were performed according to the Declaration of Helsinki, 1975. Informed consent was obtained from subjects or their caregivers.

Antioxidant and placebo beverages

Antioxidant beverage (AB) was designed with high antioxidant power combining extracts of green tea (Suphenon 90LB) and apple (AF POMM 9050), rich in polyphenolic antioxidants and antioxidant vitamins and minerals. Suphenon 90LB is an extract of green tea leaves (*Camellia sinensis*) which is dried, and it is made of highly purified polyphenols rich in natural green tea catechins but lower caffeine. Suphenon 90LB was purchased from Taiyo Green Power Co., Ltd (Jiangsu, China). The composition of the extract was: total polyphenol, not less than 98 %; total catechins, not less than 80 %; epigallocatechin gallate (EGCG), not less than 40 %; caffeine, less than 1.0 %. AF POMM 9050 is an extract of apples rich in apple polyphenols, and it is made of fresh apples (*Pyrus malus*) strictly selected for their phytochemical contents and their functional properties. AF POMM 9050 was purchased from Diana Naturals (Antrain, France). The composition of the extract was: total polyphenols, not less than 80 % (expressed as catechin equivalent); phloridzin, not less than 5 %. The composition of the AB used in this study is shown in Table 1, based on a beverage model previously developed and reported

Author's personal copy

Eur J Nutr

Table 1 Ingredients used in the formulation of the antioxidant beverage and the placebo beverage (% of total) [30, 31]

Ingredients	Concentration
AB	
Water	84.29
Apple concentrate	10.16
Trehalose	4.80
Lemon concentrate	0.42
Green tea extract (Suphenon 90LB)	0.16
Apple extract (AF POMM 9050)	0.08
Vitamin C	0.05
Apple flavoring	0.01
Vitamin E	<0.01
Niacin	<0.01
Acesulfame K	<0.01
Vitamin B ₁₂	<0.01
Zinc	<0.01
Copper	<0.001
Folic acid	<0.001
Selenium	<0.001
PB	
Water	99.32
Apple flavoring	0.50
Tea flavoring	0.15
Citric acid	0.01
Caramel coloring	0.009
Acesulfame K	0.006
Sucralose	0.005

AB antioxidant beverage, PB placebo beverage

by Rubio-Perez et al. [30]. The AB was designed by the research team lead by Professor Juana Maria Morillas-Ruiz at Universidad Católica San Antonio de Murcia (Murcia, Spain) and by the Research & Development team at Hero Spain, S.A. (Alcantarilla, Murcia, Spain). The drink was also produced in these last facilities.

In addition, a placebo beverage (PB) was designed without antioxidant activity and with identical organoleptic properties as the experimental beverage. The ingredients used in formulation of the PB are shown in Table 1 [31].

Study design

We performed a double-blind study, with cross-sectional and longitudinal analyses of three subsets of subjects: control group (C) (52 subjects), AD patients in initial phase (ADI) (24 subjects) and AD patients in moderate phase (ADM) (24 subjects). Participants in each of the three subsets were randomly assigned to two groups of the same size: 50 % treated with AB or PB, respectively. One tetra brick (200 mL/person/day) of AB or PB was daily

administered for 8 months. Three blood and urine samples were taken from each participant, the first before starting the AB or PB intake (T_1), the second 4 months after the AB or PB intake (T_m) and the third 8 months after the AB or PB intake (T_f). Concentrations of biomarkers of oxidative stress were measured at T_1 , T_m and T_f .

Blood and urine sampling

Biochemical analyses were performed on serum, lysed erythrocytes or urine according to the parameter analyzed.

Fasting blood samples were collected from the antecubital vein and placed in silicone-, EDTA- and heparin-coated tubes. Blood samples in siliconized tubes were centrifuged to obtain serum at 10,500 rpm (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Scientific, Germany) for 10 min at 4 °C within 50 min of collection and stored at -80 °C until the assays were performed. To obtain the lysed erythrocytes, whole-blood samples were centrifuged at 3000 rpm (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Scientific, Germany) for 10 min, and then the plasma was aspirated off and erythrocytes were washed four times with 0.9 % NaCl solution, centrifuging for 10 min at 3000 rpm after each wash. The washed centrifuged erythrocytes were made up with cold redistilled water, mixed and left to stand for 10 min at 4 °C. The lysate was then diluted with diluent. Early morning urine spots were collected and kept at -80 °C until analysis.

Measurement of biomarkers of oxidative stress

Total antioxidant status

Total antioxidant status (TAS) in serum was measured by a colorimetric method (according to the protocol supplied by the kit NX2332 of RANDOX Laboratories Ltd., UK). In this assay ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] is incubated with peroxidase (metmyoglobin) and hydrogen peroxide to form the radical cation ABTS⁺. This radical has a relatively stable blue-green coloration, which is measured at 600 nm by a UV-Vis spectrophotometer (Cary 50 Bio, Varian, Melbourne, Australia). The presence of antioxidants in the sample results in a suppression of this coloration; such suppression is proportional to the concentration of antioxidants in the sample. Results are expressed as mmol/L. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 4.1 and 4.8 %, respectively.

Glutathione peroxidase

Glutathione peroxidase (GPx) in lysed erythrocytes was measured by an enzymatic method (according to the protocol supplied by the kit RS504 of RANDOX Laboratories Ltd., UK). This method is based on that of Paglia

Author's personal copy

Eur J Nutr

and Valentine [32]. Briefly, GPx catalyzes the oxidation of glutathione (GSH) by cumene hydroperoxide. In the presence of glutathione reductase and NADPH, the oxidized glutathione (GSSG) is immediately converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP⁺. The decrease in absorbance at 340 nm is measured by a UV-Vis spectrophotometer (Cary 50 Bio, Varian, Melbourne, Australia), and results are expressed as U/g Hb. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 3.9 and 4.4 %, respectively.

Superoxide dismutase

Levels of SOD in lysed erythrocytes were measured by a colorimetric method (according to the protocol supplied by the kit SD125 of RANDOX Laboratories Ltd., UK). The assay principle is based on the role that SOD plays in converting toxic superoxide radicals produced during oxidative energy processes to hydrogen peroxide and molecular oxygen. This method uses xanthine and xanthine oxidase to form superoxide radicals, which react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride to form a red colorant. The activity of SOD is determined by the degree of inhibition of this reaction and is measured at 505 nm by a UV-Vis spectrophotometer (Cary 50 Bio, Varian, Melbourne, Australia). Results are expressed as U/g Hb. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 4.7 and 5 %, respectively.

Glutathione reductase

Glutathione reductase (GR) in serum was measured by an UV method (according to the protocol supplied by the kit GR2368 of RANDOX Laboratories Ltd., UK). The method is based on the reduction in GSSG in the presence of NADPH, which is oxidized to NADP⁺. The decrease in absorbance at 340 nm is measured by a UV-Vis spectrophotometer (Cary 50 Bio, Varian, Melbourne, Australia), and results are expressed as U/L. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 4 and 4.7 %, respectively.

8-OHdG

Levels of 8-OHdG in urine were measured by a competitive in vitro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (according to the protocol supplied by the kit KOG-200S/E of JafCA, Japan). Briefly, the 8-OHdG monoclonal antibody reacts competitively with the 8-OHdG bound on the plate and the 8-OHdG in samples solution. The antibodies which are bound to the 8-OHdG in the sample are washed away from the antibodies that have bound to the 8-OHdG coated on the plate. An enzyme-labeled secondary

antibody, which is added to the plate, binds to the monoclonal antibody which is bound to the 8-OHdG coated on the plate. Unbound HRP-conjugated secondary antibody is removed by washing. Addition of the substrate solution results in the development of color in proportion to the amount of anti-8-OHdG antibody bound to the plate. The reaction is terminated by phosphoric acid. The absorbance is measured at 450 nm, and results are expressed as ng/mL. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 3.6 and 4.3 %, respectively.

Protein carbonyls

Protein carbonyls in serum were measured by ELISA (according to the protocol supplied by the kit PCKIT P081 of BioCell Corporation Ltd., New Zealand). Briefly, samples containing protein are reacted with dinitrophenylhydrazine (DNP); then the protein is non-specifically adsorbed to an ELISA plate. Unconjugated DNP and non-protein constituents are washed away. The adsorbed protein is probed with biotinylated anti-DNP antibody followed by streptavidin-linked horseradish peroxidase. Absorbances are related to a standard curve prepared for serum albumin containing increasing proportions of hypochlorous acid-oxidized protein that has been calibrated colorimetrically. The absorbance is measured at 450 nm. Results are expressed as nmol/mg protein. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 4.9 and 5.4 %, respectively.

Isoprostanes

Levels of 15-isoprostane F_{2t} (the best characterized isoprostane) in urine were measured by ELISA (according to the protocol supplied by the kit EA85 of Oxford Biomedical Research, USA). Briefly, urine samples are mixed with an enhancing reagent that essentially eliminates interferences due to non-specific binding, and the 15-isoprostane F_{2t} in the samples competes with 15-isoprostane F_{2t} conjugated to horseradish peroxidase (HRP) for binding to a polyclonal antibody specific for 15-isoprostane F_{2t} coated on the microplate. The HRP activity results in color development when substrate is added, with the intensity of the color proportional to the amount of 15-isoprostane F_{2t} bound and inversely proportional to the amount of unconjugated 15-isoprostane F_{2t} in the samples. The absorbance is measured at 450 nm, and results are expressed as pg/mg creatinine. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 4.8 and 5.1 %, respectively.

Oxidized LDL

Oxidized LDL (ox-LDL) in serum was measured by ELISA (according to the protocol supplied by the kit K7810 of

Author's personal copy

Eur J Nutr

Table 2 Descriptive statistics of the study population

	N	Gender		Type of beverage		Age
		Women	Men	PB	AB	Mean \pm SD
Control group	52	40	12	23	29	79 \pm 4
AD initial phase	24	17	7	12	12	76 \pm 4
AD moderate phase	24	18	6	11	13	77 \pm 3

PB placebo beverage, AB antioxidant beverage. Age (years)

Immundiagnostik AG, Germany). Briefly, standards, controls and samples containing human ox-LDL are added to wells of microplate coated with high affinity antibodies. During the first incubation period, the antibodies immobilized on the wall of the microtiter wells capture the antigen in the patient samples. After washing away the unbound components from samples, a peroxidase-conjugated antibody is added to each microtiter well. Tetramethylbenzidine is used as a substrate for peroxidase. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The intensity of the yellow color is directly proportional to the ox-LDL concentration of sample. The absorbance is measured at 450 nm, and results are expressed as ng/mL. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 3.9 and 4.2 %, respectively.

Autoantibodies against oxidized LDL

Levels of IgG autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein (anti-ox-LDL) in serum were measured by ELISA (according to the protocol supplied by the kit BI-20032 of Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Austria). Briefly, Cu²⁺-oxidized LDL is coated onto microtiter strips as an antigen on which autoantibodies, if present in the serum, specifically bind. After a washing step, a specific peroxidase-conjugated anti-human IgG antibody is added to detect the presence of bound autoantibodies. After removal of the unbound conjugate through washing, tetramethylbenzidine is added to the wells as a chromogenic substrate. The concentration of specific IgG in the sample is quantitated by an enzyme-catalyzed color change. The intensity of color developed is directly proportional to the concentration of antibodies in the sample. The absorbance is measured at 450 nm, and results are expressed as mU/mL. The within-run and between-run coefficients of variation were 4.2 and 5.1 %, respectively.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics 21 software (IBM Corp., USA). Data are presented as mean \pm SD. Data distribution was determined using the Kolmogorov–Smirnov test, and differences for variables

were tested with Mann–Whitney and Kruskal–Wallis test, for independent samples, or Friedman and Wilcoxon test for related samples. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Table 2 shows descriptive statistics about the AD patients and the control group. No differences appeared in age between the three groups. Basal analytical parameters measured in serum and BMI of subjects (controls and AD patients) are shown in Table 3. Table 4 shows levels of biomarkers measured in serum, lysed erythrocytes and urine of controls and AD patients at initial period of the study. Concentrations of biomarkers measured in serum and urine at initial, middle and final period of ingestion of PB and AB are shown in Table 5.

TAS

Before starting the intake of beverages, we observed that the values of TAS in ADM were significantly lower than the values in C ($p = 0.026$) (Mann–Whitney test); however, no differences were observed between ADI and C (Mann–Whitney test) (Table 4). After administration of AB, the levels of TAS in C were similar to the levels obtained with the intake of PB, showing no significant changes in the values of TAS at 8 months (Wilcoxon test). However, at 4 months of intake of AB, a significant increase (17 %) in the values of TAS in C was observed (Wilcoxon test) (Fig. 1). At 8 months of intake of PB, the control group showed no significant variations in the values of TAS (Wilcoxon test). However, at 4 months of intake of PB, a significant increase (13 %) in the values of TAS was observed (Wilcoxon test) (Fig. 1). In ADI, who drank PB, values of TAS decreased (15 %) at 8 months (Wilcoxon test). Similarly, with the intake of AB, the levels of TAS in ADI decreased (26 %) at 8 months (Wilcoxon test). At 8 months of intake of PB, ADM showed a significant decrease (17 %) in the values of TAS (Wilcoxon test) (Fig. 1). In contrast, with the intake of AB, there was no significant change in the levels of TAS at 4 and 8 months in that group (Wilcoxon test) (Fig. 1).

Author's personal copy

Eur J Nutr

Table 3 Basal analytical parameters measured in serum and BMI of subjects (controls and AD patients)

	Control group	AD initial phase	AD moderate phase
BMI (kg/m ²)	29.10 ± 0.82	30.12 ± 1.03	28.11 ± 0.91
Glucose (mg/dL)	95.71 ± 4.15	97.36 ± 5.40	90.67 ± 3.29
Urea (mg/dL)	38.50 ± 3.64	40.09 ± 5.12	40.75 ± 4.12
Creatinine (mg/dL)	0.87 ± 0.04	0.94 ± 0.05	1.03 ± 0.05
Uric acid (mg/dL)	4.91 ± 0.37	5.06 ± 0.58	4.20 ± 0.43
Total protein (g/dL)	7.50 ± 0.08	7.25 ± 0.11	7.12 ± 0.10
Total bilirubin (mg/dL)	0.65 ± 0.04	0.59 ± 0.06	0.63 ± 0.04
Total cholesterol (mg/dL)	210 ± 4	206 ± 8	200 ± 6
HDL-cholesterol (mg/dL)	64.29 ± 2.36	62.95 ± 2.63	53.75 ± 3.11
LDL cholesterol (mg/dL)	123 ± 6	122 ± 8	116 ± 8
Triglycerides (mg/dL)	117 ± 8	94 ± 7	130 ± 9
Aspartate transaminase (U/L)	22.69 ± 1.73	23.64 ± 1.79	25.54 ± 2.69
Alanine transaminase (U/L)	19.06 ± 2.73	22.45 ± 3.93	22.42 ± 4.93
Ferritin (ng/mL)	102 ± 12	87 ± 15	100 ± 14
C-reactive protein (mg/dL)	0.34 ± 0.04	2.62 ± 1.34	1.06 ± 0.47
Folate (ng/mL)	11.86 ± 0.48	10.49 ± 0.87	9.01 ± 0.65
Vitamin B ₁₂ (pg/mL)	598 ± 41	588 ± 77	634 ± 87
Homocysteine (μmol/L)	8.95 ± 0.39	10.51 ± 0.82	11.35 ± 0.69

Values are mean ± SD

BMI body mass index

Table 4 Levels of biomarkers measured in serum, lysed erythrocytes and urine of subjects (controls and AD patients) at initial period of the study

	Control group	AD initial phase	AD moderate phase
TAS (nmol/L)	1.57 ± 0.08	1.61 ± 0.11	1.44 ± 0.09 ^a
GPx (U/g Hb)	33.16 ± 2.24	23.77 ± 3.56 ^a	23.18 ± 2.98 ^a
SOD (U/g Hb)	598 ± 47	1092 ± 121 ^b	820 ± 87 ^b
GR (U/L)	53.76 ± 2.05	53.78 ± 3.57	51.49 ± 2.43
8-OHdG (ng/mL)	5.69 ± 0.98	5.11 ± 0.88	5.67 ± 1.13
Protein carbonyls (nmol/mg protein)	0.09 ± 0.03	0.14 ± 0.02 ^a	0.16 ± 0.03 ^a
Isoprostanes (pg/mg creatinine)	2030 ± 123	2066 ± 183	2387 ± 218
ox-LDL (ng/mL)	178 ± 21	354 ± 101	405 ± 84 ^a
Anti-ox-LDL (mU/mL)	289 ± 39	391 ± 103	373 ± 80

Values are mean ± SD

^a $p < 0.05$ versus control group^b $p < 0.05$ versus AD initial phase

Antioxidant enzymes

Regarding the enzyme GPx, before starting the administration of beverages to the subjects, we observed that the levels of that enzyme in ADM and ADI were significantly lower ($p = 0.002$; $p = 0.006$) than the levels in C (Mann-Whitney test) (Table 4). The control subjects who drank PB and the control subjects who drank AB showed higher values at 4 and 8 months of the study (PB: 60 and 35 %, respectively; AB: 62 and 49 %, respectively) (Wilcoxon test). The same trend was observed in ADI (Wilcoxon test) (Fig. 2). ADM who drank PB showed significant higher values of GPx at 4 and 8 months of the study (74 and

169 %, respectively) (Wilcoxon test). Similarly, ADM who drank AB showed higher values of GPx at 4 and 8 months of the study (74 and 75 %, respectively) (Wilcoxon test) (Fig. 2).

Before starting the intake of beverages, we observed that the values of SOD in ADM and ADI were significantly higher ($p = 0.016$; $p = 0.001$) than the values in C, and at the same time, the levels of SOD in ADI were higher ($p = 0.045$) than the levels in ADM (Mann-Whitney test) (Table 4). At 4 and 8 months of intake of PB, C showed no significant change in SOD values (Wilcoxon test) (Fig. 3). In contrast, in the control subjects who ingested AB, SOD values increased at 4 and 8 months (66 and 77 %,

Table 5 Levels of biomarkers measured in serum and urine of subjects (controls and AD patients) at initial, middle and final period of ingestion of antioxidant or placebo beverage

	Control group	AD initial phase	AD moderate phase
PB			
GR (U/L)			
T_i	55.65 ± 4.18	55.25 ± 5.67	53.57 ± 4.98
T_m	57.93 ± 4.43	55.00 ± 5.88	51.86 ± 3.72
T_f	65.61 ± 6.86	55.03 ± 7.48	55.62 ± 6.99
ox-LDL (ng/mL)			
T_i	180 ± 29	391 ± 152	494 ± 145
T_m	145 ± 45	408 ± 136	240 ± 81
T_f	504 ± 277	460 ± 199	315 ± 115
Anti-ox-LDL (mU/mL)			
T_i	309 ± 60	351 ± 121	334 ± 114
T_m	350 ± 82	410 ± 114	383 ± 128
T_f	335 ± 80	382 ± 117	444 ± 175
8-OHdG (ng/mL)			
T_i	5.28 ± 1.78	4.61 ± 1.54	5.78 ± 1.96
T_m	4.67 ± 1.56	5.16 ± 1.91	4.33 ± 0.79
T_f	2.99 ± 0.88	6.18 ± 2.11	3.39 ± 0.89
Isoprostanes (pg/mg creatinine)			
T_i	2036 ± 177	2050 ± 236	2493 ± 365
T_m	2103 ± 226	2365 ± 295	2165 ± 305
T_f	2086 ± 178	3267 ± 355	3379 ± 593
AB			
GR (U/L)			
T_i	52.26 ± 1.82	52.68 ± 4.91	49.72 ± 2.21
T_m	54.25 ± 1.91	58.49 ± 5.67	51.82 ± 4.09
T_f	63.44 ± 3.78	60.09 ± 6.79	47.09 ± 2.04
ox-LDL (ng/mL)			
T_i	176 ± 29	316 ± 129	325 ± 49
T_m	238 ± 46	252 ± 81	378 ± 82
T_f	258 ± 50	254 ± 85	470 ± 83
Anti-ox-LDL (mU/mL)			
T_i	274 ± 43	430 ± 155	398 ± 93
T_m	316 ± 47	380 ± 131	387 ± 154
T_f	313 ± 72	403 ± 142	561 ± 167
8-OHdG (ng/mL)			
T_i	5.99 ± 1.52	5.57 ± 1.61	5.56 ± 1.86
T_m	6.23 ± 1.68	8.37 ± 3.93	2.71 ± 1.61
T_f	3.96 ± 0.97	7.56 ± 2.48	3.15 ± 1.24
Isoprostanes (pg/mg creatinine)			
T_i	2027 ± 167	2081 ± 282	2281 ± 233
T_m	1915 ± 197	2570 ± 685	1909 ± 684
T_f	1876 ± 181	2957 ± 767	1646 ± 546

Values are mean ± SD

T_i : initial period of ingestion of beverage, T_m : middle period of ingestion of beverage, T_f : final period of ingestion of beverage

PB placebo beverage, AB antioxidant beverage

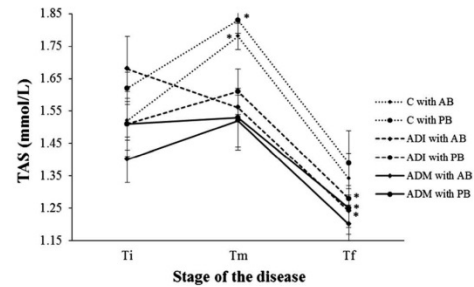


Fig. 1 Changes in concentrations of total antioxidant status in the control group (C), AD patients in initial phase (ADI) and AD patients in moderate phase (ADM) with antioxidant beverage (AB) and placebo beverage (PB). T_i : initial period of ingestion of beverage, T_m : middle period of ingestion of beverage, T_f : final period of ingestion of beverage. * $p < 0.05$ versus T_i

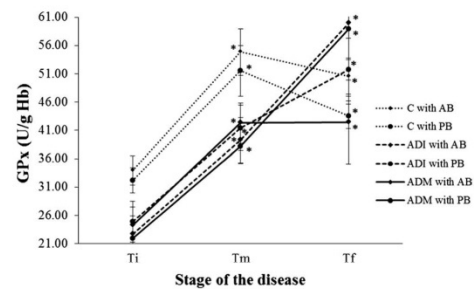


Fig. 2 Changes in concentrations of glutathione peroxidase in the control group (C), AD patients in initial phase (ADI) and AD patients in moderate phase (ADM) with antioxidant beverage (AB) and placebo beverage (PB). T_i : initial period of ingestion of beverage, T_m : middle period of ingestion of beverage, T_f : final period of ingestion of beverage. * $p < 0.05$ versus T_i

respectively) (Wilcoxon test). ADI who drank PB showed no change in SOD levels at 4 and 8 months of intake (Wilcoxon test) (Fig. 3). However, ADI who drank AB, at 8 months showed a significant increase (24 %) in the values of SOD (Wilcoxon test). ADM who received PB showed increased levels (58 %) of SOD at 8 months of the study (Wilcoxon test). In contrast, AB had no capacity to increase SOD values in ADM after 8 months of intake of the beverage, but we observed a pronounced increase (85 %) in the levels of SOD at 4 months of intake of the beverage ($p = 0.025$) (Wilcoxon test) (Fig. 3).

Finally, there were no significant differences in the values of GR at initial period of the study (T_i) in any of the

Author's personal copy

Eur J Nutr

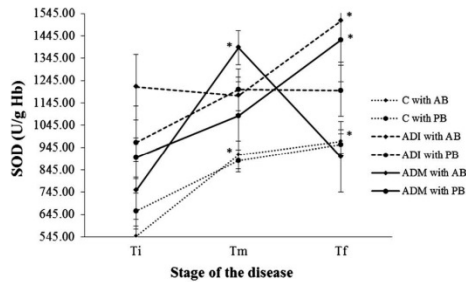


Fig. 3 Changes in concentrations of superoxide dismutase in the control group (C), AD patients in initial phase (ADI) and AD patients in moderate phase (ADM) with antioxidant beverage (AB) and placebo beverage (PB). T_i : initial period of ingestion of beverage, T_m : middle period of ingestion of beverage, T_f : final period of ingestion of beverage. * $p < 0.05$ versus T_i

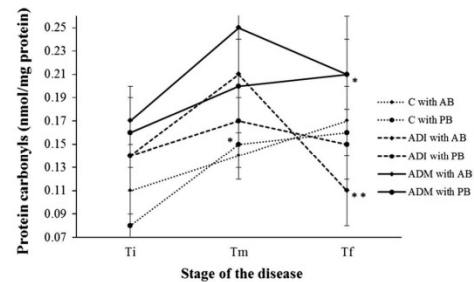


Fig. 4 Changes in concentrations of protein carbonyls in the control group (C), AD patients in initial phase (ADI) and AD patients in moderate phase (ADM) with antioxidant beverage (AB) and placebo beverage (PB). T_i : initial period of ingestion of beverage, T_m : middle period of ingestion of beverage, T_f : final period of ingestion of beverage. * $p < 0.05$ versus T_i ; ** $p < 0.05$ versus T_m

three groups of subjects (Mann–Whitney test) (Table 4), and GR values were not affected by the intake of AB in Alzheimer's patients (Wilcoxon test).

DNA oxidation

Regarding the values of 8-OHdG, we observed similar values of that oxidation product in the three groups studied before starting the intake of beverages (Mann–Whitney test) (Table 4), and no changes were observed with the intake of AB or PB in C, ADI and ADM during the study period (Wilcoxon test).

Protein oxidation

In T_i , before starting the administration of beverages to the subjects, we observed that the levels of protein carbonyls in ADM and ADI were significantly higher ($p = 0.012$; $p = 0.001$) than the levels in C (Mann–Whitney test) (Table 4). In C, with the intake of PB, the protein carbonyls increased (87 %) at 4 months and these high values remained constant at 8 months (Wilcoxon test) (Fig. 4). With the intake of AB, the values of protein carbonyls remained constant from T_i to T_f in the control subjects (Wilcoxon test). In ADI, with the administration of PB, the levels of protein carbonyls did not change at 8 months of study (Wilcoxon test) (Fig. 4). However, with the AB, a significant decrease (48 %) in protein carbonyls was observed from the fourth month of the intake of the beverage (Wilcoxon test). In ADM, with the administration of PB, the protein carbonyls levels increased significantly at 8 months (31 %) (Wilcoxon test). However, with the intake of AB, values of protein carbonyls remained constant (Wilcoxon test) (Fig. 4).

Lipid oxidation

Regarding the values of isoprostanes in urine, we observed similar values of that oxidation product in the three groups studied before starting the intake of beverages (Mann–Whitney test) (Table 4), and no changes were observed with the intake of AB or PB in either group during 8 months of study (Wilcoxon test).

Similarly, levels of ox-LDL in serum did not change during the study period in any of the three groups, with the administration of AB or PB (Wilcoxon test), but we observed that in T_i , the values of ox-LDL in ADM were significantly higher than the values in C ($p = 0.003$) (Mann–Whitney test) (Table 4).

Finally, we observed similar levels of anti-ox-LDL in the three groups studied before starting the administration of beverages (Mann–Whitney test) (Table 4), and no changes were observed in the levels of anti-ox-LDL with the intake of AB or PB in C, ADI and ADM (Wilcoxon test).

Discussion

In the present study, we tested whether daily consumption of a beverage with high antioxidant power combining extracts of green tea and apple, and antioxidant vitamins and minerals, over a period of 8 months would affect to biomarkers of oxidative stress in AD patients, studying changes on TAS, antioxidant enzymes, DNA oxidation, protein oxidation and lipid oxidation.

Because the measurement of different antioxidant molecules separately is not practical and their antioxidant effects are additive, the total antioxidant capacity of a sample is measured, and this is called TAS [33]. In our study, TAS

values were examined to assess the total effect of antioxidants in serum. We observed that in C, the intake of both beverages showed similar performance during the study period (similar values of TAS in T_1 regarding T_0). In ADI, we observed that administration of both beverages reduced the levels of TAS at the end of study (T_1 vs T_0). The same trend was observed in ADM with the intake of PB. However, AB intake prevented the decrease in TAS in ADM, during the 8 months of study, suggesting that AB increased levels of hydrophilic antioxidants such as uric acid or ascorbic acid, which are responsible for 7–58 and 3–27 %, respectively, of the aqueous blood compartment [34], and/or levels of lipophilic antioxidants (vitamin E, vitamin A, β -carotene and α -carotene). In fact, AB contained, in addition to green tea and apple extracts, vitamin C and E in its formulation. The use of a single antioxidant is, from a biochemical point of view, likely not to work due to the fact that vitamin E needs vitamin C or other soluble electron acceptors for a better systemic removal of ROS and for antioxidant regeneration. Morris et al. [35] examined the relationship between use of vitamin E and vitamin C and incident AD in a prospective study of 633 persons 65 years and older. After an average follow-up period of 4.3 years, 91 of the sample participants were diagnosed with AD, but none of the 27 vitamin E supplement users had AD and none of the 23 vitamin C supplement users had AD. Regarding phenolic compounds, Xu et al. [36] observed that the administration of green tea polyphenols increased levels of TAS in rats with chronic cerebral hypoperfusion. EGCG, the major green tea polyphenol, was reported to possess antioxidant properties superior to that of ascorbic acid and vitamin E [37]. Thus, the antioxidant action of EGCG in scavenging the tocopheroxyl radical would have resulted in the ascorbic acid level augmentation in EGCG-treated aged rat brain [38]. Co-antioxidants such as catechins, flavanols present in green tea and apples, which scavenge the α -tocopherol radical and export it in the aqueous phase, could reduce α -tocopherol consumption [39]. In line with this report, EGCG supplementation to aged rats has led to the maintenance of α -tocopherol levels. Moreover, EGCG's potential to augment the ascorbic acid and GSH status would have played a vital role in sparing the tocopherol levels in the brain.

In summary, it was observed that TAS values, after 4 months of intake of AB, increased in the control group and remained constants in the ADI and ADM groups. On the other hand, after administration of AB during 8 months, no changes were observed in the levels of TAS in C and ADM, but these levels decreased in ADI.

Regarding the enzyme GPx, we observed that in C, the intake of AB and PB showed similar results during the study period, increasing values of GPx at 4 and 8 months of intake. This similar trend with the two beverages suggests

that the AB did not affect on GPx values of the control population. The same trend was observed in ADI, so the AB did not have effect in ADI on their levels of GPx. The ADM who drank AB showed higher values of GPx only at 4 months of the study. These results suggest the capacity of the AB to attenuate the degree of oxidative stress in ADM, after 4 months of daily intake of the AB. Thereafter, GPx activity did not increase (there was no significant difference between 4 and 8 months) (as happened with PB) since the oxidative stress did not increase in the presence of the antioxidants present in the AB. Wullner et al. [40] showed that EGCG supplementation increased the GPx levels by up-regulating the levels of GSH, one of the most abundant intracellular thiols in the central nervous system which acts as the substrate for GPx. In a report by Vayalil et al. [41], EGCG up-regulated the levels of GPx and other antioxidant enzymes in UV-induced oxidative damage in mice model. In other report, Kishido et al. [42] described the decreased activity of GPx as an important contributor of brain dysfunction in aging SAMP10 mice, and they have illustrated that the intake of green tea catechins protected against the decline in GPx activity and age-related oxidative damage in the brain.

It would not be expected that after 8 months of the study, the control group would show an increase in oxidative stress, and so it is not logical that the increased levels of SOD respond to increased oxidative stress, but the contribution of AB in selenium, zinc, and copper could result in an increased synthesis of SOD in the control subjects at 4 and 8 months of intake of the AB. EGCG was found to elevate the activity of two major antioxidant enzymes, SOD and catalase in mice striatum [43]. Srividhya et al. [38] demonstrated that the administration of EGCG to aged rats resulted in the increase in the enzymatic antioxidant status. SOD, GPx and GR showed a significant increment in their activities by 22, 35 and 19 %, respectively, after EGCG treatment in comparison with the aged rats that did not receive the treatment. Chan et al. [44] reported that catechin increased SOD mRNA levels in cultured rat brain astrocytes.

Glutathione redox status is determined by two enzymes GR and G6PDH. GR helps to regenerate GSH from GSSG at the expense of NADPH which is in turn produced by G6PDH. In our study, we observed that GR values were not affected by the intake of AB in Alzheimer's patients. These results are in disagreement with the results obtained in a study where EGCG supplementation improved the activity of GR, thereby maintaining the redox status of GSH [38], maybe because the enzyme variations are best visualized in brain tissue than in blood. GSH replenishes α -tocopherol and ascorbic acid, other important antioxidants in the cell.

In summary, regarding the antioxidant enzymes, after 4 months of intake of AB, values of GPx and SOD

Author's personal copy

Eur J Nutr

increased in C and ADM, and values of GR remained constants in all the groups. In ADI, levels of GPx increased and levels of SOD remained constant at 4 months of intake of AB. On the other hand, after administration of AB during 8 months, values of GPx and SOD increased in C and ADI, and no changes were observed in the levels of GR in all the groups. In ADM, levels of GPx increased and levels of SOD remained constant at 8 months of intake of AB.

Because 8-OHdG is known to represent one of the major forms of oxidative DNA damage, many researchers have measured 8-OHdG in tissues or urine as a marker of oxidative stress [45], with urinary 8-OHdG thought to reflect the level of oxidative DNA damage in the body as a whole [46] and ratios of urinary 8-OHdG to urinary creatinine (8-OHdG/creatinine) as a good biological indicator of DNA oxidation [47]. According to the results obtained in our study, AB did not influence urinary levels of oxidized DNA in either group. In a randomized controlled trial among adults who regularly smoke, daily drinking of four cups of green tea for 4 months was associated with a statistically significant decrease in urinary excretion of 8-OHdG [48]. Similar results obtained Klaunig et al. [49] with the administration of six cups of green tea a day for 7 days to smokers.

Regarding the protein oxidation, with the intake of AB, the values of protein carbonyls remained constant from T_1 to T_7 in ADM and C, so the AB stopped the protein oxidation in the moderate phase of the disease and in the control group, with a significant decrease in protein carbonyls from the fourth month of the intake in ADI, so that the AB avoided that protein carbonyls increased at 4 months and during the period of intake. Catechin supplementation proved to be beneficial in counteracting the protein oxidation (carbonyl) levels in tamoxifen-induced oxidative stress in mice [50]. In fact, flavonoids have been shown to inhibit the oxidation of tissue proteins *in vitro* and *in vivo* [51]. Also, it has been found that flavonoids can inhibit the glycation and autoxidation of glucose which may initiate and propagate protein modification [52]. Thus, EGCG's role in preventing the oxidative damage to proteins is obvious by the restoration of protein carbonyl levels and antioxidant enzyme status.

When we studied the effect of AB on lipid oxidation, we observed that the values of isoprostanes in urine did not change during 8 months of intake in either group. Similarly, with the intake of the AB no changes were observed in the values of ox-LDL respect to the intake of the PB in either group and in any of the three sampling times. Levels of anti-ox-LDL in serum did not change during the study period in any of the three groups (controls, mild and moderate). Therefore, AB is not effective against lipid oxidation. In contrast, other authors have reported that vitamin E, an ingredient of our AB, is able to lower lipid peroxidation and β -amyloid deposition [53]. It also rescues neuronal

damage and β -amyloid deposition in the brain by reducing isoprostane levels [54, 55]. In a double-blind, placebo-controlled clinical trial, Galasko et al. [56] observed that a treatment for 16 weeks with vitamin E plus vitamin C plus α -lipoic acid to subjects with mild-to-moderate Alzheimer disease, did result in a significant decrease in cerebrospinal fluid levels of F_2 -isoprostanes, consistent with antioxidant effects in the brain. In addition, metal-chelating activity of tea polyphenols could play a significant role in shielding the cells from Fenton's reaction and Haber-Weiss reactions which otherwise could aggravate the peroxidative damage to lipid components of the cell [57].

In summary, regarding the oxidation products, no changes were observed in either group after 4 and 8 months of intake of AB, the values of 8-OHdG, isoprostanes, ox-LDL and anti-ox-LDL being constant during the study period. However, it was observed that values of protein carbonyls decreased from the fourth month of the intake of AB in ADI. In C and ADM, levels of protein carbonyls remained constants after administration of AB during 4 and 8 months.

Conclusion

Before starting the intake of beverages, the values of GPx in ADI were lower than in C. However, the levels of SOD and protein carbonyls in ADI were higher than in C. Regarding ADM, the values of TAS and GPx were lower than in C, and the levels of SOD, protein carbonyls and ox-LDL were higher than in C.

The administration of the AB to the Alzheimer's patients prevented the decrease in TAS in ADM, increased values of GPx in ADI and ADM, increased levels of SOD in ADI and ADM, and prevented the increase in the values of protein carbonyls in ADM, with a significant decrease in protein carbonyls from the fourth month of the intake in ADI.

Our results suggest that AB could be used as a natural complementary therapy for alleviate or improve symptoms of the oxidative stress in the stages of AD.

Others studies are needed to see whether the improvement in oxidative stress of Alzheimer's patients correlates with an improvement in their cognitive status.

Acknowledgments Thanks to the Seneca Foundation (Regional Agency of Science and Technology of the Region of Murcia, Spain) for Jose Miguel Rubio-Perez fellowship (12667/FPI/09). This project was supported by Directorate General of Investigation, Ministry of Education and Culture of the Autonomous Community of the Region of Murcia, Spain (PMAFI-PI-01/IC/05). Thanks to Hero Spain, S.A., for making possible this scientific collaboration with Universidad Católica San Antonio de Murcia and to its Research & Development team, for the help in the design and development of the experimental beverage. We are grateful to all the volunteers in the project, to all employees of Alzheimer's Association of Murcia, Molina de Segura.

Author's personal copy

Eur J Nutr

Alcantarilla, Lorca, Yecla, Caravaca, Cieza and Puerto Lumbreras. Also, we want to thank all the relatives and caregivers of our Alzheimer's patients. Without them, without their effort and their great collaboration, this project would not have been possible.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Ethical statements Approval for the study was obtained from the Ethics Committee of Universidad Católica San Antonio de Murcia (Spain), and all procedures on human subjects were performed according to the Declaration of Helsinki, 1964. Informed consent was obtained from subjects or their caregivers.

References

- World Health Organization, Alzheimer's Disease International (2012) Dementia: a public health priority. Switzerland, Geneva
- Feng Y, Wang X (2012) Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2012:472932. doi:10.1155/2012/472932
- Mao P, Reddy PH (2011) Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 1812 11:1359–1370. doi:10.1016/j.bbadis.2011.08.005
- Walsh DM, Selkoe DJ (2007) A beta oligomers—a decade of discovery. *J Neurochem* 101(5):1172–1184
- Dasuri K, Zhang L, Keller JN (2013) Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med* 62:170–185. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.016
- Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82(2):291–295
- Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 345(1–2):91–104. doi:10.1007/s11010-010-0563-x
- Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR (1998) Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 71(5):2034–2040
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 36(5):747–751. doi:10.1002/ana.410360510
- Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA (1999) RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19(6):1959–1964
- Lovell MA, Ehnmann WD, Butler SM, Markesbery WR (1995) Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45(8):1594–1601
- Praticò D, Sung S (2004) Lipid peroxidation and oxidative imbalance: early functional events in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 6(2):171–175
- Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, Luchsinger JA, Ogunniyi A, Perry EK, Potocnik F, Prince M, Stewart R, Wimo A, Zhang ZX, Antuono P (2008) Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol* 7(9):812–826. doi:10.1016/S1474-4422(08)70169-8
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(7):631–641
- Zafrilla P, Mulero J, Xandri JM, Santo E, Caravaca G, Morillas JM (2006) Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. *Curr Med Chem* 13(9):1075–1083
- Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberloff K, Tsai JS, Strafaci JA, Freedman ML (1998) Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 150(1):40–44
- Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W, Stefanescu C (2010) Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 469(1):6–10. doi:10.1016/j.neulet.2009.11.033
- Omar RA, Chyan YJ, Andorn AC, Poeggeler B, Robakis NK, Pappolla MA (1999) Increased expression but reduced activity of antioxidant enzymes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 1(3):139–145
- Ramassamy C (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* 545(1):51–64
- Nurk E, Refsum H, Drevon CA, Tell GS, Nygaard HA, Engedal K, Smith AD (2010) Cognitive performance among the elderly in relation to the intake of plant foods. The Hordaland Health Study. *Br J Nutr* 104(8):1190–1201. doi:10.1017/S0007114510001807
- Polidori MC, Praticò D, Mangialasche F, Mariani E, Aust O, Anlasik T, Mang N, Pientka L, Stahl W, Sies H, Mecocci P, Nelles G (2009) High fruit and vegetable intake is positively correlated with antioxidant status and cognitive performance in healthy subjects. *J Alzheimers Dis* 17(4):921–927. doi:10.3233/JAD-2009-1114
- Hughes TF, Andel R, Small BJ, Borenstein AR, Mortimer JA, Wolk A, Johansson B, Fratiglioni L, Pedersen NL, Gatz M (2010) Midlife fruit and vegetable consumption and risk of dementia in later life in Swedish twins. *Am J Geriatr Psychiatry* 18(5):413–420. doi:10.1097/JGP.0b013e3181c65250
- Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Wilson RS (2006) Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change. *Neurology* 67(8):1370–1376
- Bhardwaj P, Khanna D (2013) Green tea catechins: defensive role in cardiovascular disorders. *Chin J Nat Med* 11(4):345–353. doi:10.1016/s1875-5364(13)60051-5
- Lecumberri E, Dupertuis YM, Miralbell R, Pichard C (2013) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy. *Clin Nutr* 32(6):894–903. doi:10.1016/j.clnu.2013.03.008
- Lim HJ, Shim SB, Jee SW, Lee SH, Lim CJ, Hong JT, Sheen YY, Hwang DY (2013) Green tea catechin leads to global improvement among Alzheimer's disease-related phenotypes in NSE/hAPP-C105 Tg mice. *J Nutr Biochem* 24(7):1302–1313. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.10.005
- McCann MJ, Gill CI, O'Brien G, Rao JR, McRoberts WC, Hughes P, McEntee R, Rowland IR (2007) Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food Chem Toxicol* 45(7):1224–1230
- Serra AT, Rocha J, Sepodes B, Matias AA, Feliciano RP, de Carvalho A, Bronze MR, Duarte CM, Figueira ME (2012) Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties—correlation of response with composition. *Food Chem* 135(4):2378–2386. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.067
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34(7):939–944
- Rubio-Perez JM, Vidal-Guevara ML, Zafrilla P, Morillas-Ruiz JM (2014) A new antioxidant beverage produced with green tea and apple. *Int J Food Sci Nutr* 65(5):552–557. doi:10.3109/09637486.2014.893282

31. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM (2013) Serum cytokine profile in Alzheimer's disease patients after ingestion of an antioxidant beverage. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12(8):1233–1241
32. Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70(1):158–169
33. Rice-Evans C, Miller NJ (1994) Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 234:279–293
34. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ (1987) The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924(3):408–419
35. Morris MC, Beckett LA, Scherr PA, Hebert LE, Bennett DA, Field TS, Evans DA (1998) Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12(3):121–126
36. Xu Y, Zhang JJ, Xiong L, Zhang L, Sun D, Liu H (2010) Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. *J Nutr Biochem* 21(8):741–748. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.05.002
37. Zhao BL, Li XJ, He RG, Cheng SJ, Xin WJ (1989) Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys* 14(2):175–185
38. Sridividya R, Jyothilakshmi V, Arulmathi K, Senthilkumar V, Kalaiselvi P (2008) Attenuation of senescence-induced oxidative exacerbations in aged rat brain by (–)-epigallocatechin-3-gallate. *Int J Dev Neurosci* 26(2):217–223. doi:10.1016/j.ijdevneu.2007.12.003
39. Raneva VG, Shimasaki H (2005) Green tea catechins decrease lipid peroxidation in plasma and organs of C57BL/6J mice fed atherogenic diet. *J Oleo Sci* 54(12):641–648. doi:10.5650/jos.54.641
40. Wullner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, Heneka M, Löschmann P, Schulz JB, Weller M, Klockgether T (1999) Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res* 826(1):53–62
41. Vayalil PK, Elmets CA, Katiyar SK (2003) Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis* 24(5):927–936
42. Kishido T, Unno K, Yoshida H, Choba D, Fukutomi R, Asahina S, Iguchi K, Oku N, Hoshino M (2007) Decline in glutathione peroxidase activity is a reason for brain senescence: consumption of green tea catechin prevents the decline in its activity and protein oxidative damage in ageing mouse brain. *BioGerontology* 8(4):423–430. doi:10.1007/s10522-007-9085-7
43. Levites Y, Weinreb O, Maor G, Youdim MB, Mandel S (2001) Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem* 78(5):1073–1082
44. Chan P, Cheng JT, Tsai JC, Lien GS, Chen FC, Kao PF, Liu JC, Chen YJ, Hsieh MH (2002) Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. *Neurosci Lett* 328(3):281–284
45. Kasai H (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 387(3):147–163
46. Loft S, Poulsen HE (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med (Berl)* 74(6):297–312
47. Erhola M, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Uchida K, Osawa T, Nieminen MM, Alho H, Kellokumpu-Lehtinen P (1997) Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment. *FEBS Lett* 409(2):287–291
48. Hakim IA, Harris RB, Brown S, Chow HH, Wiseman S, Agarwal S, Talbot W (2003) Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *J Nutr* 133(10):3303S–3309S
49. Klauing JE, Xu Y, Han C, Kamendulis LM, Chen J, Heiser C, Gordon MS, Mohler ER 3rd (1999) The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers. *Proc Soc Exp Biol Med* 220(4):249–254
50. Parvez S, Tabassum H, Rehman H, Banerjee BD, Athar M, Raisuddin S (2006) Catechin prevents tamoxifen-induced oxidative stress and biochemical perturbations in mice. *Toxicology* 225(2–3):109–118
51. Nagasawa T, Hayashi H, Fujimaki N, Nishizawa N, Kitts DD (2000) Induction of oxidatively modified proteins in skeletal muscle by electrical stimulation and its suppression by dietary supplementation of (–)-epigallocatechin gallate. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(5):1004–1010. doi:10.1271/bbb.64.1004
52. Manuel y Keenoy B, Vertommen J, De Leeuw I (1999) The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in Type 1 diabetic patients. *Diabetes Nutr Metab* 12(4):256–263
53. Sung S, Yao Y, Uryu K, Yang H, Lee VM, Trojanowski JQ, Praticò D (2004) Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces Abeta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 18(2):323–325
54. Praticò D, Clark CM, Liun F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ (2002) Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59(6):972–976
55. Roberts LJ 2nd, Oates JA, Linton MF, Fazio S, Meador BP, Gross MD, Shyr Y, Morrow JD (2007) The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. *Free Radic Biol Med* 43(10):1388–1393
56. Galasko DR, Peskind E, Clark CM, Quinn JF, Ringman JM, Jicha GA, Cotman C, Cottrell B, Montine TJ, Thomas RG, Aisen P (2012) Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. *Arch Neurol* 69(7):836–841
57. Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2(4):152–159. doi:10.1016/S1360-1385(97)01018-2

Artículo 3Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, 2013, 12, 1233-1241

1233

Serum Cytokine Profile in Alzheimer's Disease Patients After Ingestion of an Antioxidant Beverage

J.M. Rubio-Perez* and J.M. Morillas-Ruiz

Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, Facultad de Ciencias de la Salud, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos, s/n, Guadalupe 30107, Murcia, España

Abstract: The major neuropathologic hallmarks in Alzheimer's disease (AD) consist of neuronal cell loss in selected brain regions, as well as deposition of extracellular senile plaques and intracellular neurofibrillary tangles. Further to these lesions, neuroinflammation is a feature of AD pathology and is thought to contribute to the neurodegeneration. Inflammation clearly occurs in pathologically vulnerable regions of the AD brain, with increased expression of acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines. The healthy properties of green tea and apple are linked closely to their content of phenolic compounds. Although the beneficial effects of these compounds are clear, relatively few studies have focused on their anti-inflammatory effects *in vivo*. The aim of the present study was to test whether daily consumption of a beverage with high antioxidant power combining extracts of green tea and apple over a period of eight months would affect biomarkers of inflammation in AD patients in initial phase, moderate phase and a control group. Administration of the antioxidant beverage (AB) to the three groups did not produce a significant change in serum levels of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10. In contrast, AB decreased serum levels of the pro-inflammatory cytokines interleukin-2 (AD moderate phase vs control group at eight months), interferon- γ (control group vs AD moderate phase and AD initial phase vs placebo beverage at four months) and tumor necrosis factor- α (AD initial phase vs AD moderate phase at four months). AB was more effective against inflammation in the early period of AD, and could be used as a natural complementary therapy to alleviate or improve symptoms of inflammation in early stages of AD.

Keywords: Alzheimer's disease, antioxidant, apple, beverage, cytokines, green tea, inflammation.

1. INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative brain disorder characterized by progressive loss of cognitive and intellectual functions, especially memory, that destroy the ability to learn, to reason, to communicate, and to carry out daily activities [1]. AD is the most common cause of sporadic dementia, involving about 13 million people worldwide. It is also the most common cause of cognitive decline in the elderly, as it affects nearly 10% of the over-65 population and, if combined with other diseases, represents more than 50% of all demented patients.

The major neuropathologic hallmarks of AD consist of neuronal cell loss in selected brain regions, as well as deposition of extracellular senile plaques and intracellular neurofibrillary tangles [2]. Further to these lesions, neuroinflammation is a feature of AD pathology and is thought to contribute to the ensuing neurodegeneration. Inflammation clearly occurs in pathologically vulnerable regions of the AD brain, with increased expression of acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines which are hardly evident in the normal brain [3-6]. Microglia, astrocytes, and neurons are responsible for the inflammatory reaction.

Although the precise molecular and cellular relationship between AD and inflammation remains unclear, interleukins (IL) and various other cytokines might induce activation of signaling pathways leading to further inflammation and neuronal cell injury [7]. Levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interferon- α (IFN- α), type B IL-8 receptor, and the receptor for colony stimulating factor-1 are reportedly increased in AD brain tissue [8]. A number of interactions between cytokines and components of the AD senile plaques have been reported, suggesting that a vicious circle might be generated [8].

Based on the compelling evidence that inflammatory processes are involved in the pathogenesis of AD, research has looked into the use of anti-inflammatory drugs as a treatment option for AD. Drugs such as the non-steroidal anti-inflammatory drugs and glucocorticoid steroids have been studied to determine if they offer any benefits to AD patients. Unfortunately, clinical trials of non-steroidal anti-inflammatory drugs in AD patients have not been very fruitful [9] and epidemiological data for the use of glucocorticoid steroids in the AD brain show either a very weak benefit [10] or even a possible harmful effect [11]. Because of these limitations, there is a growing interest to use natural products as an adjunct therapy to prevent the development of neuroinflammation.

Green tea is a drink made from the steamed and dried leaves of the *Camellia sinensis* plant, a shrub native to Asia. It is a beverage that is widely consumed in China, Japan, and

*Address correspondence to this author at the Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, Facultad de Ciencias de la Salud, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos, s/n, Guadalupe 30107, Murcia, España; Tel: +34968278638; Fax: +34968278197; E-mail: jmrubio@ucam.edu

other Asian nations and is becoming more popular in Western countries. Green tea has attracted attention for its health benefits, particularly with respect to its potential for preventing and treating cancer, cardiovascular, inflammatory and neurodegenerative diseases in humans [12, 13]. The healthy properties of green tea are linked closely to its content of flavonoids, mainly flavan-3-ols. The principal flavan-3-ols found in green tea are epicatechin (6.4%), epicatechin-3-gallate (13.6%), epigallocatechin (19%), and epigallocatechin-3-gallate (EGCG; 59%), and account for 30-40% of its dry weight. *In vitro* and *in vivo* studies have suggested that flavonoids, particularly EGCG, have anti-inflammatory [14-17], neuroprotective [18] and antioxidant effects [15, 19].

Apple (*Malus domestica Borkh*) is a frequently consumed fruit and one of the most cultivated tree fruits in the world. Apple consumption has been attributed to the prevention and protection from several chronic and degenerative diseases in humans, mainly because of its antioxidants that prevent free-radical damage [20, 21]. The phenolic compounds in apples are responsible for most of the fruit's antioxidant activity [22, 23]. Although the beneficial effects of these compounds are clear, relatively few studies have focused on their anti-inflammatory effects and molecular mechanism(s) of action *in vivo*. Limited scientific evidence regarding the effectiveness of these compounds *in vivo* and their mechanism of action has prevented their incorporation into the mainstream of medical care. Apple procyanidins, called apple condensed tannins (ACT), are oligomeric structures made of catechin and epicatechin. ACT has attracted increasing attention in the fields of nutrition and medicine for their potential health benefit [24-27]. For example, ACT has an inhibitory effect on histamine release from both a mast cell line and rat peritoneal mast cells [28, 29] and ACT inhibits food-allergen-induced oral sensitization in mice [30]. These results suggest that ACT has anti-inflammatory and immunomodulatory effects *in vivo*.

The aim of the present study was to test whether daily consumption of a beverage with high antioxidant power combining extracts of green tea and apple over a period of eight months would affect biomarkers of inflammation in AD patients.

2. PATIENTS AND METHODS

2.1. Subjects

One hundred subjects were included in this study: 48 patients (35 females and 13 males), aged 76.5±3.5 years (mean±SD) with clinically diagnosed probable AD by National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria were included. All patients had a Mini-Mental State Examination (MMSE) score <23 [31] and were selected from AD associations of the region of Murcia, Spain. Subjects underwent a medical history, clinical examination and MMSE. Furthermore, in this study, 52 control subjects (40 females and 12 males), aged 79±4 years, apparently healthy, asymptomatic, without dementia were included. All subjects in the control group had a MMSE score > 26. For both groups of subjects, exclusion criteria were a positive history of cardiovascular or thyroid

disease, chronic inflammatory disease (asthma and rheumatoid arthritis), hepatic or renal insufficiency, cancer, and vascular dementia. Approval for the study was obtained from the Ethics Committee of Catholic University of San Antonio and all procedures on human subjects were performed according to the Declaration of Helsinki, 1975. Informed consent was obtained from subjects or caregivers.

2.2. Study Design

A double-blind study was performed, with cross-sectional and longitudinal analysis of three subsets of subjects (control group, AD patients in initial phase and AD patients in moderate phase).

For this study, a beverage (AB) was designed with high antioxidant power combining extracts of green tea and apple (rich in polyphenolic antioxidants), and antioxidant vitamins and minerals. The beverage's antioxidant activity, organoleptic properties and stability status during storage were evaluated. The ingredients used in formulation of the AB were: 84.29% water, 10.16% apple concentrate, 4.80% trehalose, 0.42% lemon concentrate, 0.16% green tea extract, 0.08% apple extract, 0.05% vitamin C, 0.01% apple flavouring, <0.01% vitamin E, <0.01% niacin, < 0.01% acesulfame K, <0.01% vitamin B₁₂, <0.01% zinc, <0.001% copper, <0.001% folic acid and <0.001% selenium. In parallel, a placebo beverage (PB) was designed without antioxidant activity. The ingredients used in formulation of the PB were: 99.32% water, 0.50% apple flavouring, 0.15% tea flavouring, 0.01% citric acid, 0.009% caramel coloring, 0.006% acesulfame K and 0.005% sucralose.

Participants in each of the three groups were randomly assigned to two groups of the same size: 50% treated with AB or PB, respectively. One tetra brik (200 mL/person/day) of AB or PB was daily administered for 8 months. Three blood samples were taken from each participant, the first before starting the AB or PB intake (Ti), the second at 4 months after the AB or PB intake (Tm) and the third at 8 months after the AB or PB intake (Tf). Fasting serum concentrations of cytokines were measured at Ti, Tm and Tf.

2.3. Blood Analysis

Fasting blood samples were obtained from the antecubital vein into siliconized tubes of 9 mL. After venipuncture, blood samples were kept on ice and then centrifuged at 10,500 rpm (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Scientific, Germany) for 10 min at 4 °C. The mean time between venipuncture and centrifugation was 50 min (interquartile range: 30-70 min). Serum samples were stored at -80°C until analyzed.

Cytokine levels were measured by a sandwich chemiluminescent immunoassay in an Evidence Investigator™ Cytokine & Growth Factors High-Sensitivity Array (according to the protocol supplied by the kit of RANDOX Laboratories Ltd., Northern Ireland). The Evidence Investigator™ Biochip Array technology was used to perform simultaneous quantitative detection of multiple analytes from a single patient sample. The core technology is the Biochip, a solid-state device containing an array of discrete test regions of immobilized antibodies specific to

Serum Cytokine Profile in Alzheimer's Disease Patients

CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, 2013, Vol 12, No. 8 1235

different cytokines and growth factors. Increased levels of cytokine in a specimen will lead to increased binding of antibody labeled with horseradish peroxidase, and thus an increase in the chemiluminescence signal emitted. The light signal generated from each of the test regions on the biochip is detected using digital imaging technology and compared to that from a stored calibration curve. The concentration of analyte present in the sample is calculated from the calibration curve.

The cytokines measured were: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). The assay ranges and sensitivity values for different cytokines were: 0-225 pg/mL and 0.19 pg/mL for IL-1 α , 0-112.5 pg/mL and 0.26 pg/mL for IL-1 β , 0-1200 pg/mL and 0.90 pg/mL for IL-2, 0-1500 pg/mL and 2.12 pg/mL for IL-4, 0-400 pg/mL and 0.12 pg/mL for IL-6, 0-1450 pg/mL and 0.36 pg/mL for IL-8, 0-450 pg/mL and 0.37 pg/mL for IL-10, 0-600 pg/mL and 0.44 pg/mL for IFN- γ , 0-600 pg/mL and 0.59 pg/mL for TNF- α and 0-500 pg/mL and 0.66 pg/mL for MCP-1.

2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with SPSS 17.0 software (LEAD Technologies, Inc., Chicago, Illinois, USA). Data are presented as mean \pm SEM (or SD). Data distribution was determined using the Kolmogorov-Smirnov test and differences for variables were tested with Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test, for independent samples, or Friedman and Wilcoxon test for related samples. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. RESULTS

Descriptive statistics about the AD patients and control group are shown in Table 1. No differences appeared in age between the three groups. Concentrations of pro-inflammatory cytokines in serum at initial, middle and final period of ingestion of PB are shown in Table 2. Table 3 shows levels of pro-inflammatory cytokines in serum at Ti, Tm and Tf while the AB was being taken; concentrations of the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 in serum at initial, middle at the same time points are shown in Table 4. An increase was observed in the concentration of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β in the advanced stage of the disease (moderate phase) (0.89 \pm 0.30 pg/mL) with respect to the initial phase (0.45 \pm 0.07 pg/mL) ($p = 0.046$). No significant differences were found in IL-1 β concentration between the control group and the AD patients in the initial phase. A decrease was observed in the concentrations of the

pro-inflammatory cytokines IL-8 (15.65 \pm 5.79 pg/mL) ($p = 0.011$) and MCP-1 (208.90 \pm 33.32 pg/mL) ($p = 0.005$) in the moderate phase of the disease compared to the initial phase (IL-8: 30.94 \pm 8.20 pg/mL; MCP-1: 342.81 \pm 28.17 pg/mL). No significant differences were found in anti-inflammatory cytokine levels during disease progression.

Eight months after taking the AB (Tf-Ti), levels of the pro-inflammatory cytokine IL-2 were significantly lower (-0.30 \pm 0.15 pg/mL, $p = 0.033$) in the group of patients with moderate AD, compared to the control group, which showed a trend to increase (1.14 \pm 0.45 pg/mL) (Fig. 1). The AB induced, at four months of intake (Tm-Ti), a significant decrease ($p = 0.028$) in serum levels of the pro-inflammatory cytokine IFN- γ in AD patients in the initial phase (-1.70 \pm 0.92 pg/mL) compared to the AD patient group in initial phase taking the PB (2.17 \pm 1.32 pg/mL) (Fig. 2). Variations in levels of IFN- γ four months after intake of the AB (Tm-Ti), were significantly increased (1.04 \pm 0.11 pg/mL, $p = 0.048$) in the moderate phase AD patient group, compared to the control group, which tended to decrease (-0.82 \pm 0.72 pg/mL) (Fig. 2).

After administration of the AB for four months (Tm-Ti) to AD patients in the initial and moderate phases, levels of the pro-inflammatory cytokine TNF- α tended to decrease in the initial phase AD group (-0.66 \pm 0.41 pg/mL) but increase in the moderate phase AD patient group (1.52 \pm 0.62 pg/mL) (Fig. 3). These values were significantly different ($p = 0.014$) between both groups.

The pro-inflammatory cytokine IL-1 α increased significantly at eight months of the study (Tf-Ti) in moderate phase AD taking the PB (0.03 \pm 0.07 pg/mL) ($p = 0.043$). This increase was not observed in the initial phase of the disease (-0.03 \pm 0.04 pg/mL) nor in the control group (-0.04 \pm 0.05 pg/mL). Intake of the AB did not produce a significant modification in IL-1 α levels in any of the 3 trial groups.

4. DISCUSSION

In this study, an increase was observed in the concentration of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β in the moderate phase of the AD patient group compared to the initial phase at Ti. In contrast, the study of Sala *et al.* [32] showed that although cytokine release in mild and moderate AD patients was similar to control values, the positive correlations observed in AD patients between IL-1 β and MMSE scores suggest that cytokine production progressively decreases according to disease severity. However, a study of 145 AD patients and 51 controls

Table 1. Descriptive Statistics of the Study Population

	N	Gender		Type of Beverage		Age
		Women	Men	PB	AB	Mean \pm SD
Control group	52	40	12	23	29	79 \pm 4
AD initial phase	24	17	7	12	12	76 \pm 4
AD moderate phase	24	18	6	11	13	77 \pm 3

PB: placebo beverage, AB: antioxidant beverage. Age (years).

Table 2. Levels of Major Pro-Inflammatory Cytokines in Serum of Subjects (Controls and AD Patients) at Initial, Middle and Final Period of Ingestion of Placebo Beverage

		Control Group	AD Initial Phase	AD Moderate Phase
IL-2	Ti	1.11±0.15	0.87±0.07	1.69±0.75
	Tm	1.68±0.81	1.06±0.11	1.40±0.34
	Tf	0.79±0.18	1.25±0.34	1.11±0.19
	Tm-Ti	0.57±0.78	0.19±0.14	-0.29±0.47
	Tf-Ti	-0.32±0.21	0.38±0.33	-0.59±0.58
IL-6	Ti	3.01±0.83	3.59±1.15	3.92±1.07
	Tm	2.45±0.39	5.30±3.25	7.25±2.50
	Tf	3.57±0.68	3.29±0.65	4.30±0.65
	Tm-Ti	-0.55±0.79	1.70±2.11	3.33±2.62
	Tf-Ti	0.56±0.61	-0.31±0.97	0.38±0.92
IL-8	Ti	30.51±18.04	18.10±3.38	20.70±9.63
	Tm	42.44±13.94	132.05±54.22	82.24±47.15
	Tf	30.01±11.28	18.69±4.30	8.75±1.39
	Tm-Ti	11.93±27.17	113.94±55.87	61.54±49.56
	Tf-Ti	-0.50±11.70	0.59±4.78	-11.95±8.36
IFN-γ	Ti	2.59±0.72	2.85±0.57	3.10±1.36
	Tm	2.37±0.79	5.02±1.75	2.65±0.73
	Tf	3.56±0.94	2.74±0.36	2.15±0.38
	Tm-Ti	-0.22±0.44	2.17±1.32 ¹	-0.45±1.60
	Tf-Ti	0.98±0.79	-0.11±0.43	-0.96±1.37
TNF-α	Ti	3.50±0.42	3.03±0.15	4.23±0.71
	Tm	2.96±0.41	2.83±0.28	3.94±0.46
	Tf	3.40±0.49	2.86±0.14	3.45±0.31
	Tm-Ti	-0.55±0.41	-0.20±0.18	-0.28±0.49
	Tf-Ti	-0.10±0.43	-0.17±0.25	-0.78±0.60
IL-1α	Ti	0.14±0.04	0.16±0.03	0.20±0.04
	Tm	0.13±0.04	0.13±0.02	0.29±0.08
	Tf	0.10±0.02	0.13±0.03	0.23±0.07
	Tm-Ti	-0.01±0.05	-0.04±0.03	0.09±0.08
	Tf-Ti	-0.04±0.05	-0.03±0.04	0.03±0.07 ^{bc}
IL-1β	Ti	0.39±0.06	0.39±0.04	0.99±0.50
	Tm	0.56±0.19	0.54±0.04	0.72±0.25
	Tf	0.39±0.05	0.52±0.16	0.60±0.18
	Tm-Ti	0.17±0.17	0.15±0.03	-0.28±0.26
	Tf-Ti	0.00±0.06	0.13±0.13	-0.39±0.33
MCP-1	Ti	350.86±97.83	407.06±33.31	211.83±51.90
	Tm	275.64±58.79	443.90±81.12	194.76±28.72
	Tf	256.69±45.75	372.53±37.71	195.15±22.36
	Tm-Ti	-75.23±44.98	36.84±51.90	-17.07±58.47
	Tf-Ti	-94.17±63.97	-34.52±37.80	-16.68±51.12

Ti: initial period of ingestion of beverage, Tm: middle period of ingestion of beverage, Tf: final period of ingestion of beverage. The values are means±SEM, expressed as pg/mL.

^ap<0.05 vs AB.^bp<0.05 vs control group.^cp<0.05 vs AD initial phase.

Table 3. Levels of Major Pro-Inflammatory Cytokines in Serum of Subjects (Controls and AD Patients) at Initial, Middle and Final Period of Ingestion of Antioxidant Beverage

		Control Group	AD Initial Phase	AD Moderate Phase
IL-2	Ti	1.70±0.62	1.12±0.15	1.34±0.41
	Tm	2.16±0.87	1.06±0.12	1.08±0.16
	Tf	2.84±0.75	1.61±0.84	1.19±0.59
	Tm-Ti	0.46±1.19	-0.11±0.13	0.12±0.24
	Tf-Ti	1.14±0.45	0.49±0.88	-0.30±0.15 ^b
IL-6	Ti	3.55±1.60	6.31±2.98	1.78±0.53
	Tm	3.73±1.43	5.53±1.86	2.19±0.73
	Tf	1.58±0.36	6.29±1.78	9.25±5.78
	Tm-Ti	0.18±1.09	-1.27±1.97	0.84±0.34
	Tf-Ti	-1.97±1.80	-0.02±2.55	7.64±5.16
IL-8	Ti	31.46±16.66	43.77±14.78	8.58±2.14
	Tm	100.29±33.40	126.15±19.90	111.27±56.22
	Tf	59.14±42.81	64.63±26.30	13.19±5.60
	Tm-Ti	68.83±37.92	75.44±12.59	101.54±56.06
	Tf-Ti	27.68±49.29	20.85±26.32	4.02±4.89
IFN- γ	Ti	2.60±0.77	3.25±0.99	1.23±0.28
	Tm	1.78±0.41	1.79±0.38	2.09±0.30
	Tf	3.08±1.22	2.25±0.60	2.61±0.64
	Tm-Ti	-0.82±0.72	-1.70±0.92 ^a	1.04±0.11 ^b
	Tf-Ti	0.48±1.21	-1.00±0.75	1.19±0.76
TNF- α	Ti	3.14±0.75	3.38±0.55	2.30±0.21
	Tm	3.15±0.16	2.69±0.33	3.74±0.57
	Tf	2.52±0.47	3.16±0.34	2.92±0.53
	Tm-Ti	0.02±0.70	-0.66±0.41	1.52±0.62 ^c
	Tf-Ti	-0.62±0.80	-0.22±0.25	0.74±0.68
IL-1 α	Ti	0.16±0.05	0.09±0.02	0.11±0.04
	Tm	0.16±0.04	0.09±0.02	0.10±0.02
	Tf	0.19±0.04	0.12±0.04	0.06±0.02
	Tm-Ti	0.00±0.07	0.00±0.01	-0.03±0.04
	Tf-Ti	0.04±0.05	0.04±0.02	-0.05±0.03
IL-1 β	Ti	0.66±0.31	0.51±0.14	0.75±0.24
	Tm	0.92±0.24	0.55±0.12	0.55±0.11
	Tf	1.60±0.36	0.79±0.37	0.44±0.16
	Tm-Ti	0.26±0.44	-0.01±0.08	0.00±0.10
	Tf-Ti	0.94±0.45	0.27±0.29	-0.25±0.17
MCP-1	Ti	267.53±64.50	278.57±27.05	204.79±40.80
	Tm	235.40±33.83	277.93±27.72	222.67±53.21
	Tf	209.17±56.44	252.31±13.65	219.01±60.90
	Tm-Ti	-32.13±72.46	2.41±19.38	-1.08±13.98
	Tf-Ti	-58.36±47.51	-26.26±32.01	-8.37±20.46

Ti: initial period of ingestion of beverage, Tm: middle period of ingestion of beverage, Tf: final period of ingestion of beverage. The values are mean±SEM, expressed as pg/mL.

^ap<0.05 vs PB.^bp<0.05 vs control group.^cp<0.05 vs AD initial phase.

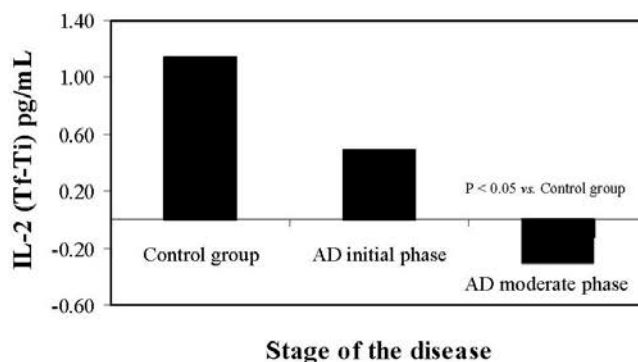
Table 4. Levels of Major Anti-Inflammatory Cytokines in Serum of Subjects (Controls and AD Patients) at Initial, Middle and Final Period of Ingestion of Antioxidant or Placebo Beverage

			Control Group	AD Initial Phase	AD Moderate Phase
PB	IL-4	Ti	1.20±0.20	1.47±0.26	1.32±0.12
		Tm	1.27±0.23	1.54±0.08	1.34±0.15
		Tf	1.11±0.14	1.39±0.17	1.28±0.16
		Tm-Ti	0.07±0.20	0.06±0.27	0.02±0.09
		Tf-Ti	-0.09±0.15	-0.09±0.13	-0.04±0.10
	IL-10	Ti	0.57±0.17	0.61±0.05	1.24±0.52
		Tm	0.65±0.13	1.00±0.52	0.94±0.22
		Tf	0.69±0.17	0.64±0.08	1.12±0.42
		Tm-Ti	0.08±0.08	0.39±0.51	-0.29±0.39
		Tf-Ti	0.12±0.05	0.03±0.06	-0.12±0.11
AB	IL-4	Ti	1.47±0.24	1.34±0.14	0.93±0.20
		Tm	1.70±0.29	1.39±0.16	0.88±0.20
		Tf	1.46±0.24	1.74±0.41	1.18±0.26
		Tm-Ti	0.22±0.26	0.03±0.13	0.05±0.17
		Tf-Ti	-0.02±0.22	0.40±0.28	0.23±0.19
	IL-10	Ti	0.55±0.10	0.76±0.17	0.43±0.09
		Tm	0.90±0.17	0.56±0.03	0.41±0.06
		Tf	0.62±0.11	0.85±0.18	0.48±0.08
		Tm-Ti	0.35±0.19	-0.17±0.22	0.03±0.08
		Tf-Ti	0.07±0.02	0.08±0.19	0.05±0.08

PB: placebo beverage, AB: antioxidant beverage, Ti: initial period of ingestion of beverage, Tm: middle period of ingestion of beverage, Tf: final period of ingestion of beverage. The values are mean±SEM, expressed as pg/mL.

showed higher serum concentrations of IL-1 β in AD patients than in controls [33]. This discrepancy could be explained by the low serum levels of IL-1 β found in normal controls, in addition to the low sensitivity of the ELISA used. No significant differences were found in IL-1 β concentration between the control group and the initial phase AD patients, in agreement with Sala *et al.* [32].

By studying the cytokines IL-8 and MCP-1 in the moderate phase of the disease compared to the initial phase, a decrease was observed in the concentrations of both pro-inflammatory cytokines in AD patients in moderate phase. By contrast, Bonotis *et al.* [34] did not find significant differences in IL-8 levels between controls and patients or between AD patients with mild-to-moderate and severe

**Fig. (1).** Changes in serum IL-2 concentrations in subjects with antioxidant beverage.

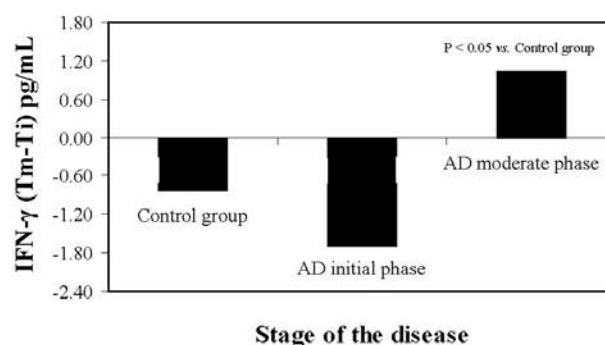


Fig. (2). Changes in serum IFN- γ concentrations in subjects with antioxidant beverage.

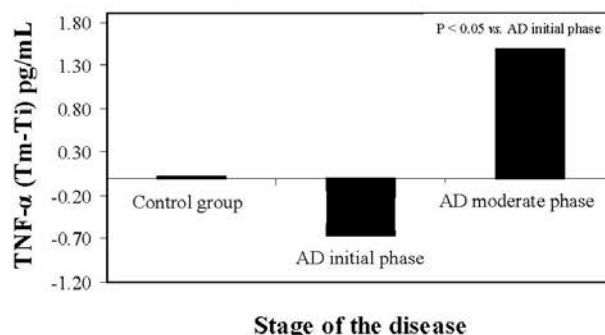


Fig. (3). Changes in serum TNF- α concentrations in subjects with antioxidant beverage.

disease. On the other hand, no significant differences were found in anti-inflammatory cytokine levels as a function of disease progression. These results are in agreement with studies showing unaltered IL-10 levels in the serum of AD patients [35, 36]. However, it has been reported that patients with dementia have higher mean levels of IL-10 [37, 38].

Regarding the pro-inflammatory cytokine IL-2, after the intake of the AB (Tf-Ti) a trend to increase was observed in levels of this cytokine in the control group, while in the moderate phase of AD, the trend was to decrease. These results suggest that the AB is effective to reduce this pro-inflammatory cytokine in the later, but not initial stages of the disease. Flavonoids like genistein can inhibit IL-2 synthesis, with no toxic effects on T cells, as demonstrated by Atluru *et al.* [39].

At four months of intake of the AB, a decrease was observed in the levels of the pro-inflammatory cytokine IFN- γ , in AD patients in initial phase compared to those who drank the PB. These results suggest that the AB is effective in reducing this important pro-inflammatory cytokine in the initial stage of AD only. Verbeek *et al.* [40] demonstrated that the flavones luteolin and apigenin inhibited antigen-specific proliferation and IFN- γ production by murine and human autoimmune T cells *in vitro*. In that study, IFN- γ

production was completely blocked by 35 mM luteolin and reduced by 65% with apigenin. Similar effects were found for the flavonole quercetin, which completely blocked IFN- γ production. The variations in levels of IFN- γ four months after intake of the AB (Tm-Ti) were different, with a trend to increase in the moderate phase of the disease, but trending to decrease in the control group. These data indicate that the AB cannot reduce this pro-inflammatory cytokine in the moderate phase of AD.

AD patients in initial phase who took the AB showed a trend to decrease in the serum level of the pro-inflammatory cytokine TNF- α , whereas in the moderate phase AD patient group the trend was to increase. These data suggest that the AB can reduce short-term inflammation in the early stages of the disease. Hong Byun *et al.* [41] demonstrated that EGCG, a bioactive polyphenol in green tea, attenuated lipopolysaccharide-mediated inflammation by suppressing TNF- α and IL-1 β expression in macrophages, leading to down-regulation of inflammatory responses.

At eight months of the study (Tf-Ti), the pro-inflammatory cytokine IL-1 α increased significantly in moderate phase AD patients who drank the PB. This increase was not observed in either the initial phase AD group or the control group, suggesting inflammation is more pronounced

1240 *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2013, Vol. 12, No. 8

Rubio-Perez, and Morillas-Ruiz

in the moderate phase of the disease, compared to the initial phase, as described by others [8].

5. CONCLUSION

Administration of the AB to AD patients significantly decreased serum levels of several pro-inflammatory cytokines, while such changes were not observed for the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10. Our results suggest that the AB, rich in polyphenolic antioxidants, is more effective against inflammation in the early period of AD, and could be used as a natural complementary therapy to alleviate or improve symptoms of inflammation in early stages of AD.

LIST OF ABBREVIATIONS

AB	= Antioxidant beverage
ACT	= Apple condensed tannins
AD	= Alzheimer's disease
EGCG	= Epigallocatechin-3-gallate
IFN- α	= Interferon- α
IL	= Interleukins
MCP-1	= Monocyte chemoattractant protein-1
MMSE	= Mini-mental state examination
PB	= Placebo beverage
TNF- α	= Tumor necrosis factor- α

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

Jose Miguel Rubio-Perez was a recipient of a fellowship from the Seneca Foundation (Regional Agency of Science and Technology of the Region of Murcia, Spain). This project was supported by Directorate General of Investigation, Ministry of Education and Culture of the Autonomous Community of the Region of Murcia, Spain. We are grateful to all the volunteers in the project, to all employees of Alzheimer's Association of Murcia, Molina de Segura, Alcantarilla, Lorca, Yecla, Caravaca, Cieza and Puerto Lumbreras. Also, we wish to thank all the relatives and caregivers of our AD patients without whose effort and collaboration this project would not have been possible.

REFERENCES

- [1] Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.*, 2009, 5, 234-270.
- [2] Hardy, J.; Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, 297, 353-356.
- [3] Griffin, W. S.; Mraz, R. E. Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, 72, 233-238.
- [4] Cacquevel, M.; Lebourrier, N.; Chéenne, S.; Vivien, D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets*, 2004, 5, 529-534.
- [5] Mraz, R. E.; Griffin, W. S. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol. Aging*, 2005, 26, 349-354.
- [6] Finch, C. E.; Morgan, T. E. Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: a position paper. *Curr. Alzheimer Res.*, 2007, 4, 185-189.
- [7] Weisman, D.; Hakimian, E.; Ho, G. J. Interleukins, inflammation, and mechanisms of Alzheimer's disease. *Vitam. Horm.*, 2006, 74, 505-530.
- [8] McGeer, E.; McGeer, P. Inflammatory cytokines in the CNS. *CNS Drugs*, 1997, 7, 214-287.
- [9] Aisen, P. S. The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 2002, 1, 279-284.
- [10] Hüll, M.; Lieb, K.; Fiebich, B. L. Pathways of inflammatory activation in Alzheimer's disease: potential targets for disease modifying drugs. *Curr. Med. Chem.*, 2002, 9, 83-88.
- [11] Harris-White, M. E.; Chu, T.; Miller, S. A.; Simmons, M.; Teter, B.; Nash, D.; Cole, G. M.; Frautschy, S. A. Estrogen (E2) and glucocorticoid (Gc) effects on microglia and A beta clearance *in vitro* and *in vivo*. *Neurochem. Int.*, 2001, 39, 435-448.
- [12] Hollman, P. C.; Feskens, E. J.; Katan, M. B. Tea flavonols in cardiovascular disease and cancer epidemiology. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1999, 220, 198-202.
- [13] Tedeschi, E.; Menegazzi, M.; Yao, Y.; Suzuki, H.; Förstermann, U.; Kleinert, H. Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 α activation. *Mol. Pharmacol.*, 2004, 65, 111-120.
- [14] Danesi, F.; Philpott, M.; Huebner, C.; Bordoni, A.; Ferguson, L. R. Food-derived bioactives as potential regulators of the IL-12/IL-23 pathway implicated in inflammatory bowel diseases. *Mutat. Res.*, 2010, 690, 139-144.
- [15] Tipoe, G. L.; Leung, T. M.; Hung, M. W.; Fung, M. L. Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets*, 2007, 7, 135-44.
- [16] Wheeler, D. S.; Catravas, J. D.; Odums, K.; Denenberg, A.; Malhotra, V.; Wong, H.R. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 beta-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *J. Nutr.*, 2004, 134, 1039-1044.
- [17] Yang, F.; de Villiers, W. J.; McClain, C. J.; Varelek, G. W. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J. Nutr.*, 1998, 128, 2334-2340.
- [18] Smith, A.; Giunta, B.; Bickford, P. C.; Fountain, M.; Tan, J.; Shytle, R. D. Nanolipidic particles improve the bioavailability and alpha-secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *Int. J. Pharm.*, 2010, 389, 207-212.
- [19] Cabrera, C.; Giménez, R.; López, M. C. Determination of tea components with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 4427-4435.
- [20] Bouayed, J.; Bohn, T. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2010, 3, 228-237.
- [21] Boyer, J.; Liu, R. H. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J.*, 2004, 3, 5.
- [22] Lee, K. W.; Kim, Y. J.; Kim, D.; Lee, H. J.; Lee, C. Y. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 6516-6520.
- [23] Tsao, R.; Yang, R.; Xie, S.; Sockovic, E.; Khanizadeh, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 4989-4995.
- [24] Lotito, S. B.; Actis-Goretti, L.; Renart, M. L.; Caligiuri, M.; Rein, D.; Schmitz, H.H.; Steinberg, F. M.; Keen, C. L.; Fraga, C.G. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 276, 945-951.
- [25] Mackenzie, G. G.; Carrasquedo, F.; Delfino, J. M.; Keen, C. L.; Fraga, C. G.; Oteiza, P. I. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J.*, 2004, 18, 167-169.
- [26] Vidal, R.; Hernandez-Vallejo, S.; Pauquai, T.; Texier, O.; Rousset, M.; Chambaz, J.; Demignot, S.; Lacorte, J. M. Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes. *J. Lipid. Res.*, 2005, 46, 258-268.

Serum Cytokine Profile in Alzheimer's Disease Patients

CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, 2013, Vol 12, No. 8 1241

- [27] Del Bas, J. M.; Fernández-Larrea, J.; Blay, M.; Ardevol, A.; Salvadó, M. J.; Arola, L.; Bladé, C. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J.*, **2005**, *19*, 479-481.
- [28] Kanda, T.; Akiyama, H.; Yanagida, A.; Tanabe, M.; Goda, Y.; Toyoda, M.; Teshima, R.; Saito, Y. Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, *62*, 1284-1289.
- [29] Akiyama, H.; Sakushima, J.; Taniuchi, S.; Kanda, T.; Yanagida, A.; Kojima, T.; Teshima, R.; Kobayashi, Y.; Goda, Y.; Toyoda, M. Antiallergic effect of apple polyphenols on the allergic model mouse. *Biol. Pharm. Bull.*, **2000**, *23*, 1370-1373.
- [30] Akiyama, H.; Sato, Y.; Watanabe, T.; Nagaoka, M. H.; Yoshioka, Y.; Shoji, T.; Kanda, T.; Yamada, K.; Totsuka, M.; Teshima, R.; Sawada, J.; Goda, Y.; Maitani, T. Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models. *FEBS Lett.*, **2005**, *579*, 4485-4491.
- [31] McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D.; Stadlan, E. M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, **1984**, *34*, 939-944.
- [32] Sala, G.; Galimberti, G.; Canevari, C.; Raggi, M. E.; Isella, V.; Facheris, M.; Appollonio, I.; Ferrarese, C. Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: correlation with disease severity. *Neurobiol. Aging*, **2003**, *24*, 909-914.
- [33] Licastro, F.; Pedrini, S.; Caputo, L.; Annoni, G.; Davis, L. J.; Ferri, C.; Casadei, V.; Grimaldi, L.M. Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *J. Neuroimmunol.*, **2000**, *103*, 97-102.
- [34] Bonotis, K.; Krikki, E.; Holeva, V.; Aggouridaki, C.; Costa, V.; Baloyannis, S. Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *J. Neuroimmunol.*, **2008**, *193*, 183-187.
- [35] Singh, V. K.; Guthikonda, P. Circulating cytokines in Alzheimer's disease. *J. Psychiatr. Res.*, **1997**, *31*, 657-660.
- [36] Rota, E.; Bellone, G.; Rocca, P.; Bergamasco, B.; Emanuelli, G.; Ferrero, P. Increased intrathecal TGF-beta1, but not IL-12, IFN-gamma and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients. *Neurol. Sci.*, **2006**, *27*, 33-39.
- [37] Angelopoulos, P.; Agouridaki, H.; Vaiopoulos, H.; Siskou, E.; Doutsou, K.; Costa, V.; Baloyiannis, S. I. Cytokines in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int. J. Neurosci.*, **2008**, *118*, 1659-1672.
- [38] Baranowska-Bik, A.; Bik, W.; Wolinska-Witort, E.; Martynska, L.; Chmielowska, M.; Barcikowska, M.; Baranowska, B. Plasma beta amyloid and cytokine profile in women with Alzheimer's disease. *Neuro. Endocrinol. Lett.*, **2008**, *29*, 75-79.
- [39] Athuru, S.; Athuru, D. Evidence that genistein, a protein-tyrosine kinase inhibitor, inhibits CD28 monoclonal-antibody-stimulated human T cell proliferation. *Transplantation*, **1991**, *51*, 448-50.
- [40] Verbeek, R.; Plomp, A. C.; van Tol, E. A.; van Noort, J. M. The flavones luteolin and apigenin inhibit *in vitro* antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, *68*, 621-629.
- [41] Hong Byun, E.; Fujimura, Y.; Yamada, K.; Tachibana, H. TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. *J. Immunol.*, **2010**, *185*, 33-45.

Received: December 1, 2012

Revised: March 18, 2013

Accepted: March 18, 2013

6. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

6. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

En esta Tesis Doctoral se han abordado tres estudios diferentes:

- El diseño de una bebida con alto poder antioxidante, junto con una bebida placebo (BP) sin poder antioxidante.
- El estudio del efecto de la bebida antioxidante (BA) sobre distintos parámetros de EO en enfermos de Alzheimer, en distintas fases de la enfermedad.
- El estudio del efecto de la BA sobre distintos marcadores de inflamación en enfermos de Alzheimer, en distintas fases de la enfermedad.

6.1. DISEÑO DE LA BEBIDA ANTIOXIDANTE Y DE LA BEBIDA PLACEBO

El té verde y la manzana son productos naturales que proporcionan al ser humano beneficios para su salud. Estas propiedades saludables están estrechamente vinculadas a las sustancias antioxidantes contenidas en ellos, principalmente compuestos fenólicos. Se ha comprobado que estos compuestos antioxidantes tienen un alto potencial para la prevención y el tratamiento de enfermedades como el cáncer, de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias y de enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue diseñar una nueva bebida con alto poder antioxidante, que combinase extractos de té verde y manzana, seleccionando de entre los disponibles en el mercado, los procedentes de variedades y tratamientos tecnológicos que les dotaran del mayor contenido en antioxidantes polifenólicos, y se estudió su composición y actividad antioxidante, sus propiedades organolépticas y su estabilidad durante el almacenamiento a diferentes temperaturas.

Una vez elegidos los ingredientes que formarían parte de la BA (Tabla 1 del artículo 1) y producida ésta en la planta piloto de Hero España, S.A. (Alcantarilla, Murcia, España) en tetra briks asépticos y opacos de 200 mL de capacidad, la BA

fue dividida en dos grupos, uno almacenado a 4 °C y el otro almacenado a temperatura ambiente (25 °C). De estos tetra briks almacenados se recogieron muestras mensualmente durante los 8 meses que duró el estudio, y se realizaron diversas medidas fisicoquímicas para analizar la vida útil de la bebida.

En primer lugar, fueron evaluados el pH y los sólidos solubles totales (SST) como parámetros de calidad de la BA. En el tiempo inicial del ensayo (día 0), el valor de pH fue de 3,18 y el contenido medio de SST fue de 10,70 °Brix. Estos valores se mantuvieron constantes durante todo el periodo de almacenamiento de la BA a ambas temperaturas (4 y 25 °C), como se observó en otro estudio con productos alimenticios de origen vegetal (García-Viguera et al., 1998), y se encontraron dentro del rango permitido según la legislación vigente en España, para este tipo de bebidas (Real Decreto 667/1983).

Respecto al análisis de las propiedades organolépticas de la BA, se evaluaron diversos parámetros del color. Durante el periodo de almacenamiento, se detectó un descenso del 10,73% en la luminosidad (valor CIEL*) de la muestra almacenada a 25 °C. En cambio, no hubo diferencias en este parámetro del color en la muestra almacenada a 4 °C. A los 240 días de almacenamiento (tiempo final del ensayo), el valor de luminosidad de la muestra almacenada a 25 °C fue un 8% menor que el de la muestra refrigerada (Tabla 2 del artículo 1). También se observaron alteraciones en el parámetro CIEa* (color rojo) durante el periodo de almacenamiento, observándose un incremento de este parámetro en ambas muestras. Este incremento fue mucho mayor en la muestra almacenada a 25 °C, mostrando una valor, a los 240 días de almacenamiento, casi siete veces el valor de la muestra refrigerada (Tabla 2 del artículo 1). Finalmente, durante el periodo de almacenamiento, fue detectado un incremento del valor del parámetro CIEb* (color amarillo) del 62% en ambas muestras (Tabla 2 del artículo 1). Estos cambios en los parámetros CIEL*a*b* también fueron observados en bebidas antioxidantes similares durante su almacenamiento (Gironés-Vilaplana, Mena, García-Viguera, & Moreno, 2012). Estos resultados en los parámetros CIEa* y CIEb* produjeron un incremento paralelo del valor del croma (C*), observándose un aumento en la saturación tanto en la muestra almacenada a 25 °C como en la muestra almacenada a 4 °C. La tasa de pardeamiento, determinada por el valor H* (ángulo Hue), fue afectada por la temperatura de almacenamiento, disminuyendo los

valores de H^* en la muestra almacenada a temperatura ambiente (Tabla 2 del artículo 1). Por el contrario, el estudio de Gironés-Vilaplana et al. (2012) mostró un incremento de los valores de H^* en todas las muestras almacenadas de una bebida similar. No obstante, los cambios de color de la BA (significantes en todos los parámetros medidos) fueron imperceptibles para el ojo humano, no apreciándose pardeamiento.

Otro de los parámetros analizados fue el ácido ascórbico. Ambas muestras presentaron un contenido inicial de ácido ascórbico de 396,51 mg/L (Figura 1 del artículo 1). Durante el periodo de almacenamiento, se observó un descenso en el contenido de ácido ascórbico en ambas muestras, aunque esta pérdida fue mayor en la muestra almacenada a 25 °C (41,24%), acorde con los resultados obtenidos en otras bebidas de frutas (Kabasakalis, Siopidou, & Moshatou, 2000; Klimczak, Małecka, Szlachta, & Gliszczyńska-Świgło, 2007). La caída del valor de ácido ascórbico fue progresiva (no significativa en la muestra almacenada a 4 °C) hasta el séptimo mes de almacenamiento. A partir de ese mes, se observó un descenso pronunciado en los niveles de ácido ascórbico en ambas muestras, obteniéndose un valor final de 308,64 mg/L de ácido ascórbico para la muestra almacenada a 4 °C, y de 233,11 mg/L de ácido ascórbico para la muestra almacenada a 25 °C (Figura 1 del artículo 1). Esta disminución en el contenido de ácido ascórbico en ambas muestras fue menor y más lenta, en comparación con la pérdida de ácido ascórbico en muestras de zumo de limón, almacenadas a las mismas temperaturas (Gironés-Vilaplana et al., 2012), tal vez debido al efecto protector de los compuestos fenólicos, presentes en el té verde y la manzana, sobre el ácido ascórbico. Otros autores obtuvieron el mismo efecto protector en diferentes modelos de bebidas (Bordignon-Luiz, Gauche, Gris, & Falcão, 2007; Poesi-Langston & Wrolstad, 1981).

La actividad antioxidante de la BA fue cuantificada mediante el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]). Durante los dos primeros meses de almacenamiento a 25 °C, se observó un incremento en la actividad antioxidante de la bebida, quizás debido al aumento de compuestos antioxidantes, probablemente taninos condensados que se originaron durante el almacenamiento y se hidrolizaron posteriormente, disminuyendo así la capacidad antioxidante de la bebida, como ocurre en zumos reconstituidos a partir de

concentrados (Arena, Fallico, & Maccarone, 1999). En el mismo periodo a 4 °C, la actividad antioxidante disminuyó un 11,10% (Figura 2 del artículo 1), en consonancia con estudios previos realizados en zumos de cítricos (Del Caro, Piga, Vacca, & Agabbio, 2004). La actividad antioxidante de la BA disminuyó un 12,57% y un 9,74% después de ocho meses de almacenamiento a 4 y 25 °C respectivamente. Sin embargo, a los 240 días de almacenamiento, el valor de la actividad antioxidante fue similar en ambas muestras, alrededor de 4,82 mM Trolox (Figura 2 del artículo 1), siendo un gran valor de actividad antioxidante en comparación con otras nuevas bebidas ricas en polifenoles (Gironés-Vilaplana, Mena, Moreno, & García-Viguera, 2014) y con muestras vegetales con alta actividad antioxidante (Barreca, Bellocco, Caristi, Leuzzi, & Gattuso, 2011), por lo que la bebida no necesita refrigeración durante su almacenamiento.

Los compuestos fenólicos identificados en la BA diseñada fueron: ácidos fenólicos, flavan-3-oles, proantocianidinas, dihidroxichalconas y flavonoles (Tabla 3 del artículo 1). Los compuestos fenólicos totales fueron expresados como la suma de las concentraciones individuales de cada compuesto fenólico. Así, la concentración inicial de compuestos fenólicos totales identificados fue de 1130,3 mg/L. Estos resultados fueron ligeramente superiores a los resultados obtenidos por Dominguez-Perles, Moreno, Carvajal, y Garcia-Viguera (2011) en una nueva bebida producida con té verde y brócoli. Después del almacenamiento a 25 °C durante 8 meses, la concentración disminuyó un 35,42%. Respecto a los ácidos fenólicos, fueron identificados el ácido gálico (31,2 mg/L) y el ácido clorogénico (52,5 mg/L). Después del almacenamiento a 25 °C durante 240 días, la concentración de estas dos sustancias disminuyó un 30,77 y 27,24%, respectivamente. Los principales compuestos identificados en la BA fueron los flavan-3-oles, siendo el EGCG el que tuvo mayor concentración inicial (674,8 mg/L) y el GC el que tuvo menor (26,4 mg/L). Después del almacenamiento a 25 °C durante ocho meses, la concentración inicial de EGCG disminuyó un 36,50%, acorde con los datos obtenidos en un estudio con hojas de té verde (Friedman, Levin, Lee, & Kozukue, 2009). Otro de los flavan-3-oles analizados fue el EC cuya concentración inicial fue de 139,8 mg/L, disminuyendo un 37,91% después de ocho meses de almacenamiento a 25 °C. El ECG (47,6 mg/L) fue el flavan-3-ol con menor descenso de su concentración (31,72%) después de 240 días de almacenamiento a 25 °C. Por el contrario, el estudio con hojas de té verde de

Friedman et al. (2009) mostró que el ECG fue el flavan-3-ol menos estable con una caída del 51%. Las concentraciones de GC y catequina disminuyeron cerca del 40% después del almacenamiento de la BA en las mismas condiciones. Por otro lado, la proantocianidina identificada fue la procianidina B2, mostrando una concentración inicial de 46,5 mg/L. Después del almacenamiento a 25 °C durante ocho meses, la concentración disminuyó un 35,91%. Dentro de las dihidroxichalconas, se identificó la floridzina, la cual tuvo una concentración inicial de 54,3 mg/L. Después del almacenamiento, la concentración disminuyó un 23,39%, siendo el compuesto con mayor descenso de su concentración de todos los identificados en la BA. Los flavonoles identificados en la bebida fueron la quercetina 3-glucósido y la quercetina 3-ramnósido, siendo la concentración inicial de 14,8 mg/L. Después del almacenamiento a 25 °C durante ocho meses, esta concentración disminuyó un 34,46%, siendo la quercetina 3-ramnósido el flavonol con menor descenso de su concentración (30,11%) (Tabla 3 del artículo 1).

Aunque los niveles de ácido ascórbico y compuestos fenólicos totales disminuyeron a 25 °C, un 41,24 y 35,42% respectivamente, la actividad antioxidante de la BA disminuyó sólo un 9,74%. Esto puede ser debido a la generación de productos de las reacciones de Maillard (Anese, Manzocco, Nicoli, & Lericci, 1999) y a la formación de taninos condensados durante el periodo de almacenamiento. Se ha demostrado que estos taninos condensados tienen numerosas actividades biológicas y farmacológicas, que son de interés para el ser humano, como la inhibición de la oxidación de los lípidos, la inhibición de la mutagénesis de carcinógenos y la inhibición de la promoción de tumores (Higdon & Frei, 2003; Okuda, 2005), ya que son poderosos antioxidantes (Dixon, Xie, & Sharma, 2005).

Paralelamente a este estudio, se diseñó una BP sin actividad antioxidante, pero con las mismas propiedades organolépticas de la BA. Los ingredientes usados en la formulación de dicha bebida se muestran en la Tabla 1 del artículo 2.

Ambas bebidas fueron utilizadas posteriormente en los estudios de EO e inflamación en enfermos de Alzheimer.

6.2. EFECTO DE LA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

En este segundo estudio se quiso comprobar si el consumo diario de la nueva bebida antioxidante diseñada, que combinaba extractos de té verde y manzana, con vitaminas y minerales antioxidantes, durante un período de ocho meses, podría afectar a los niveles de biomarcadores de EO en pacientes con EA en distintas fases de la enfermedad, estudiando los cambios en el estado antioxidante total (TAS), en los niveles de enzimas antioxidantes como la GPx, SOD y GR, y en los niveles de productos de oxidación del ADN, proteínas y lípidos.

6.2.1. Efecto sobre el TAS

Antes de empezar la ingesta de las dos bebidas (BA y BP), se observó que los valores de TAS en los enfermos de Alzheimer en fase moderada (EAM) fueron significativamente menores que los valores de TAS en los controles (C), sin embargo, no se observaron diferencias en este parámetro entre los enfermos de Alzheimer en fase inicial o leve (EAI) y los C (Tabla 4 del artículo 2).

Después de la administración de la BA, los niveles de TAS en los C fueron similares a los niveles obtenidos con la ingesta de la BP, no observándose cambios significativos en los valores de TAS a los ocho meses. Sin embargo, a los cuatro meses de la ingesta de la BA, se observó un incremento significativo (17%) de los valores de TAS en los C (Figura 1 del artículo 2). A los ocho meses de la ingesta de la BP, el grupo de los sujetos control no mostró variaciones significativas en los valores de TAS. Sin embargo, a los cuatro meses de la ingesta de la BP, se observó un incremento significativo (13%) de los valores de TAS en los C (Figura 1 del artículo 2).

En los EAI que bebieron la BP, los valores de TAS disminuyeron un 15% a los ocho meses del estudio. De forma similar, con ingesta de la BA, los niveles de TAS en los EAI disminuyeron un 26% al finalizar el estudio.

A los ocho meses de la ingesta de la BP, los EAM mostraron un descenso significativo (17%) en los valores de TAS. Por el contrario, con la ingesta de la BA, no hubo cambios significativos en los niveles de TAS a los cuatro y ocho meses del estudio en este grupo (Figura 1 del artículo 2), lo que sugiere que los

antioxidantes de la BA, al ejercer su efecto reductor, pudieron reducir el consumo de los antioxidantes fisiológicos en el organismo, lo que pudo aumentar los niveles de antioxidantes hidrofílicos, tales como el ácido úrico o el ácido ascórbico, que son responsables del 7-58 y 3-27% del compartimiento acuoso de la sangre, respectivamente (Wayner, Burton, Ingold, Barclay, & Locke, 1987), y/o los niveles de antioxidantes lipofílicos (vitamina E, vitamina A, β -caroteno y α -caroteno). De hecho, la BA contenía en su formulación, además de extractos de té verde y manzana, vitaminas C y E. Desde el punto de vista bioquímico, es probable que el uso de un solo antioxidante no sea útil, debido a que la vitamina E necesita a la vitamina C u otros aceptores de electrones solubles, para una mejor eliminación sistémica de las ERO, y para la regeneración antioxidante. Respecto a los compuestos fenólicos, Xu et al. (2010) observó que la administración de polifenoles del té verde aumentaba los niveles de TAS en ratas con hipoperfusión cerebral crónica. Además, la EGCG, el principal polifenol del té verde, posee propiedades antioxidantes superiores a la del ácido ascórbico y la vitamina E (Zhao, Li, He, Cheng, & Xin, 1989). Co-antioxidantes como las catequinas, flavanoles presentes en el té verde y las manzanas, las cuales recogen el radical α -tocoferol, y lo exportan en la fase acuosa, podrían reducir el consumo de α -tocoferol (Raneva & Shimasaki, 2005).

6.2.2. Efecto sobre las enzimas antioxidantes

Respecto a la enzima GPx, se observó que, antes de empezar con la administración de las bebidas a los sujetos, los niveles de esta enzima en los EAI y en los EAM fueron significativamente menores que en los C (Tabla 4 del artículo 2), lo que sugiere una menor capacidad en los EA para utilizar el glutatión reducido como sustancia antioxidante, lo que explicaría su mayor grado de EO.

Los sujetos controles que bebieron la BP y la BA mostraron valores mayores de GPx a los cuatro y ocho meses del estudio. Esta tendencia similar con ambas bebidas sugiere que la BA no afectó a los valores de GPx en la población control. Esta misma tendencia se observó en los EAI (Figura 2 del artículo 2). Los EAM que bebieron la BP mostraron valores significativamente mayores de GPx a los cuatro y ocho meses del estudio (74% y 169% respectivamente). Sin embargo, los EAM que bebieron la BA mostraron valores superiores de GPx solo a los cuatro

meses del estudio (Figura 2 del artículo 2). Estos resultados sugieren la capacidad de la BA para atenuar el grado de EO en los EAM, después de cuatro meses de ingesta diaria de la BA. A partir de entonces, la actividad de la GPx no aumentó (no hubo diferencias significativa entre los cuatro y ocho meses) (como ocurrió con la BP), ya que el EO no aumentó en presencia de los antioxidantes presentes en la BA. Wullner et al. (1999) demostraron que la suplementación con EGCG incrementaba los niveles de GPx, mediante la regulación de los niveles de GSH, uno de los tioles intracelulares más abundantes en el sistema nervioso central, que actúa como sustrato para la GPx. En el estudio de Kishido et al. (2007) se describe la disminución de la actividad de GPx como un importante colaborador de la disfunción cerebral en el envejecimiento de los ratones SAMP10, y pusieron de manifiesto que el consumo de catequinas del té verde, protegió contra la caída de la actividad GPx y contra el daño oxidativo en el cerebro, relacionados con la edad.

Antes de empezar la ingesta de las dos bebidas, se observó que los valores de la enzima SOD en los EAI y en los EAM fueron significativamente mayores que en los C. Esto puede ser debido a que la SOD es inducida por la presencia de más RL, ya que en la EA, al haber más EO que en la población control, la SOD está más activa para poder procesar el mayor número de RL que se generan en la enfermedad. Al mismo tiempo, los niveles de SOD en los EAI fueron mayores que en los EAM (Tabla 4 del artículo 2).

A los cuatro y ocho meses de la ingesta de la BP, los C no mostraron cambios significativos en los valores de SOD (Figura 3 del artículo 2). Por el contrario, en los sujetos controles que bebieron la BA, los valores de SOD aumentaron a los cuatro y ocho meses un 66% y 77% respectivamente. Estos datos sugieren que la SOD es inducida por una mayor disponibilidad de sustratos, necesarios para su síntesis, como son los minerales cobre y zinc, presentes en la BA. Los EAI que bebieron la BP no mostraron cambios en los niveles de SOD a los cuatro y ocho meses de la ingesta de la bebida (Figura 3 del artículo 2). Sin embargo, los EAI que bebieron la BA mostraron, a los ocho meses, un incremento significativo del 24% en los valores de SOD. Los EAM que recibieron la BP mostraron niveles mayores (58%) de SOD a los ocho meses del estudio. Por el contrario, la BA no tuvo la capacidad de incrementar los valores de SOD en los

EAM después de los ocho meses de ingesta de la bebida, pero sí se observó un incremento pronunciado (85%) en los niveles de esta enzima a los cuatro meses de la ingesta de la bebida (Figura 3 del artículo 2). Srividhya, Jyothilakshmi, Arulmathi, Senthilkumaran, y Kalaiselvi (2008) demostraron que la administración de EGCG a ratas de edad avanzada, provocaba un aumento del estado antioxidante enzimático, incrementándose las actividades de SOD, GPx y GR un 22, 35 y 19%, respectivamente, en comparación con ratas de edad avanzada que no recibieron el tratamiento.

En el periodo inicial del estudio (Ti), no se observaron diferencias significativas en los valores de la enzima GR entre los tres grupos de sujetos estudiados (Tabla 4 del artículo 2). Además, los niveles de GR no se vieron afectados por la ingesta de BA en los pacientes de Alzheimer. Estos resultados no coinciden con los resultados obtenidos en un estudio, en el que la suplementación con EGCG mejoró la actividad de GR, manteniendo así el estado redox de GSH (Srividhya et al., 2008), tal vez porque las variaciones de la enzima se visualizan mejor en el tejido cerebral que en la sangre.

6.2.3. Efecto sobre la oxidación del ADN

Al analizar los valores de 8-OHdG en orina, un producto de la oxidación del ADN, se observaron valores similares en los tres grupos estudiados antes de empezar la ingesta de las bebidas (Tabla 4 del artículo 2). Durante el periodo que duró el estudio, no se observaron cambios en los niveles de 8-OHdG en los C, los EAI y en los EAM, con ninguna de las dos bebidas. En cambio, en un ensayo controlado aleatorio con adultos que fumaban regularmente, el consumo diario de cuatro tazas de té verde durante cuatro meses se asoció con una disminución de la excreción urinaria de 8-OHdG (Hakim et al., 2003). Klaunig et al. (1999) obtuvieron resultados similares con la administración de seis tazas de té verde al día durante siete días a fumadores.

6.2.4. Efecto sobre la oxidación proteica

En Ti, antes de empezar la administración de las bebidas a los voluntarios del estudio, se observó que los niveles de carbonilos proteicos en los EAI y en los

EAM fueron significativamente mayores que los niveles de este marcador de oxidación proteica en los C (Tabla 4 del artículo 2).

En los C, con la ingesta de la BP, los carbonilos proteicos aumentaron un 87% a los cuatro meses del estudio y estos valores altos permanecieron constantes hasta el periodo final del estudio (Tf) (Figura 4 del artículo 2). Con la ingesta de la BA, los niveles de carbonilos proteicos permanecieron constantes en los sujetos controles desde Ti hasta Tf.

En los EAI, con la administración de la BP, los niveles de carbonilos proteicos permanecieron constantes durante los ocho meses del estudio (Figura 4 del artículo 2). Sin embargo, con la BA, se observó un descenso significativo (48%) de los carbonilos proteicos desde el cuarto mes de ingesta de la bebida.

En los EAM, con la ingesta de la BP, los niveles de carbonilos proteicos aumentaron significativamente (31%) a los ocho meses del estudio. Sin embargo, con la administración de la BA, los valores de carbonilos proteicos permanecieron constantes durante todo el tiempo que duró el estudio (Figura 4 del artículo 2).

Se ha demostrado que la suplementación de catequinas fue beneficiosa para contrarrestar los niveles de carbonilos proteicos en ratones a los cuales se les indujo un EO (Parvez et al., 2006). De hecho, ha sido demostrado que los flavonoides pueden inhibir la oxidación de las proteínas tisulares *in vitro* e *in vivo* (Nagasawa, Hayashi, Fujimaki, Nishizawa, & Kitts, 2000). Además, se ha observado que los flavonoides pueden inhibir la glicación y la auto-oxidación de la glucosa, procesos que pueden iniciar y propagar la modificación de proteínas (Manuel y Keenoy, Vertommen, & De Leeuw, 1999).

6.2.5. Efecto sobre la oxidación lipídica

Respecto a los valores de isoprostanos en orina, se observaron valores similares de este producto de oxidación en los tres grupos estudiados, antes de empezar la ingesta de las bebidas (Tabla 4 del artículo 2). Con la administración de la BA y la BP, no se observaron cambios significativos en los niveles de isoprostanos en ninguno de los tres grupos, durante los ocho meses del estudio.

De forma similar, con la ingesta de la BA y la BP, los niveles de LDL-ox en suero no cambiaron durante el periodo del estudio en ninguno de los tres grupos,

pero se observó que en Ti los valores de LDL-ox en los EAM, fueron significativamente mayores que los valores de este parámetro en los C (Tabla 4 del artículo 2).

Finalmente, se observaron niveles similares de anti LDL-ox en suero en los tres grupos estudiados, antes de empezar la administración de las bebidas (Tabla 4 del artículo 2), no observándose cambios en los niveles de anti LDL-ox con la ingesta de la BA y la BP en los C, los EAI y en los EAM.

Por lo tanto, la BA no fue efectiva contra la oxidación de lípidos. Por el contrario, otros autores han demostrado que la vitamina E, un ingrediente de la BA, es capaz de disminuir la peroxidación lipídica y la deposición de β -amiloide (Sung et al., 2004). También puede disminuir el daño neuronal y la deposición de β -amiloide en el cerebro, mediante la reducción de los niveles de isoprostanos (Praticò et al., 2002; Roberts et al., 2007). Además, la actividad quelante de metales de los polifenoles del té, podría desempeñar un papel significativo en la protección de las células de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, reacciones que de otro modo podrían agravar el daño peroxidativo a los componentes lipídicos de las células (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997).

6.3. EFECTO DE LA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE LA INFLAMACIÓN

En este tercer estudio se quiso comprobar si el consumo diario de la nueva bebida antioxidante diseñada, durante un período de ocho meses, podría afectar a los niveles de biomarcadores de inflamación (citoquinas) en pacientes con EA en distintas fases de la enfermedad, estudiando los cambios tanto en citoquinas proinflamatorias como en citoquinas antiinflamatorias.

6.3.1. Efecto sobre las citoquinas proinflamatorias

Antes de comenzar con la administración de la BA y la BP a los voluntarios, se observó un valor superior en la concentración de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en la fase moderada de la enfermedad ($0,89\pm 0,30$ pg/mL) con respecto a la fase inicial o leve ($0,45\pm 0,07$ pg/mL). Por el contrario, el estudio de Sala et al. (2003) mostró que, a pesar de que la liberación de citoquinas en pacientes con EA leve y moderada fue similar a los valores de los controles, las correlaciones

positivas observadas en pacientes con EA entre la IL-1 β y las puntuaciones del MMSE sugirieron que la producción de citoquinas disminuye progresivamente según la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, un estudio realizado en 145 pacientes con EA y 51 controles mostró concentraciones séricas más altas de IL-1 β en los pacientes con EA que en los controles (Licastro et al., 2000). Esta discrepancia podría explicarse por los bajos niveles séricos de IL-1 β que se encuentran en los controles normales, además de la baja sensibilidad del ELISA utilizado. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de esta citoquina entre el grupo control y los EAI, coincidiendo con los resultados obtenidos por Sala et al. (2003). Se observó también concentraciones inferiores de las citoquinas proinflamatorias IL-8 (15,65 \pm 5,79 pg/mL) y MCP-1 (208,90 \pm 33,32 pg/mL) en la fase moderada de la enfermedad comparado con la fase inicial (IL-8: 30,94 \pm 8,20 pg/mL; MCP-1: 342,81 \pm 28,17 pg/mL). Por el contrario, Bonotis et al. (2008) no encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-8 entre los controles y los pacientes con EA, o entre los pacientes con EA en fase leve-moderada y severa.

Ocho meses después de la ingesta de la BA (Tf-Ti), los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-2 fueron significativamente menores (-0,30 \pm 0,15 pg/mL) en los EAM, comparado con los C, en los cuales se observó una tendencia a aumentar (1,14 \pm 0,45 pg/mL) (Figura 1 del artículo 3). Estos resultados sugieren que la BA es efectiva para reducir esta citoquina proinflamatoria en la fase moderada de la enfermedad, pero no en la inicial. Flavonoides como la genisteína, pueden inhibir la síntesis de IL-2, sin efectos tóxicos sobre las células T, como demostraron Atluru y Atluru (1991). Por otro lado, la BA indujo, a los cuatro meses de la ingesta (Tm-Ti), un descenso significativo en los niveles séricos de la citoquina pro-inflamatoria IFN- γ en los EAI (-1,70 \pm 0,92 pg/mL) comparado con el grupo de los EAI que tomaron la BP (2,17 \pm 1,32 pg/mL) (Figura 2 del artículo 3). Estos resultados sugieren que la BA fue eficaz en la reducción de esta importante citoquina proinflamatoria, solo en la etapa inicial de la EA. Verbeek, Plomp, van Tol, y van Noort (2004) demostraron que las flavonas luteolina y apigenina inhibían la producción IFN- γ *in vitro*. En ese estudio, la producción de IFN- γ fue completamente bloqueada por 35 mM de luteolina y se redujo en un 65% con la apigenina. Se encontraron efectos similares con la quercetina, que bloqueó por completo la producción de IFN- γ . Las variaciones en los niveles de IFN- γ cuatro

meses después de la ingesta de la BA (Tm-Ti), aumentaron significativamente ($1,04 \pm 0,11$ pg/mL) en los EAM, comparado con el grupo control, cuya tendencia fue a disminuir ($-0,82 \pm 0,72$ pg/mL) (Figura 2 del artículo 3). Estos datos indican que la BA no pudo reducir esta citoquina proinflamatoria en la fase moderada de la EA.

Después de la administración de la BA durante cuatro meses (Tm-Ti) a los pacientes de Alzheimer en la fase inicial y moderada, los niveles de la citoquina proinflamatoria TNF- α tendieron a disminuir en los EAI ($-0,66 \pm 0,41$ pg/mL), pero aumentaron en los EAM ($1,52 \pm 0,62$ pg/mL) (Figura 3 del artículo 3). Estos valores fueron significativamente diferentes entre ambos grupos. Estos datos sugieren que la BA puede reducir la inflamación a corto plazo, en las primeras etapas de la enfermedad. Hong Byun, Fujimura, Yamada, y Tachibana (2010) demostraron que la EGCG podía atenuar la inflamación mediada por lipopolisacárido, por la supresión de la expresión en macrófagos de TNF- α e IL-1 β , dando lugar a la infra-regulación de las respuestas inflamatorias.

La citoquina proinflamatoria IL-1 α aumentó significativamente a los ocho meses del estudio (Tf-Ti) en los EAM que tomaron la BP ($0,03 \pm 0,07$ pg/mL). Este incremento no se observó en la fase inicial de la enfermedad ($-0,03 \pm 0,04$ pg/mL) ni en el grupo control ($-0,04 \pm 0,05$ pg/mL), lo que sugiere que la inflamación es más pronunciada en la fase moderada de la enfermedad, como describen otros autores (McGeer & McGeer, 1997). Por otro lado, la ingesta de la BA no produjo una modificación significativa de los niveles de IL-1 α en ninguno de los tres grupos estudiados.

6.3.2. Efecto sobre las citoquinas antiinflamatorias

Respecto a las citoquinas antiinflamatorias en Ti, no se observaron diferencias en sus valores durante el progreso de la enfermedad. Estos resultados están en consonancia con estudios que muestran niveles inalterados de IL-10 en el suero de pacientes con EA (Rota et al., 2006; Singh & Guthikonda, 1997). Sin embargo, se ha observado en otros estudios que los pacientes con demencia tienen niveles medios más altos de IL-10 (Angelopoulos et al., 2008; Baranowska-Bik et al., 2008). Tampoco se observaron cambios en los niveles de estas citoquinas con la ingesta de la BA y la BP, en ninguno de los tres grupos de voluntarios.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Los estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral han generado las siguientes conclusiones:

1. La nueva bebida antioxidante diseñada, basada en extractos de té verde y manzana, es un producto alimenticio con buenas propiedades organolépticas respecto al color y sabor, con una alta actividad antioxidante y estable a temperatura ambiente, por lo que no necesita refrigeración.
2. Antes de empezar la ingesta de las bebidas, los valores de GPx en los EAI fueron menores que en los C. Sin embargo, los niveles de SOD y carbonilos proteicos fueron mayores en los enfermos de Alzheimer que en los C.
3. Respecto a los EAM, los valores del TAS y GPx fueron menores que en los C. Por el contrario, los niveles de SOD, carbonilos proteicos y LDL-ox fueron mayores que en los C, todo ello antes de comenzar con la administración de las bebidas.
4. La ingesta de la BA previno, en los enfermos de Alzheimer, la disminución del TAS en la fase moderada de la enfermedad, incrementó los valores de GPx y SOD en la fase inicial y moderada, y previno el incremento de los niveles de carbonilos proteicos en los EAM, con un descenso significativo de los carbonilos proteicos desde el cuarto mes de ingesta de la bebida en los EAI.

5. La administración de la BA a los pacientes de Alzheimer disminuyó significativamente los niveles séricos de varias citoquinas proinflamatorias, mientras que no se observaron dichos cambios para las citoquinas antiinflamatorias IL-4 y IL-10, siendo la BA más efectiva contra la inflamación en el periodo temprano de la enfermedad.

6. Nuestros resultados sugieren que la BA podría ser usada como una terapia natural complementaria, para atenuar los síntomas del EO y la inflamación en las distintas etapas de la EA.

7. Son necesarios otros estudios clínicos para comprobar si la mejora del EO e inflamación en los enfermos de Alzheimer, proporcionada por la BA, se correlaciona con una mejora de su estado cognitivo.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

8.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

- Abbas, N., Bednar, I., Mix, E., Marie, S., Paterson, D., Ljungberg, A., . . . Zhu, J. (2002). Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice. *Journal of Neuroimmunology*, 126(1-2), 50-57.
- Abe, T., Tohgi, H., Isobe, C., Murata, T., & Sato, C. (2002). Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 70(3), 447-450.
- Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Leon, J., Carazo, A., & Khaldy, H. (2003). Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 527, 549-557.
- Afagh, A., Cummings, B. J., Cribbs, D. H., Cotman, C. W., & Tenner, A. J. (1996). Localization and cell association of C1q in Alzheimer's disease brain. *Clinical and Experimental Neurology*, 138(1), 22-32.
- Aguado-Llera, D., Arilla-Ferreiro, E., Campos-Barros, A., Puebla-Jimenez, L., & Barrios, V. (2005). Protective effects of insulin-like growth factor-I on the somatostatinergic system in the temporal cortex of beta-amyloid-treated rats. *Journal of Neurochemistry*, 92(3), 607-615.
- Agus, D. B., Gambhir, S. S., Pardridge, W. M., Spielholz, C., Baselga, J., Vera, J. C., & Golde, D. W. (1997). Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *European Journal of Clinical Investigation*, 100(11), 2842-2848.
- Aisen, P. S. (1997). Inflammation and Alzheimer's disease: mechanisms and therapeutic strategies. *Gerontology*, 43(1-2), 143-149.

- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., . . . Neuroinflammation Working, G. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 21(3), 383-421.
- Alzheimer, A. (1907). Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde (An unusual illness of the cerebral cortex). *Allgemeine Zeitschr Psychisch-Gerichtliche Medizin*, 64, 146-148.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Andersen, K., Nielsen, H., Lolk, A., Andersen, J., Becker, I., & Kragh-Sorensen, P. (1999). Incidence of very mild to severe dementia and Alzheimer's disease in Denmark: the Odense Study. *Neurology*, 52(1), 85-90.
- Andersen, L. F., Jacobs, D. R., Jr., Gross, M. D., Schreiner, P. J., Dale Williams, O., & Lee, D. H. (2006). Longitudinal associations between body mass index and serum carotenoids: the CARDIA study. *The British Journal of Nutrition*, 95(2), 358-365.
- Arlt, S., Kontush, A., Muller-Thomsen, T., & Beisiegel, U. (2001). Lipoprotein oxidation as a common pathomechanism in coronary heart disease and Alzheimer's disease. *Zeitschrift Fur Gerontologie Und Geriatrie*, 34(6), 461-465.
- Armstrong, J., Boada, M., Rey, M. J., Vidal, N., & Ferrer, I. (2004). Familial Alzheimer disease associated with A713T mutation in APP. *Neuroscience Letters*, 370(2-3), 241-243.
- Arnao, M. B., & Hernandez-Ruiz, J. (2006). The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 1(3), 89-95.
- Aruoma, O. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199-212.
- Assuncao, M., Santos-Marques, M. J., Carvalho, F., Lukoyanov, N. V., & Andrade, J. P. (2011). Chronic green tea consumption prevents age-related changes in rat hippocampal formation. *Neurobiology of Aging*, 32(4), 707-717.
- Atance Martinez, J. C., Yusta Izquierdo, A., & Grupeli Gardel, B. E. (2004). Costs study in Alzheimer's disease. *Revista Clínica Española*, 204(2), 64-69.

- Atwood, C. S., Obrenovich, M. E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M. A., & Martins, R. N. (2003). Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 43(1), 1-16.
- Bacskai, B. J., Klunk, W. E., Mathis, C. A., & Hyman, B. T. (2002). Imaging amyloid-beta deposits in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(9), 1035-1041.
- Ballester, M., & Honorem, V. A. (1996). Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. *Medicina Clínica*, 107(13), 509-515.
- Barger, S. W., & Harmon, A. D. (1997). Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature*, 388(6645), 878-881.
- Barnum, S. R. (1995). Complement biosynthesis in the central nervous system. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 6(2), 132-146.
- Bassett, C. N., & Montine, T. J. (2003). Lipoproteins and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 7(1), 24-29.
- Bast, A., Haenen, G. R., van den Berg, R., & van den Berg, H. (1998). Antioxidant effects of carotenoids. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 68(6), 399-403.
- Beal, M. F. (1998). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366(1-2), 211-223.
- Beckman, J. S., Chen, J., Crow, J. P., & Ye, Y. Z. (1994). Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Progress in Brain Research*, 103, 371-380.
- Belardinelli, R., Mucaj, A., Lacalaprice, F., Solenghi, M., Seddaiu, G., Principi, F., . . . Littarru, G. P. (2006). Coenzyme Q10 and exercise training in chronic heart failure. *European Heart Journal*, 27(22), 2675-2681.
- Benard, M., Raoult, E., Vaudry, D., Leprince, J., Falluel-Morel, A., Gonzalez, B. J., . . . Fontaine, M. (2008). Role of complement anaphylatoxin receptors (C3aR, C5aR) in the development of the rat cerebellum. *Molecular Immunology*, 45(14), 3767-3774.

- Bencini, A., Failli, P., Valtancoli, B., & Bani, D. (2010). Low molecular weight compounds with transition metals as free radical scavengers and novel therapeutic agents. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 8(3), 128-146.
- Benveniste, E. N. (1998). Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 9(3-4), 259-275.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316.
- Beyer, R. E. (1994). The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 26(4), 349-358.
- Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118-129.
- Bild, W., Ciobica, A., Padurariu, M., & Bild, V. (2013). The interdependence of the reactive species of oxygen, nitrogen, and carbon. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(1), 147-154.
- Blasko, I., Lederer, W., Oberbauer, H., Walch, T., Kemmler, G., Hinterhuber, H., . . . Humpel, C. (2006). Measurement of thirteen biological markers in CSF of patients with Alzheimer's disease and other dementias. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 21(1), 9-15.
- Blasko, I., Marx, F., Steiner, E., Hartmann, T., & Grubeck-Loebenstien, B. (1999). TNFalpha plus IFNgamma induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. *FASEB Journal*, 13(1), 63-68.
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533), 387-403.
- Bohlsion, S. S., Fraser, D. A., & Tenner, A. J. (2007). Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Molecular Immunology*, 44(1-3), 33-43.

- Boissiere, F., Hunot, S., Faucheux, B., Duyckaerts, C., Hauw, J. J., Agid, Y., & Hirsch, E. C. (1997). Nuclear translocation of NF-kappa B in cholinergic neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 8(13), 2849-2852.
- Boje, K. M., & Arora, P. K. (1992). Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Research*, 587(2), 250-256.
- Bonifati, D. M., & Kishore, U. (2007). Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Molecular Immunology*, 44(5), 999-1010.
- Boraschi, D., Bossu, P., Ruggiero, P., Tagliabue, A., Bertini, R., Macchia, G., . . . Grandi, G. (1995). Mapping of receptor binding sites on IL-1 beta by reconstruction of IL-1ra-like domains. *Journal of Immunology*, 155(10), 4719-4725.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228-237.
- Boyd-Kimball, D., Abdul, H. M., Reed, T., Sultana, R., & Butterfield, D. A. (2004). Role of phenylalanine 20 in Alzheimer's amyloid, beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 17(12), 1743-1749.
- Boyer, J., & Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3, 5.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Breder, C. D., Tsujimoto, M., Terano, Y., Scott, D. W., & Saper, C. B. (1993). Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 337(4), 543-567.
- Brown, G. C., & Bal-Price, A. (2003). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Molecular Neurobiology*, 27(3), 325-355.

- Brown, K. M., Pickard, K., Nicol, F., Beckett, G. J., Duthie, G. G., & Arthur, J. R. (2000). Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. *Clinical Science*, 98(5), 593-599.
- Brown, M. A., & Hural, J. (1997). Functions of IL-4 and control of its expression. *Critical Reviews in Immunology*, 17(1), 1-32.
- Bruce-Keller, A. J., Li, Y. J., Lovell, M. A., Kraemer, P. J., Gary, D. S., Brown, R. R., . . . Mattson, M. P. (1998). 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, damages cholinergic neurons and impairs visuospatial memory in rats. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(3), 257-267.
- Butterfield, D., Castegna, A., Pocernich, C., Drake, J., Scapagnini, G., & Calabrese, V. (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(8), 444.
- Butterfield, D. A. (1997). beta-Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Chemical Research in Toxicology*, 10(5), 495-506.
- Butterfield, D. A., Boyd-Kimball, D., & Castegna, A. (2003). Proteomics in Alzheimer's disease: insights into potential mechanisms of neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 86(6), 1313-1327.
- Buttriss, J. L., & Benelam, B. (2010). Nutrition and health claims: the role of food composition data. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(Suppl 3), S8-13.
- Cacquevel, M., Lebourrier, N., Cheenne, S., & Vivien, D. (2004). Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Current Drug Targets*, 5(6), 529-534.
- Camandola, S., Poli, G., & Mattson, M. P. (2000). The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal inhibits constitutive and inducible activity of nuclear factor kappa B in neurons. *Molecular Brain Research*, 85(1-2), 53-60.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., . . . Frebourg, T. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *American Journal of Human Genetics*, 65(3), 664-670.

- Carr, A., & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB Journal*, 13(9), 1007-1024.
- Carro, E., Trejo, J. L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., & Torres-Aleman, I. (2002). Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels *Nature Medicine*, 8(12), 1390-1397.
- Carter, D. B., Deibel, M. R., Jr., Dunn, C. J., Tomich, C. S., Laborde, A. L., Slightom, J. L., . . . et al. (1990). Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature*, 344(6267), 633-638.
- Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Lynn, B., Markesbery, W. R., & Butterfield, D. A. (2003). Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *Journal of Neurochemistry*, 85(6), 1394-1401.
- Castell, J. V., Andus, T., Kunz, D., & Heinrich, P. C. (1989). Interleukin-6. The major regulator of acute-phase protein synthesis in man and rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 557, 87-99; discussion 100-101.
- Cecchi, C., Fiorillo, C., Sorbi, S., Latorraca, S., Nacmias, B., Bagnoli, S., . . . Liguri, G. (2002). Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(10), 1372-1379.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527-605.
- Chang, T. C., Chou, W. Y., & Chang, G. G. (2000). Protein oxidation and turnover. *Journal of Biomedical Science*, 7(5), 357-363.
- Chao, C. C., Ala, T. A., Hu, S., Crossley, K. B., Sherman, R. E., Peterson, P. K., & Frey, W. H., 2nd. (1994). Serum cytokine levels in patients with Alzheimer's disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(4), 433-436.
- Chao, C. C., Hu, S., Frey, W. H., 2nd, Ala, T. A., Tourtellotte, W. W., & Peterson, P. K. (1994). Transforming growth factor beta in Alzheimer's disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(1), 109-110.
- Chao, C. C., Molitor, T. W., & Hu, S. (1993). Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. *Journal of Immunology*, 151(3), 1473-1481.

- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-493.
- Chen, R. S., Huang, C. C., & Chu, N. S. (1997). Coenzyme Q10 treatment in mitochondrial encephalomyopathies. Short-term double-blind, crossover study. *European Neurology*, 37(4), 212-218.
- Chen, Y. T., Zheng, R. L., Jia, Z. J., & Ju, Y. (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 9(1), 19-21.
- Chiueh, C. C. (1999). Neuroprotective properties of nitric oxide. *Neuroprotective Agents: Fourth International Conference*, 890, 301-311.
- Choi, J. G., Malakowsky, C. A., Talent, J. M., Conrad, C. C., & Gracy, R. W. (2002). Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(5), 1566-1570.
- Choi, J. H., & Yu, B. P. (1998). Dietary restriction as a modulator of age-related changes in rat kidney prostaglandin production. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 2(3), 167-171.
- Choi, Y. T., Jung, C. H., Lee, S. R., Bae, J. H., Baek, W. K., Suh, M. H., . . . Suh, S. I. (2001). The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sciences*, 70(5), 603-614.
- Chong, Y. (1997). Effect of a carboxy-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. *Life Sciences*, 61(23), 2323-2333.
- Chui, H. C., Tierney, M., Zarow, C., Lewis, A., Sobel, E., & Perlmutter, L. S. (1993). Neuropathologic diagnosis of Alzheimer disease: interrater reliability in the assessment of senile plaques and neurofibrillary tangles. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 7(1), 48-54.
- Clarke, C. J., Hales, A., Hunt, A., & Foxwell, B. M. (1998). IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. *European Journal of Immunology*, 28(5), 1719-1726.

- Combs, C. K., Karlo, J. C., Kao, S. C., & Landreth, G. E. (2001). beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience*, 21(4), 1179-1188.
- Commoner, B., Townsend, J., & Pake, G. E. (1954). Free Radicals in Biological Materials. *Nature*, 174(4432), 689-691.
- Comporti, M. (1987). Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 45(2-4), 143-169.
- Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. (1998). *Neurobiology of Aging*, 19(2), 109-116.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., . . . Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921-923.
- Crouvezier, S., Powell, B., Keir, D., & Yaqoob, P. (2001). The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine*, 13(5), 280-286.
- D'Andrea, M. R., Cole, G. M., & Ard, M. D. (2004). The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiology of Aging*, 25(5), 675-683.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), 389-406.
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., . . . Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(1), 55-99.
- Davis, S., & Laroche, S. (2003). What can rodent models tell us about cognitive decline in Alzheimer's disease? *Molecular Neurobiology*, 27(3), 249-276.

- Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (1998). Nitric oxide in neurodegeneration. *Nitric Oxide in Brain Development, Plasticity and Disease*, 118, 215-229.
- DeGiorgio, L. A., Shimizu, Y., Chun, H. S., Kim, Y. S., Sugama, S., Son, J. H., . . . Volpe, B. T. (2002). Amyloid precursor protein gene disruption attenuates degeneration of substantia nigra compacta neurons following axotomy. *Brain Research*, 938(1-2), 38-44.
- De la Fuente, M. (2008). Role of the immune system in aging. *Inmunología*, 27(4), 176-191.
- Descamps-Latscha, B., Druke, T., & Witko-Sarsat, V. (2001). Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Seminars in Dialysis*, 14(3), 193-199.
- Devaraj, S., & Jialal, I. (1998). The effects of alpha-tocopherol on critical cells in atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*, 9(1), 11-15.
- Devi, G., Ottman, R., Tang, M., Marder, K., Stern, Y., Tycko, B., & Mayeux, R. (1999). Influence of APOE genotype on familial aggregation of AD in an urban population. *Neurology*, 53(4), 789-794.
- de Whalley, C. V., Rankin, S. M., Hoult, J. R., Jessup, W., & Leake, D. S. (1990). Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 39(11), 1743-1750.
- Dhalla, N. S., Temsah, R. M., & Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension*, 18(6), 655-673.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274(2), 532-538.
- Di Pietro, P. F., Medeiros, N. I., Vieira, F. G., Fausto, M. A., & Bello-Klein, A. (2007). Breast cancer in southern Brazil: association with past dietary intake. *Nutrición Hospitalaria*, 22(5), 565-572.
- Dias, J. (2012). Nutritional Quality and Health Benefits of Vegetables: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 3(10), 1354-1374.
- Diaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A., & Keaney, J. F., Jr. (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England Journal of Medicine*, 337(6), 408-416.

- Dickensheets, H. L., Freeman, S. L., Smith, M. F., & Donnelly, R. P. (1997). Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood*, 90(10), 4162-4171.
- Dickson, D. W., Farlo, J., Davies, P., Crystal, H., Fuld, P., & Yen, S. H. (1988). Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *The American Journal of Pathology*, 132(1), 86-101.
- Dietrich, M., Hu, Y. Q., Block, G., Olano, E., Packer, L., Morrow, J. D., . . . Minihane, A. M. (2005). Associations between apolipoprotein e genotype and circulating F-2-isoprostone levels in humans. *Lipids*, 40(4), 329-334.
- Dinarello, C. A. (1997). Induction of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist. *Seminars in Oncology*, 24(3 Suppl 9), S9-81-S89-93.
- Dinarello, C. A. (1998). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *International Reviews of Immunology*, 16(5-6), 457-499.
- Ding, Q. X., Markesbery, W. R., Cecarini, V., & Keller, J. N. (2006). Decreased RNA, and increased RNA oxidation, in ribosomes from early Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 31(5), 705-710.
- Dragicevic, N., Smith, A., Lin, X., Yuan, F., Copes, N., Delic, V., . . . Bradshaw, P. C. (2011). Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and other flavonoids reduce Alzheimer's amyloid-induced mitochondrial dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease*, 26(3), 507-521.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826(2), 443-457.
- Du Yan, S., Zhu, H., Fu, J., Yan, S. F., Roher, A., Tourtellotte, W. W., . . . Schmidt, A. M. (1997). Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5296-5301.

- Duker, N. J., Sperling, J., Soprano, K. J., Druin, D. P., Davis, A., & Ashworth, R. (2001). beta-amyloid protein induces the formation of purine dimers in cellular DNA. *Journal of Cellular Biochemistry*, 81(3), 393-400.
- Duthie, S. J., Jenkinson, A. M., Crozier, A., Mullen, W., Pirie, L., Kyle, J., . . . Duthie, G. G. (2006). The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European Journal of Nutrition*, 45(2), 113-122.
- Eikelenboom, P., & van Gool, W. A. (2004). Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 111(3), 281-294.
- Eilat-Adar, S., & Goldbourt, U. (2010). Nutritional recommendations for preventing coronary heart disease in women: evidence concerning whole foods and supplements. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 20(6), 459-466.
- Englard, S., & Seifter, S. (1986). The biochemical functions of ascorbic acid. *Annual Review of Nutrition*, 6, 365-406.
- Ezquerro, J. J. (2007). 100 años de enfermedad de Alzheimer. Alois Alzheimer: su vida y su obra. Historia de la enfermedad de Alzheimer. *Alzheimer Realidades e Investigación en Demencia*, 35, 12-22.
- Fahnestock, M., Michalski, B., Xu, B., & Coughlin, M. D. (2001). The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 18(2), 210-220.
- FAOSTAT. 2013. Food and agriculture organization of the United Nations. Available at: [http:// http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E](http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E). Accessed on 25 September 2015.
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., . . . van Duijn, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*, 278(16), 1349-1356.

- Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., & Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 121(11), 2381-2386.
- Feng, Z., Chang, Y., Cheng, Y., Zhang, B. L., Qu, Z. W., Qin, C., & Zhang, J. T. (2004). Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Pineal Research*, 37(2), 129-136.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., . . . *Alzheimers Dis*, I. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366(9503), 2112-2117.
- Fetler, L., & Amigorena, S. (2005). Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science*, 309(5733), 392-393.
- Finch, C. E., & Morgan, T. E. (2007). Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: a position paper. *Current Alzheimer Research*, 4(2), 185-189.
- Findeis, M. A. (2007). The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(2), 266-286.
- Finley, J. W., Davis, C. D., & Feng, Y. (2000). Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *The Journal of Nutrition*, 130(9), 2384-2389.
- Finley, J. W., Ip, C., Lisk, D. J., Davis, C. D., Hintze, K. J., & Whanger, P. D. (2001). Cancer-Protective Properties of High-Selenium Broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2679-2683.
- Forloni, G., Mangiarotti, F., Angeretti, N., Lucca, E., & De Simoni, M. G. (1997). Beta-amyloid fragment potentiates IL-6 and TNF-alpha secretion by LPS in astrocytes but not in microglia. *Cytokine*, 9(10), 759-762.
- Franciosi, S., Choi, H. B., Kim, S. U., & McLarnon, J. G. (2005). IL-8 enhancement of amyloid-beta (A β 1-42)-induced expression and production of pro-inflammatory cytokines and COX-2 in cultured human microglia. *Journal of Neuroimmunology*, 159(1-2), 66-74.

- Frautschy, S. A., Yang, F., Irrizarry, M., Hyman, B., Saido, T. C., Hsiao, K., & Cole, G. M. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *The American Journal of Pathology*, *152*(1), 307-317.
- Frenkel, D., Maron, R., Burt, D. S., & Weiner, H. L. (2005). Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears beta-amyloid in a mouse model of Alzheimer disease. *European Journal of Clinical Investigation*, *115*(9), 2423-2433.
- Friedlander, R. M. (2003). Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *The New England Journal of Medicine*, *348*(14), 1365-1375.
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S., Stocker, R., Cheng, D., ...Ghezzi, P. (2015). Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. doi:10.1089/ars.2015.6317
- Fukumura, D., Xu, L., Chen, Y., Gohongi, T., Seed, B., & Jain, R. K. (2001). Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Research*, *61*(16), 6020-6024.
- Furuta, A., Price, D. L., Pardo, C. A., Troncoso, J. C., Xu, Z. S., Taniguchi, N., & Martin, L. J. (1995). Localization of superoxide dismutases in Alzheimer's disease and Down's syndrome neocortex and hippocampus. *The American Journal of Pathology*, *146*(2), 357-367.
- Gabbita, S. P., Lovell, M. A., & Markesbery, W. R. (1998). Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *71*(5), 2034-2040.
- Galano, A., & Francisco-Marquez, M. (2009). Reactions of OOH radical with beta-carotene, lycopene, and torulene: hydrogen atom transfer and adduct formation mechanisms. *The journal of physical chemistry B*, *113*(32), 11338-11345.
- Galbusera, C., Facheris, M., Magni, F., Galimberti, G., Sala, G., Tremolada, L., . . . Ferrarese, C. (2004). Increased Susceptibility to Plasma Lipid Peroxidation in Alzheimer Disease Patients. *Current Alzheimer Research*, *1*(2), 103-109.

- Gandy, S. (2005). The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1121-1129.
- Gann, P. H., Ma, J., Giovannucci, E., Willett, W., Sacks, F. M., Hennekens, C. H., & Stampfer, M. J. (1999). Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Research*, 59(6), 1225-1230.
- Gao, F., Bales, K. R., Dodel, R. C., Liu, J. Y., Chen, X. M., Hample, H., . . . Du, Y. S. (2002). NF-kappa B mediates IL-1 beta-induced synthesis/release of alpha(2)-macroglobulin in a human glial cell line. *Molecular Brain Research*, 105(1-2), 108-114.
- Gasque, P. (2004). Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Molecular Immunology*, 41(11), 1089-1098.
- Gelatti, U., Covolo, L., Franceschini, M., Pirali, F., Tagger, A., Ribero, M. L., . . . Donato, F. (2005). Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *Journal of Hepatology*, 42(4), 528-534.
- Gelinas, D. S., DaSilva, K., Fenili, D., St George-Hyslop, P., & McLaurin, J. (2004). Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(Suppl 2), 14657-14662.
- Gems, D., & Doonan, R. (2009). Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: is the oxidative damage theory of aging wrong? *Cell Cycle*, 8(11), 1681-1687.
- Geroldi, D., Falcone, C., & Emanuele, E. (2006). Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products: From Disease Marker to Potential Therapeutic Target. *Current Medicinal Chemistry*, 13(17), 1971-1978.
- Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W. O. (1954). Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science*, 119(3097), 623-626.
- Ghezzi, P., Bonetto, V., & Fratelli, M. (2005). Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(7-8), 964-972.

- Gianni, D., Zambrano, N., Bimonte, M., Minopoli, G., Mercken, L., Talamo, F., . . . Russo, T. (2003). Platelet-derived growth factor induces the beta-gamma-secretase-mediated cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein through a Src-Rac-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9290-9297.
- Girones, X., Guimera, A., Cruz-Sanchez, C. Z., Ortega, A., Sasaki, N., Makita, Z., . . . Cruz-Sanchez, F. F. (2004). N(epsilon)-carboxymethyllysine in brain aging, diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(10), 1241-1247.
- Giulivi, C., & Cadenas, E. (1998). The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366(3), 265-274.
- Glabinski, A. R., & Ransohoff, R. M. (1999). Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *Journal of Neurovirology*, 5(1), 3-12.
- Gliszczynska-Swiglo, A., & Tyrakowska, B. (2003). Quality of Commercial Apple Juices Evaluated on the Basis of the Polyphenol Content and the TEAC Antioxidant Activity. *Journal of Food Science*, 68(5), 1844-1849.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., . . . et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704-706.
- Godic, A., Poljsak, B., Adamic, M., & Dahmane, R. (2014). The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 860479.
- Gomberg, M. (1900). An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *Journal of the American Chemical Society*, 22(11), 757-771.
- Gong, C., Qin, Z., Betz, A. L., Liu, X. H., & Yang, G. Y. (1998). Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research*, 801(1-2), 1-8.
- Gonzalez-Molina, E., Dominguez-Perles, R., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 327-345.

- Gow, A. J., Duran, D., Malcolm, S., & Ischiropoulos, H. (1996). Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Letters*, 385(1-2), 63-66.
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21(3), 334-350.
- Griffin, W. S. T., & Mrak, R. E. (2002). Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(2), 233-238.
- Griffin, W. S. T., Sheng, J. G., Royston, M. C., Gentleman, S. M., McKenzie, J. E., Graham, D. I., . . . Mrak, R. E. (1998). Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: The potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathology*, 8(1), 65-72.
- Guidi, I., Galimberti, D., Lonati, S., Novembrino, C., Bamonti, F., Tiriticco, M., . . . Scarpini, E. (2006). Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 27(2), 262-269.
- Gupta, S., Saha, B., & Giri, A. K. (2002). Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. *Mutation Research*, 512(1), 37-65.
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12 Pt 2), 1819-1828.
- Gutteridge, J. M. C. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*, 91(2-3), 133-140.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., . . . et al. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393), 322-325.
- Halliday, G., Robinson, S. R., Shepherd, C., & Kril, J. (2000). Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 27(1-2), 1-8.
- Halliwell, B. (1989). Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radical Research Communications*, 5(6), 315-318.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (O. U. Press Ed. Fourth Edition ed.): Oxford University Press.

- Hammacher, A., Ward, L. D., Weinstock, J., Treutlein, H., Yasukawa, K., & Simpson, R. J. (1994). Structure-function analysis of human IL-6: identification of two distinct regions that are important for receptor binding. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 3(12), 2280-2293.
- Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. In: Mensaje bioquímico, Vol. XXVI. Cea Bonilla, A., del Arenal Mena, I. P., Riveros Rosas, H., & Vázquez-Contreras, E. (ed.) México, 19-54.
- Haque, A. M., Hashimoto, M., Katakura, M., Hara, Y., & Shido, O. (2008). Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by Abeta1-40 in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(9), 619-626.
- Hardeland, R. (2005). Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, 27(2), 119-130.
- Hardy, J. (2006). A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron*, 52(1), 3-13.
- Harikumar, K. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*, 7(8), 1020-1035.
- Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298-300.
- Hart, P. H., Vitti, G. F., Burgess, D. R., Whitty, G. A., Piccoli, D. S., & Hamilton, J. A. (1989). Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(10), 3803-3807.
- Harvey, R. J., Skelton-Robinson, M., & Rossor, M. N. (2003). The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 74(9), 1206-1209.
- Hayn, M., Kremser, K., Singewald, N., Cairns, N., Nemethova, M., Lubec, B., & Lubec, G. (1996). Evidence against the involvement of reactive oxygen species in the pathogenesis of neuronal death in Down's Syndrome and Alzheimer's Disease. *Life Sciences*, 59(7), 537-544.

- Hellsten, Y., Frandsen, U., Orthenblad, N., Sjodin, B., & Richter, E. A. (1997). Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *The Journal of Physiology*, 498 (Pt 1), 239-248.
- Helmer, C., Joly, P., Letenneur, L., Commenges, D., & Dartigues, J. F. (2001). Mortality with dementia: results from a French prospective community-based cohort. *American Journal of Epidemiology*, 154(7), 642-648.
- Hendrie, H. C., Ogunniyi, A., Hall, K. S., Baiyewu, O., Unverzagt, F. W., Gureje, O., . . . Hui, S. L. (2001). Incidence of dementia and Alzheimer disease in 2 communities: Yoruba residing in Ibadan, Nigeria, and African Americans residing in Indianapolis, Indiana. *JAMA*, 285(6), 739-747.
- Heneka, M. T., Loschmann, P. A., Gleichmann, M., Weller, M., Schulz, J. B., Wullner, U., & Klockgether, T. (1998). Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *Journal of Neurochemistry*, 71(1), 88-94.
- Heneka, M. T., Wiesinger, H., Dumitrescu-Ozimek, L., Riederer, P., Feinstein, D. L., & Klockgether, T. (2001). Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(9), 906-916.
- Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., . . . Butterfield, D. A. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimers-disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of Neurochemistry*, 65(5), 2146-2156.
- Hensley, K., Maidt, M. L., Yu, Z. Q., Sang, H., Markesbery, W. R., & Floyd, R. A. (1998). Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *Journal of Neuroscience*, 18(20), 8126-8132.
- Hesselgesser, J., & Horuk, R. (1999). Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *Journal of Neurovirology*, 5(1), 13-26.

- Heyser, C. J., Masliah, E., Samimi, A., Campbell, I. L., & Gold, L. H. (1997). Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4), 1500-1505.
- Himmelfarb, J., & Hakim, R. M. (2003). Oxidative stress in uremia. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 12(6), 593-598.
- Hitchon, C. A., & El-Gabalawy, H. S. (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 6(6), 265-278.
- Ho, G. J., Drego, R., Hakimian, E., & Masliah, E. (2005). Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*, 4(2), 247-256.
- Hock, C., Heese, K., Muller-Spahn, F., Huber, P., Riesen, W., Nitsch, R. M., & Otten, U. (2000). Increased CSF levels of nerve growth factor in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 54(10), 2009-2011.
- Hof, P. R., Cox, K., & Morrison, J. H. (1990). Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 301(1), 44-54.
- Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., . . . Nicoll, J. A. (2008). Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*, 372(9634), 216-223.
- Hopkins, S. J., & Rothwell, N. J. (1995). Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends in Neurosciences*, 18(2), 83-88.
- Howlett, J. (2008). *Functional foods from science to health and claims*. ILSI (Ed.) (pp. 1-44).
- Hsieh, R. J., German, J. B., & Kinsella, J. E. (1988). Relative inhibitory potencies of flavonoids on 12-lipoxygenase of fish gill. *Lipids*, 23(4), 322-326.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.

- Huang, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C. X. (2005). NF-kappa B precursor, p105, and NF-kappa B inhibitor, I kappa B gamma, are both elevated in Alzheimer disease brain. *Neuroscience Letters*, 373(2), 115-118.
- Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (2006). Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *Journal of Alzheimer's Disease*, 9(3 Suppl), 219-242.
- Jacob, C. (2006). A scent of therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms. *Nat Prod Rep*, 23(6), 851-863.
- Johns, D. R., Neufeld, M. J., & Park, R. D. (1992). An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 187(3), 1551-1557.
- Jonsson, L., & Berr, C. (2005). Cost of dementia in Europe. *Eur J Neurol*, 12(Suppl 1), 50-53.
- Joyce, D. A., Gibbons, D. P., Green, P., Steer, J. H., Feldmann, M., & Brennan, F. M. (1994). Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *European Journal of Immunology*, 24(11), 2699-2705.
- Kalfon, L., Youdim, M. B., & Mandel, S. A. (2007). Green tea polyphenol (-) - epigallocatechin-3-gallate promotes the rapid protein kinase C- and proteasome-mediated degradation of Bad: implications for neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*, 100(4), 992-1002.
- Kalman, J., Dey, I., Ilona, S. V., Matkovics, B., Brown, D., Janka, Z., . . . Joo, F. (1994). Platelet membrane fluidity and plasma malondialdehyde levels in Alzheimers demented patients with and without family history of dementia. *Biological Psychiatry*, 35(3), 190-194.
- Kanofsky, J. R. (1989). Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-Biological Interactions*, 70(1-2), 1-28.

- Kasai, H. (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research*, 387(3), 147-163.
- Kastorini, C. M., Milionis, H. J., Goudevenos, J. A., & Panagiotakos, D. B. (2010). Mediterranean diet and coronary heart disease: is obesity a link? - A systematic review. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 20(7), 536-551.
- Kaufman, S. (1966). Coenzymes and hydroxylases: ascorbate and dopamine-beta-hydroxylase; tetrahydropteridines and phenylalanine and tyrosine hydroxylases. *Pharmacological Reviews*, 18(1), 61-69.
- Kaur, H., & Halliwell, B. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Letters*, 350(1), 9-12.
- Kawamoto, E. M., Munhoz, C. D., Glezer, I., Bahia, V. S., Caramelli, P., Nitrini, R., . . . Marcourakis, T. (2005). Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 26(6), 857-864.
- Kelkel, M., Schumacher, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2011). Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. *Free Radical Research*, 45(8), 925-940.
- Kikugawa, K., Hiramoto, K., Tomiyama, S., & Asano, Y. (1997). beta-Carotene effectively scavenges toxic nitrogen oxides: nitrogen dioxide and peroxy-nitrous acid. *FEBS Letters*, 404(2-3), 175-178.
- Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y., & Kim, H. P. (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, 58(5), 759-765.
- Kim, T. I., Lee, Y. K., Park, S. G., Choi, I. S., Ban, J. O., Park, H. K., . . . Hong, J. T. (2009). l-Theanine, an amino acid in green tea, attenuates beta-amyloid-induced cognitive dysfunction and neurotoxicity: reduction in oxidative damage and inactivation of ERK/p38 kinase and NF-kappaB pathways. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(11), 1601-1610.

- Kingsley, D. M. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development*, 8(2), 133-146.
- Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical Journal*, 298 (Pt 2), 249-258.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
- Kohl, J. (2006). The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunologic Research*, 34(2), 157-176.
- Kojo, S. (2004). Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 11(8), 1041-1064.
- Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., & Shibata, H. (1997). Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1335(3), 335-342.
- Krinsky, N. I. (1998). The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 443-447.
- Kuhla, B., Boeck, K., Schmidt, A., Ogunlade, V., Arendt, T., Munch, G., & Luth, H. J. (2007). Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of Aging*, 28(1), 29-41.
- Kundu, J. K., & Surh, Y. J. (2012). Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(9), 2013-2037.
- Kuriyama, S., Hozawa, A., Ohmori, K., Shimazu, T., Matsui, T., Ebihara, S., . . . Tsuji, I. (2006). Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), 355-361.
- Lai, F., Kammann, E., Rebeck, G. W., Anderson, A., Chen, Y., & Nixon, R. A. (1999). APOE genotype and gender effects on Alzheimer disease in 100 adults with Down syndrome. *Neurology*, 53(2), 331-336.

- Lane, R. M., & Farlow, M. R. (2005). Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease. *Journal of Lipid Research*, 46(5), 949-968.
- Lauderback, C. M., Hackett, J. M., Huang, F. F., Keller, J. N., Szweda, L. I., Markesbery, W. R., & Butterfield, D. A. (2001). The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of A beta 1-42. *Journal of Neurochemistry*, 78(2), 413-416.
- Laughton, M. J., Evans, P. J., Moroney, M. A., Hoult, J. R. S., & Halliwell, B. (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochemical Pharmacology*, 42(9), 1673-1681.
- Launer, L. J., Andersen, K., Dewey, M. E., Letenneur, L., Ott, A., Amaducci, L. A., . . . Hofman, A. (1999). Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia. *Neurology*, 52(1), 78-84.
- Ledeboer, A., Breve, J. J., Wierinckx, A., van der Jagt, S., Bristow, A. F., Leysen, J. E., . . . Van Dam, A. M. (2002). Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *The European Journal of Neuroscience*, 16(7), 1175-1185.
- Ledesma, M. D., Bonay, P., Colaco, C., & Avila, J. (1994). Analysis of microtubule-associated protein-tau glycation in paired helical filaments. *Journal of Biological Chemistry*, 269(34), 21614-21619.
- Lee, J. W., Lee, Y. K., Ban, J. O., Ha, T. Y., Yun, Y. P., Han, S. B., . . . Hong, J. T. (2009). Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits beta-amyloid-induced cognitive dysfunction through modification of secretase activity via inhibition of ERK and NF-kappaB pathways in mice. *The Journal of Nutrition*, 139(10), 1987-1993.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6516-6520.

- Lee, S. C., Zhao, M. L., Hirano, A., & Dickson, D. W. (1999). Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the Alzheimer disease hippocampus: association with Hirano bodies, neurofibrillary tangles, and senile plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(11), 1163-1169.
- Letterio, J. J., & Roberts, A. B. (1997). TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 84(3), 244-250.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor: thirty-five years later. *Bioscience Reports*, 7(9), 681-699.
- Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, M. B., & Mandel, S. (2001). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 78(5), 1073-1082.
- Levites, Y., Youdim, M. B., Maor, G., & Mandel, S. (2002). Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. *Biochemical Pharmacology*, 63(1), 21-29.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., . . . et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*, 269(5226), 973-977.
- Lilius, E. M., & Marnila, P. (1992). Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease. *Experientia*, 48(11-12), 1082-1091.
- Lim, J. S., Cho, H., Hong, H. S., Kwon, H., Mook-Jung, I., & Kwon, Y. K. (2007). Upregulation of amyloid precursor protein by platelet-derived growth factor in hippocampal precursor cells. *Neuroreport*, 18(12), 1225-1229.
- Lindberg, C., Hjorth, E., Post, C., Winblad, B., & Schultzberg, M. (2005). Cytokine production by a human microglial cell line: effects of beta-amyloid and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Neurotoxicity Research*, 8(3-4), 267-276.

- Lippa, C. F., Fujiwara, H., Mann, D. M., Giasson, B., Baba, M., Schmidt, M. L., . . . Trojanowski, J. Q. (1998). Lewy bodies contain altered alpha-synuclein in brains of many familial Alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes. *The American Journal of Pathology*, *153*(5), 1365-1370.
- Liu, B., & Hong, J. S. (2003). Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *304*(1), 1-7.
- Liu, H., Harrell, L. E., Shenvi, S., Hagen, T., & Liu, R. M. (2005). Gender differences in glutathione metabolism in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, *79*(6), 861-867.
- Liu, J., Zhao, M. L., Brosnan, C. F., & Lee, S. C. (1996). Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: role of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist. *Journal of Immunology*, *157*(8), 3569-3576.
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M., & Markesbery, W. R. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*, *45*(8), 1594-1601.
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Mattson, M. P., & Markesbery, W. R. (1997). Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *18*(5), 457-461.
- Lovell, M. A., Gabbita, S. P., & Markesbery, W. R. (1999). Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *Journal of Neurochemistry*, *72*(2), 771-776.
- Lowes, D. A., Webster, N. R., Murphy, M. P., & Galley, H. F. (2013). Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *British Journal of Anaesthesia*, *110*(3), 472-480.

- Lundkvist, J., Sundgren-Andersson, A. K., Tingsborg, S., Ostlund, P., Engfors, C., Alheim, K., . . . Schultzberg, M. (1999). Acute-phase responses in transgenic mice with CNS overexpression of IL-1 receptor antagonist. *The American Journal of Physiology*, 276(3 Pt 2), R644-651.
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224C, 164-175.
- Luster, A. D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 338(7), 436-445.
- Lyras, L., Cairns, N. J., Jenner, A., Jenner, P., & Halliwell, B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 68(5), 2061-2069.
- Maggini, S., Wintergerst, E. S., Beveridge, S., & Hornig, D. H. (2007). Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *The British Journal of Nutrition*, 98(Suppl 1), S29-35.
- Maier, M., Peng, Y., Jiang, L., Seabrook, T. J., Carroll, M. C., & Lemere, C. A. (2008). Complement C3 deficiency leads to accelerated amyloid beta plaque deposition and neurodegeneration and modulation of the microglia/macrophage phenotype in amyloid precursor protein transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*, 28(25), 6333-6341.
- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J., & Reddy, P. H. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human Molecular Genetics*, 15(9), 1437-1449.
- Mandel, S. A., Amit, T., Weinreb, O., Reznichenko, L., & Youdim, M. B. (2008). Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 14(4), 352-365.

- Marchant, A., Bruyns, C., Vandenaabeele, P., Ducarme, M., Gerard, C., Delvaux, A., . . . Goldman, M. (1994). Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *European Journal of Immunology*, 24(5), 1167-1171.
- Marcus, D. L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J. S., Strafacci, J. A., & Freedman, M. L. (1998). Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Clinical and Experimental Neurology*, 150(1), 40-44.
- Markesbery, W. R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1), 134-147.
- Markesbery, W. R., & Carney, J. M. (1999). Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 9(1), 133-146.
- Markesbery, W. R., & Lovell, M. A. (1998). Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 19(1), 33-36.
- Marksteiner, J., Pirchl, M., Ullrich, C., Oberbauer, H., Blasko, I., Lederer, W., . . . Humpel, C. (2008). Analysis of cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. Biomarkers and toxic properties. *Pharmacology*, 82(3), 214-220.
- Martysiak-Zurowska, D., & Wentka, W. (2012). A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 11(1), 83-89.
- Matsuzoe, N., Yamaguchi, M., Kawanobu, S., Watanabe, Y., Higashi, H., & Sakata, Y. (1999). Effect of Dark Treatment of the Eggplant on Fruit Skin Color and its Anthocyanin Component. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 68(1), 138-145.
- Mattson, M. P., & Chan, S. L. (2003). Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*, 34(4-5), 385-397.
- May, J. M. (2012). Vitamin C transport and its role in the central nervous system. *Sub-Cellular Biochemistry*, 56, 85-103.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.

- McGeer, E., & McGeer, P. (1997). Inflammatory Cytokines in the CNS. *CNS Drugs*, 7(3), 214-228.
- McGeer, P. L., Kawamata, T., Walker, D. G., Akiyama, H., Tooyama, I., & McGeer, E. G. (1993). Microglia in degenerative neurological disease. *Glia*, 7(1), 84-92.
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2002). The possible role of complement activation in Alzheimer disease. *Trends in Molecular Medicine*, 8(11), 519-523.
- McGrath, L. T., McGleenon, B. M., Brennan, S., McColl, D., McIlroy, S., & Passmore, A. P. (2001). Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *Qjm-Monthly Journal of the Association of Physicians*, 94(9), 485-490.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34(7), 939-944.
- Meager, A. (2004). Cytokines: interleukins. In R. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* (Vol. 3, pp. 115-151). Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Meager, A. (2005). Viral inhibitors and immune response mediators: the interferons. In R. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* (Vol. 15, pp. 387-421). Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Mecocci, P., Beal, M. F., Cecchetti, R., Polidori, M. C., Cherubini, A., Chionne, F., . . . Senin, U. (1997). Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 31(1), 53-64.
- Mecocci, P., Macgarvey, U., & Beal, M. F. (1994). Oxidative damage to mitochondrial-DNA is increased in Alzheimers-disease. *Annals of Neurology*, 36(5), 747-751.

- Mecocci, P., Polidori, M. C., Cherubini, A., Ingegneri, T., Mattioli, P., Catani, M., . . . Beal, M. F. (2002). Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 59(5), 794-798.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- Michaelis, L. (1939). Free radicals as intermediate steps of oxidation-reduction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 7, 33-49.
- Mielke, M. M., & Lyketsos, C. G. (2006). Lipids and the pathogenesis of Alzheimer's disease: Is there a link? *International Review of Psychiatry*, 18(2), 173-186.
- Miles, A. M., Bohle, D. S., Glassbrenner, P. A., Hansert, B., Wink, D. A., & Grisham, M. B. (1996). Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 40-47.
- Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60(3), 331-337.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384(3), 240-242.
- Misonou, H., Morishima-Kawashima, M., & Ihara, Y. (2000). Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (A β) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry*, 39(23), 6951-6959.
- Mitchell, R., & Cotran, R. (2003). Acute and chronic inflammation. In V. Kumar, R. Cotran, & S. Robbins (Eds.), *Robbins basic pathology*. Philadelphia, USA: Saunders.
- Montine, K. S., Quinn, J. F., Zhang, J., Fessel, J. P., Roberts, L. J., Morrow, J. D., & Montine, T. J. (2004). Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 128(1-2), 117-124.

- Montine, T. J., Quinn, J. F., Milatovic, D., Silbert, L. C., Dang, T., Sanchez, S., . . .
Morrow, J. D. (2002). Peripheral F-2-isoprostanes and F-4-neuroprostanes
are not increased in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 52(2), 175-
179.
- Moorhouse, P. C., Grootveld, M., Halliwell, B., Quinlan, J. G., & Gutteridge, J. M.
(1987). Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS
Letters*, 213(1), 23-28.
- Mora, A., Payá, M., Ríos, J. L., & Alcaraz, M. J. (1990). Structure-activity
relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of
non-enzymic lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 40(4), 793-797.
- Morgan, B. P., & Gasque, P. (1996). Expression of complement in the brain: role in
health and disease. *Immunology Today*, 17(10), 461-466.
- Morillas-Ruiz, J., Zafrilla, P., Almar, M., Cuevas, M. J., Lopez, F. J., Abellan, P., . . .
Gonzalez-Gallego, J. (2005). The effects of an antioxidant-supplemented
beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-
controlled double-blind study in cyclists. *European Journal of Applied
Physiology*, 95(5-6), 543-549.
- Morillas-Ruiz, J. M., Villegas Garcia, J. A., Lopez, F. J., Vidal-Guevara, M. L., &
Zafrilla, P. (2006). Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced
oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 25(3), 444-453.
- Mortensen, A., & Skibsted, L. H. (1997). Relative stability of carotenoid radical
cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of
antioxidant hierarchy. *FEBS Letters*, 417(3), 261-266.
- Moyers, S. B., & Kumar, N. B. (2004). Green tea polyphenols and cancer
chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials.
Nutrition Reviews, 62(5), 204-211.
- Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (2001). Interleukin-1, neuroinflammation, and
Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 22(6), 903-908.
- Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (2005). Glia and their cytokines in progression of
neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*, 26(3), 349-354.

- Mufson, E. J., Ma, S. Y., Dills, J., Cochran, E. J., Leurgans, S., Wu, J., . . . Kordower, J. H. (2002). Loss of basal forebrain P75(NTR) immunoreactivity in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *The Journal of Comparative Neurology*, 443(2), 136-153.
- Mukherjee, P., & Pasinetti, G. M. (2000). The role of complement anaphylatoxin C5a in neurodegeneration: implications in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology*, 105(2), 124-130.
- Munch, G., Kuhla, B., Luth, H. J., Arendt, T., & Robinson, S. R. (2003). Anti-AGEing defences against Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 6), 1397-1399.
- Murakami, K., Murata, N., Noda, Y., Tahara, S., Kaneko, T., Kinoshita, N., . . . Shimizu, T. (2011). SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid beta protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(52), 44557-44568.
- Muzandu, K., Ishizuka, M., Sakamoto, K. Q., Shaban, Z., El Bohi, K., Kazusaka, A., & Fujita, S. (2006). Effect of lycopene and beta-carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 215(3), 330-340.
- Nakata, R., Takahashi, S., & Inoue, H. (2012). Recent advances in the study on resveratrol. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 35(3), 273-279.
- Nataf, S., Stahel, P. F., Davoust, N., & Barnum, S. R. (1999). Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends in Neurosciences*, 22(9), 397-402.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., & van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418-425.
- Niki, E. (1997). Mechanisms and dynamics of antioxidant action of ubiquinol. *Molecular Aspects of Medicine*, 18 Suppl, S63-70.

- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., . . . Carruba, M. O. (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, 299(5608), 896-899.
- Norgaard, P., Hougaard, S., Poulsen, H. S., & Spang-Thomsen, M. (1995). Transforming growth factor beta and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 21(4), 367-403.
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., . . . Smith, M. A. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(8), 759-767.
- Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M. A., Wade, R., Hirai, K., Chiba, S., & Smith, M. A. (1999). RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 19(6), 1959-1964.
- Nussbaum, R. L., & Ellis, C. E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 348(14), 1356-1364.
- Nègre-Salvayre, A., & Salvayre, R. (1992). Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(2), 101-106.
- O'Barr, S. A., Caguioa, J., Gruol, D., Perkins, G., Ember, J. A., Hugli, T., & Cooper, N. R. (2001). Neuronal expression of a functional receptor for the C5a complement activation fragment. *Journal of Immunology*, 166(6), 4154-4162.
- Olson, L., Nordberg, A., von Holst, H., Backman, L., Ebendal, T., Alafuzoff, I., . . . et al. (1992). Nerve growth factor affects 11C-nicotine binding, blood flow, EEG, and verbal episodic memory in an Alzheimer patient (case report). *Journal of Neural Transmission. Parkinson's Disease and Dementia Section*, 4(1), 79-95.
- Orrenius, S., & Nicotera, P. (1987). Biochemical mechanisms of oxidative liver cell injury. *Bulletin Europeen de Physiopathologie Respiratoire*, 23(4), 291-295.
- Orzylowska, O., Oderfeld-Nowak, B., Zaremba, M., Januszewski, S., & Mossakowski, M. (1999). Prolonged and concomitant induction of astroglial immunoreactivity of interleukin-1beta and interleukin-6 in the rat hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience Letters*, 263(1), 72-76.

- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922.
- Owens, T., Babcock, A. A., Millward, J. M., & Toft-Hansen, H. (2005). Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS *Brain Research. Brain Research Reviews*, 48(2), 178-184.
- Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(4 Suppl), 1050s-1055s.
- Padh, H. (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology*, 68(10), 1166-1173.
- Padurariu, M., Ciobica, A., Hritcu, L., Stoica, B., Bild, W., & Stefanescu, C. (2010). Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 469(1), 6-10.
- Pan, Y., & Loo, G. (2000). Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(5), 824-830.
- Panasenko, O. M., Sharov, V. S., Briviba, K., & Sies, H. (2000). Interaction of peroxynitrite with carotenoids in human low density lipoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 302-305.
- Pavlov, V. A., & Tracey, K. J. (2005). The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*, 19(6), 493-499.
- Perez, V. I., Bokov, A., Van Remmen, H., Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y., & Richardson, A. (2009). Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(10), 1005-1014.
- Permanne, B., Adessi, C., Saborio, G. P., Fraga, S., Frossard, M. J., Van Dorpe, J., . . . Soto, C. (2002). Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *FASEB Journal*, 16(8), 860-862.
- Perry, R. T., Collins, J. S., Wiener, H., Acton, R., & Go, R. C. (2001). The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 22(6), 873-883.
- Peterson, J., & Dwyer, J. (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18(12), 1995-2018.

- Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., & Marcheselli, F. (1994). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sciences*, 55(15), P1271-276.
- Plata-Salaman, C. R., Ilyin, S. E., & Gayle, D. (1998). Brain cytokine mRNAs in anorectic rats bearing prostate adenocarcinoma tumor cells. *The American Journal of Physiology*, 275(2 Pt 2), R566-573.
- Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R. J., Tan, D. X., Chen, L. D., Manchester, L. C., & Barlow-Walden, L. R. (1994). Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738, 419-420.
- Polidori, M. C., Mattioli, P., Aldred, S., Cecchetti, R., Stahl, W., Griffiths, H., . . . Mecocci, P. (2004). Plasma antioxidant status, immunoglobulin g oxidation and lipid peroxidation in demented patients: relevance to Alzheimer disease and vascular dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 18(3-4), 265-270.
- Poljsak, B., & Milisav, I. (2012). The neglected significance of "antioxidative stress". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 480895.
- Poljsak, B., Suput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 956792.
- Pong, K. (2003). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(1), 127-139.
- Postlethwait, E. M., Langford, S. D., Jacobson, L. M., & Bidani, A. (1995). NO2 reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free Radical Biology & Medicine*, 19(5), 553-563.
- Prasad, A. S., Bao, B., Beck, F. W., Kucuk, O., & Sarkar, F. H. (2004). Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(8), 1182-1190.

- Praticò, D., Clark, C. M., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Rokach, J., & FitzGerald, G. A. (2000). Increased 8,12-iso-iPF(2 alpha)-VI in Alzheimer's disease: Correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Annals of Neurology*, 48(5), 809-812.
- Praticò, D., & Delanty, N. (2000). Oxidative injury in diseases of the central nervous system: Focus on Alzheimer's disease. *American Journal of Medicine*, 109(7), 577-585.
- Praticò, D., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Rokach, J., & Fitzgerald, G. A. (1998). Increased F-2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB Journal*, 12(15), 1777-1783.
- Praticò, D. (2001). In vivo measurement of the redox state. *Lipids*, 36(1 Suppl), S45-S47.
- Prohaska, J. R., & Gybina, A. A. (2004). Intracellular copper transport in mammals. *The Journal of Nutrition*, 134(5), 1003-1006.
- Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., . . . Selkoe, D. J. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32730-32738.
- Quinn, J. F., Bussiere, J. R., Hammond, R. S., Montine, T. J., Henson, E., Jones, R. E., & Stackman, R. W., Jr. (2007). Chronic dietary alpha-lipoic acid reduces deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging*, 28(2), 213-225.
- Radi, R. (2013). Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(37), 26464-26472.
- Rahman, I., Biswas, S. K., & Kirkham, P. A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1439-1452.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C. U., Werner, A., Jones, L. L., & Kreutzberg, G. W. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 30(1), 77-105.

- Ramanathan, R., Das, N. P., & Tan, C. H. (1994). Effects of γ -linolenic acid, flavonoids, and vitamins on cytotoxicity and lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(1), 43-48.
- Reddy, P. H., & Beal, M. F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14(2), 45-53.
- Relton, J. K., & Rothwell, N. J. (1992). Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull*, 29(2), 243-246.
- Richard, G. C. (2002). Genetic Stability, Dysdifferentiation, and Longevity Determinant Genes. *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging*, (pp. 1146-1235): WORLD SCIENTIFIC.
- Richter, T., Munch, G., Luth, H. J., Arendt, T., Kientsch-Engel, R., Stahl, P., . . . Kuhla, B. (2005). Immunochemical crossreactivity of antibodies specific for "advanced glycation endproducts" with "advanced lipoxidation endproducts". *Neurobiology of Aging*, 26(4), 465-474.
- Rinaldi, P., Polidori, M. C., Metastasio, A., Mariani, E., Mattioli, P., Cherubini, A., . . . Mecocci, P. (2003). Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(7), 915-919.
- Riviere, S., Birlouez-Aragon, I., & Vellas, B. (1998). Plasma protein glycation in Alzheimer's disease. *Glycoconjugate Journal*, 15(10), 1039-1042.
- Rogers, J., Cooper, N. R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P. L., Styren, S. D., . . . et al. (1992). Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10016-10020.
- Rogers, J., Lubernarod, J., Styren, S. D., & Civin, W. H. (1988). Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous-system - relationship to the pathology of Alzheimers-disease. *Neurobiology of Aging*, 9(4), 339-349.

- Romeo, L., Intrieri, M., D'Agata, V., Mangano, N. G., Oriani, G., Ontario, M. L., & Scapagnini, G. (2009). The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, induces heme oxygenase in rat neurons and acts as an effective neuroprotective agent against oxidative stress. *Journal of The American College of Nutrition*, 28(Suppl), 492s-499s.
- Rossi, F., & Bianchini, E. (1996). Synergistic induction of nitric oxide by beta-amyloid and cytokines in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225(2), 474-478.
- Rossner, S., Lange-Dohna, C., Zeitschel, U., & Perez-Polo, J. R. (2005). Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *Journal of Neurochemistry*, 92(2), 226-234.
- Roy, G. C., & Mark, P. M. (2002). Measuring Oxidative Stress and Interpreting Its Clinical Relevance for Humans. *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging*, (pp. 131-164): WORLD SCIENTIFIC.
- Sato, T., Shimogaito, N., Wu, X., Kikuchi, S., Yamagishi, S., & Takeuchi, M. (2006). Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 21(3), 197-208.
- Saunders, A. M., Schmeider, K., Breitner, J. C. S., Benson, M. D., Brown, W. T., Goldfarb, L., . . . Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein-e-epsilon-4 allele distributions in late-onset alzheimer's-disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet*, 342(8873), 710-711.
- Schreiber, M., & Trojan, S. (1991). Ascorbic acid in the brain. *Physiological Research*, 40(4), 413-418.
- Schuessel, K., Leutner, S., Cairns, N. J., Muller, W. E., & Eckert, A. (2004). Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. *Journal of Neural Transmission*, 111(9), 1167-1182.
- Schumock, G. T. (1998). Economic considerations in the treatment and management of Alzheimer's disease. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 55(Suppl 2), S17-21.

- Seidl, R., Schuller, E., Cairns, N., & Lubec, G. (1997). Evidence against increased glycooxidation in patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 232(1), 49-52.
- Selmaj, K. W., Farooq, M., Norton, W. T., Raine, C. S., & Brosnan, C. F. (1990). Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *Journal of Immunology*, 144(1), 129-135.
- Semchyshyn, H. M., & Lozinska, L. M. (2012). Fructose protects baker's yeast against peroxide stress: potential role of catalase and superoxide dismutase. *FEMS Yeast Research*, 12(7), 761-773.
- Sequeira, S., Rao, A. V., Rao, A. (2012). Increased oxidative stress and altered antioxidants status in patients with chronic allergic rhinitis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 951-956.
- Sesso, H. D., Buring, J. E., Norkus, E. P., & Gaziano, J. M. (2004). Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(1), 47-53.
- Shan, X., & Lin, C. L. G. (2006). Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 27(5), 657-662.
- Shan, X., Tashiro, H., & Lin, C. L. G. (2003). The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 23(12), 4913-4921.
- Shay, K. P., Moreau, R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., & Hagen, T. M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(10), 1149-1160.
- Shen, Y., & Meri, S. (2003). Yin and Yang: complement activation and regulation in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 70(6), 463-472.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., . . . St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375(6534), 754-760.

- Shigenaga, M. K., Aboujaoude, E. N., Chen, Q., & Ames, B. N. (1994). Assays of oxidative DNA-damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear-DNA and biological-fluids by high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection. *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt D*, 234, 16-33.
- Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M., Di Bilio, A. J., & Bonomo, R. P. (1991). In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻(·). *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 1-8.
- Siedlak, S. L., Casadesus, G., Webber, K. M., Pappolla, M. A., Atwood, C. S., Smith, M. A., & Perry, G. (2009). Chronic antioxidant therapy reduces oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radical Research*, 43(2), 156-164.
- Sies, H., & Stahl, W. (2004). Carotenoids and UV protection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(8), 749-752.
- Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V., & Ramassamy, C. (2008). Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 4855-4873.
- Skulachev, V. P. (2012). Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(2), 283-289.
- Slooter, A. J., Cruys, M., Kalmijn, S., Hofman, A., Breteler, M. M., Van Broeckhoven, C., & van Duijn, C. M. (1998). Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: the Rotterdam Study. *Archives of Neurology*, 55(7), 964-968.
- Small, G. W., Rabins, P. V., Barry, P. P., Buckholtz, N. S., DeKosky, S. T., Ferris, S. H., . . . Tune, L. E. (1997). Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA*, 278(16), 1363-1371.

- Smith, C. D., Carney, J. M., Starkereed, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R., Floyd, R. A., & Markesbery, W. R. (1991). Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer-disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23), 10540-10543.
- Smith, C. D., Carney, J. M., Tatsumo, T., Stadtman, E. R., Floyd, R. A., & Markesbery, W. R. (1992). Protein oxidation in aging brain. *Aging and Cellular Defense Mechanisms*, 663, 110-119.
- Smith, D. G., Cappai, R., & Barnham, K. J. (2007). The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1768(8), 1976-1990.
- Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F., & Kowall, N. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*, 382(6587), 120-121.
- Smith, M. A., Richey Harris, P. L., Sayre, L. M., Beckman, J. S., & Perry, G. (1997). Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 17(8), 2653-2657.
- Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., & Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1502(1), 139-144.
- Smith, M. A., Taneda, S., Richey, P. L., Miyata, S., Yan, S. D., Stern, D., . . . Perry, G. (1994). Advanced maillard reaction end-products are associated with Alzheimer-disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5710-5714.
- Sohal, R. S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273(5271), 59-63.
- Spector, R., & Johanson, C. E. (2014). The nexus of vitamin homeostasis and DNA synthesis and modification in mammalian brain. *Molecular Brain*, 7, 3.
- Spencer, J. P. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *The Proceedings of The Nutrition Society*, 69(2), 244-260.

- Srinivasan, V., Pandi-Perumal, S. R., Maestroni, G. J., Esquifino, A. I., Hardeland, R., & Cardinali, D. P. (2005). Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity Research*, 7(4), 293-318.
- Stadtman, E. R. (1992). PROTEIN OXIDATION AND AGING. *Science*, 257(5074), 1220-1224.
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine*, 13(2), 139-145.
- Strle, K., Zhou, J. H., Shen, W. H., Broussard, S. R., Johnson, R. W., Freund, G. G., . . . Kelley, K. W. (2001). Interleukin-10 in the brain. *Critical Reviews in Immunology*, 21(5), 427-449.
- Sultana, R., Poon, H. F., Cai, J., Pierce, W. M., Merchant, M., Klein, J. B., . . . Butterfield, D. A. (2006). Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiology of Disease*, 22(1), 76-87.
- Sung, C. C., Hsu, Y. C., Chen, C. C., Lin, Y. F., & Wu, C. C. (2013). Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 301982.
- Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K., & Lee, S. S. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutation Research*, 480-481, 243-268.
- Suter, M., & Richter, C. (1999). Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry*, 38(1), 459-464.
- Suzuki, S., Tanaka, K., Nagata, E., Ito, D., Dembo, T., & Fukuuchi, Y. (1999). Cerebral neurons express interleukin-6 after transient forebrain ischemia in gerbils. *Neuroscience Letters*, 262(2), 117-120.
- Szczepanik, A. M., Funes, S., Petko, W., & Ringheim, G. E. (2001). IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *Journal of Neuroimmunology*, 113(1), 49-62.

- Tabet, N., Mantle, D., Walker, Z., & Orrell, M. (2002). Endogenous antioxidant activities in relation to concurrent vitamins A, C, and E intake in dementia. *International Psychogeriatrics*, 14(1), 7-15.
- Tamagno, E., Robino, G., Obbili, A., Bardini, P., Aragno, M., Parola, M., & Danni, O. (2003). H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38(MAPK). *Experimental Neurology*, 180(2), 144-155.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., & Reiter, R. J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of Pineal Research*, 42(1), 28-42.
- Tanzi, R. E., & Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*, 120(4), 545-555.
- Tarkowski, E., Issa, R., Sjogren, M., Wallin, A., Blennow, K., Tarkowski, A., & Kumar, P. (2002). Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF-beta in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiology of Aging*, 23(2), 237-243.
- Tenner, A. J. (2001). Complement in Alzheimer's disease: opportunities for modulating protective and pathogenic events. *Neurobiology of Aging*, 22(6), 849-861.
- Tessutti, L. S., Macedo, D. V., Kubota, L. T., & Alves, A. A. (2013). Measuring the antioxidant capacity of blood plasma using potentiometry. *Analytical Biochemistry*, 441(2), 109-114.
- Teunissen, C. E., de Vente, J., Steinbusch, H. W. M., & De Bruijn, C. (2002). Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. *Neurobiology of Aging*, 23(4), 485-508.
- Thilakarathna, S. H., & Rupasinghe, H. P. V. (2012). Anti-atherosclerotic effects of fruit bioactive compounds: A review of current scientific evidence. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(3), 407-419.

- Thornton, P., Pinteaux, E., Gibson, R. M., Allan, S. M., & Rothwell, N. J. (2006). Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *Journal of Neurochemistry*, 98(1), 258-266.
- Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Ishizaki, E., & Isobe, C. (1999). Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 269(1), 52-54.
- Torres, L. L., Quaglio, N. B., de Souza, G. T., Garcia, R. T., Dati, L. M., Moreira, W. L., . . . Marcourakis, T. (2011). Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 26(1), 59-68.
- Town, T., Nikolic, V., & Tan, J. (2005). The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *Journal of Neuroinflammation*, 2, 24.
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., & Khanizadeh, S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4989-4995.
- Tuppo, E. E., & Arias, H. R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(2), 289-305.
- Tuppo, E. E., Forman, L. J., Spur, B. W., Chan-Ting, R. E., Chopra, A., & Cavalieri, T. A. (2001). Sign of lipid peroxidation as measured in the urine of patients with probable Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 54(5), 565-568.
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-1208.
- van der Wal, E. A., Gomez-Pinilla, F., & Cotman, C. W. (1993). Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies. *Neuroreport*, 4(1), 69-72.
- van Duijn, C. M., de Knijff, P., Cruts, M., Wehnert, A., Havekes, L. M., Hofman, A., & Van Broeckhoven, C. (1994). Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 7(1), 74-78.

- Van Duyn, M. A. S., & Pivonka, E. (2000). Overview of the Health Benefits of Fruit and Vegetable Consumption for the Dietetics Professional: Selected Literature. *Journal of the American Dietetic Association*, 100(12), 1511-1521.
- Varilek, G. W., Yang, F., Lee, E. Y., deVilliers, W. J., Zhong, J., Oz, H. S., . . . McClain, C. J. (2001). Green tea polyphenol extract attenuates inflammation in interleukin-2-deficient mice, a model of autoimmunity. *The Journal of Nutrition*, 131(7), 2034-2039.
- Venturini, C. D., Merlo, S., Souto, A. A., Fernandes Mda, C., Gomez, R., & Rhoden, C. R. (2010). Resveratrol and red wine function as antioxidants in the nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(6), 434-441.
- Vitek, M. P., Bhattacharya, K., Glendening, J. M., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala, R., . . . Cerami, A. (1994). Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 4766-4770.
- Vodovotz, Y., Lucia, M. S., Flanders, K. C., Chesler, L., Xie, Q. W., Smith, T. W., . . . Sporn, M. B. (1996). Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 184(4), 1425-1433.
- Vogel, T., Benetos, A., Verreault, R., Kaltenbach, G., Kiesmann, M., & Berthel, M. (2006). Risk factors for Alzheimer: towards prevention?. *La Presse Medicale*, 35(9 Pt 2), 1309-1316.
- Wakai, K., Ando, M., Ozasa, K., Ito, Y., Suzuki, K., Nishino, Y., . . . Tamakoshi, A. (2005). Updated information on risk factors for lung cancer: findings from the JACC Study. *Journal of Epidemiology*, 15(Suppl 2), S134-139.
- Walker, D., McGeer, E., & McGeer, P. (1997). Involvement of inflammation and complement in Alzheimer's disease. In J. Antel, G. Birnbaum, & H. Hartung (Eds.), *Clinical Neuroimmunology* (pp. 172-188). Oxford: Blackwell Scientific.
- Wang, J. Z., & Wang, Z. F. (2006). Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(1), 41-49.

- Wang, P., Wu, P., Siegel, M. I., Egan, R. W., & Billah, M. M. (1995). Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(16), 9558-9563.
- Willett, W. C. (2006). The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutrition*, 9(1a), 105-110.
- Winter, C. D., Iannotti, F., Pringle, A. K., Trikkas, C., Clough, G. F., & Church, M. K. (2002). A microdialysis method for the recovery of IL-1beta, IL-6 and nerve growth factor from human brain in vivo. *Journal of Neuroscience Methods*, 119(1), 45-50.
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 82-83, 969-974.
- Wiseman, H., & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313, 17-29.
- Woodroffe, M. N., Sarna, G. S., Wadhwa, M., Hayes, G. M., Loughlin, A. J., Tinker, A., & Cuzner, M. L. (1991). Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. *Journal of Neuroimmunology*, 33(3), 227-236.
- World Health Organization. (2003). *World Health Report 2003-Shaping the future*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization, & Alzheimer's Disease International. (2012). *Dementia: a public health priority* (World Health Organization Ed.). Geneva: World Health Organization.
- Wyss-Coray, T., Lin, C., von Euw, D., Masliah, E., Mucke, L., & Lacombe, P. (2000). Alzheimer's disease-like cerebrovascular pathology in transforming growth factor-beta 1 transgenic mice and functional metabolic correlates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 903, 317-323.

- Wyss-Coray, T., Yan, F., Lin, A. H., Lambris, J. D., Alexander, J. J., Quigg, R. J., & Masliah, E. (2002). Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10837-10842.
- Xia, M. Q., & Hyman, B. T. (1999). Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *Journal of Neurovirology*, 5(1), 32-41.
- Yan, S. D., Chen, X., Schmidt, A. M., Brett, J., Godman, G., Zou, Y. S., . . . Stern, D. (1994). Glycated tau-protein in Alzheimer-disease - a mechanism for induction of oxidant stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7787-7791.
- Yan, S. D., Zhu, H. J., Fu, J., Yan, S. F., Roher, A., Tourtellotte, W. W., . . . Schmidt, A. M. (1997). Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: A proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5296-5301.
- Yang, C. S., Wang, H., Li, G. X., Yang, Z., Guan, F., & Jin, H. (2011). Cancer prevention by tea: Evidence from laboratory studies. *Pharmacological Research*, 64(2), 113-122.
- Yang, F., de Villiers, W. J., McClain, C. J., & Varilek, G. W. (1998). Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *The Journal of Nutrition*, 128(12), 2334-2340.
- Yang, Z., Zhang, Z., Penniston, K. L., Binkley, N., & Tanumihardjo, S. A. (2008). Serum carotenoid concentrations in postmenopausal women from the United States with and without osteoporosis. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 78(3), 105-111.
- Yao, Y. M., Clark, C. M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., & Pratico, D. (2005). Elevation of 12/15 lipoxygenase products in AD and mild cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 58(4), 623-626.

- Yermakova, A., & O'Banion, M. K. (2000). Cyclooxygenases in the central nervous system: implications for treatment of neurological disorders. *Current Pharmaceutical Design*, 6(17), 1755-1776.
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944-5972.
- Young, A. J., & Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 20-27.
- Yu, B. P., & Chung, H. Y. (2001). Oxidative stress and vascular aging. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 54, S73-S80.
- Yuan, J. M., Ross, R. K., Gao, Y. T., Qu, Y. H., Chu, X. D., & Yu, M. C. (2004). Prediagnostic levels of serum micronutrients in relation to risk of gastric cancer in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 13(11 Pt 1), 1772-1780.
- Zago, M. P., & Oteiza, P. I. (2001). The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(2), 266-274.
- Zambrano, N., Gianni, D., Bruni, P., Passaro, F., Telese, F., & Russo, T. (2004). Fe65 is not involved in the platelet-derived growth factor-induced processing of Alzheimer's amyloid precursor protein, which activates its caspase-directed cleavage. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16161-16169.
- Zentella, M., & Saldaña, Y. (1996). Papel fisiológico de los radicales libres. *Boletín de Educación Bioquímica*, 15(4), 152-161.
- Zhou, J., Zhang, S., Zhao, X., & Wei, T. (2008). Melatonin impairs NADPH oxidase assembly and decreases superoxide anion production in microglia exposed to amyloid-beta1-42. *Journal of Pineal Research*, 45(2), 157-165.
- Zou, Y., Kim, D. H., Jung, K. J., Heo, H. S., Kim, C. H., Baik, H. S., . . . Chung, H. Y. (2009). Lysophosphatidylcholine enhances oxidative stress via the 5-lipoxygenase pathway in rat aorta during aging. *Rejuvenation Research*, 12(1), 15-24.

8.2. RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

- Anese, M., Manzocco, L., Nicoli, M. C., & Lerici, C. R. (1999). Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(5), 750-754.
- Angelopoulos, P., Agouridaki, H., Vaiopoulos, H., Siskou, E., Doutsou, K., Costa, V., & Baloyiannis, S. I. (2008). Cytokines in Alzheimer's disease and vascular dementia. *The International Journal of Neuroscience*, 118(12), 1659-1672.
- Arena, E., Fallico, B., & Maccarone, E. (1999). L'attività antiossidante dei succhi di arance pigmentate. In Porretta, S. (Ed.), *Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare* (pp. 995-999). Vol. IV. Pinerolo, Italy: Chiriotti Editori.
- Atluru, S., & Atluru, D. (1991). Evidence that genistein, a protein-tyrosine kinase inhibitor, inhibits CD28 monoclonal-antibody-stimulated human T cell proliferation. *Transplantation*, 51(2), 448-450.
- Baranowska-Bik, A., Bik, W., Wolinska-Witort, E., Martynska, L., Chmielowska, M., Barcikowska, M., & Baranowska, B. (2008). Plasma beta amyloid and cytokine profile in women with Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinology Letters*, 29(1), 75-79.
- Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2011). Elucidation of the flavonoid and furocoumarin composition and radical-scavenging activity of green and ripe chinotto (*Citrus myrtifolia* Raf.) fruit tissues, leaves and seeds. *Food Chemistry*, 129(4), 1504-1512.
- Bonotis, K., Krikki, E., Holeva, V., Agouridaki, C., Costa, V., & Baloyannis, S. (2008). Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *Journal of Neuroimmunology*, 193(1-2), 183-187.
- Bordignon-Luiz, M. T., Gauche, C., Gris, E. F., & Falcão, L. D. (2007). Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 594-599.
- Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V., & Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84(1), 99-105.

- Dixon, R. A., Xie, D. Y., & Sharma, S. B. (2005). Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research? *The New Phytologist*, 165(1), 9-28.
- Dominguez-Perles, R., Moreno, D. A., Carvajal, M., & Garcia-Viguera, C. (2011). Composition and antioxidant capacity of a novel beverage produced with green tea and minimally-processed byproducts of broccoli. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 361-368.
- Friedman, M., Levin, C. E., Lee, S. U., & Kozukue, N. (2009). Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months. *Journal of Food Science*, 74(2), H47-51.
- García-Viguera, C., Zafrilla, P., Artés, F., Romero, F., Abellán, P., & Tomás-Barberán, F. A. (1998). Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(4), 565-573.
- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2012). A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 279-286.
- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2014). Evaluation of sensorial, phytochemical and biological properties of new isotonic beverages enriched with lemon and berries during shelf life. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1090-1100.
- Hakim, I. A., Harris, R. B., Brown, S., Chow, H. H., Wiseman, S., Agarwal, S., & Talbot, W. (2003). Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *The Journal of Nutrition*, 133(10), 3303S-3309S.
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 89-143.
- Hong Byun, E., Fujimura, Y., Yamada, K., & Tachibana, H. (2010). TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. *The Journal of Immunology*, 185(1), 33-45.

- Kabasakalis, V., Siopidou, D., & Moshatou, E. (2000). Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*, 70(3), 325-328.
- Kishido, T., Unno, K., Yoshida, H., Choba, D., Fukutomi, R., Asahina, S., . . . Hoshino, M. (2007). Decline in glutathione peroxidase activity is a reason for brain senescence: consumption of green tea catechin prevents the decline in its activity and protein oxidative damage in ageing mouse brain. *Biogerontology*, 8(4), 423-430.
- Klaunig, J. E., Xu, Y., Han, C., Kamendulis, L. M., Chen, J., Heiser, C., . . . Mohler, E. R., 3rd. (1999). The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 220(4), 249-254.
- Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., & Gliszczyńska-Świgło, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 313-322.
- Licastro, F., Pedrini, S., Caputo, L., Annoni, G., Davis, L. J., Ferri, C., ... Grimaldi, L. M. (2000). Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *Journal of Neuroimmunology*, 103(1), 97-102.
- Manuel y Keenoy, B., Vertommen, J., & De Leeuw, I. (1999). The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in Type 1 diabetic patients. *Diabetes, Nutrition & Metabolism*, 12(4), 256-263.
- McGeer, E., & McGeer, P. (1997). Inflammatory Cytokines in the CNS. *CNS Drugs*, 7(3), 214-228.
- Nagasawa, T., Hayashi, H., Fujimaki, N., Nishizawa, N., & Kitts, D. D. (2000). Induction of oxidatively modified proteins in skeletal muscle by electrical stimulation and its suppression by dietary supplementation of (-)-epigallocatechin gallate. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(5), 1004-1010.

- Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66(17), 2012-2031.
- Parvez, S., Tabassum, H., Rehman, H., Banerjee, B. D., Athar, M., & Raisuddin, S. (2006). Catechin prevents tamoxifen-induced oxidative stress and biochemical perturbations in mice. *Toxicology*, 225(2-3), 109-118.
- Poei-Langston, M. S., & Wrolstad, R. E. (1981). Color Degradation in an Ascorbic Acid-Anthocyanin-Flavanol Model System. *Journal of Food Science*, 46(4), 1218-1236.
- Praticò, D., Clark, C. M., Liun, F., Rokach, J., Lee, V. Y., & Trojanowski, J. Q. (2002). Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 59(6), 972-976.
- Raneva, V. G., & Shimasaki, H. (2005). Green tea catechins decrease lipid peroxidation in plasma and organs of C57BL/6J mice fed atherogenic diet. *Journal of Oleo Science*, 54(12), 641-648.
- Real Decreto 667/1983, de 2 de marzo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de zumos de frutas y de otros vegetales y de sus derivados. Real Decreto, BOE 77 de 31 de marzo, 1983; referencia 1983/09198, pp. 9196-9200.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
- Roberts, L. J., 2nd, Oates, J. A., Linton, M. F., Fazio, S., Meador, B. P., Gross, M. D., . . . Morrow, J. D. (2007). The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(10), 1388-1393.
- Rota, E., Bellone, G., Rocca, P., Bergamasco, B., Emanuelli, G., & Ferrero, P. (2006). Increased intrathecal TGF-beta1, but not IL-12, IFN-gamma and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients. *Neurological Sciences*, 27(1), 33-39.
- Sala, G., Galimberti, G., Canevari, C., Raggi, M. E., Isella, V., Facheris, M., . . . Ferrarese, C. (2003). Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: correlation with disease severity. *Neurobiology of Aging*, 24(7), 909-914.

- Singh, V. K., & Guthikonda, P. (1997). Circulating cytokines in Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatric Research*, 31(6), 657-660.
- Srividhya, R., Jyothilakshmi, V., Arulmathi, K., Senthilkumaran, V., & Kalaiselvi, P. (2008). Attenuation of senescence-induced oxidative exacerbations in aged rat brain by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(2), 217-223.
- Sung, S., Yao, Y., Uryu, K., Yang, H., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., & Praticò, D. (2004). Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces A β levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 18(2), 323-325.
- Verbeek, R., Plomp, A. C., van Tol, E. A., & van Noort, J. M. (2004). The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. *Biochemical Pharmacology*, 68(4), 621-629.
- Wayner, D. D., Burton, G. W., Ingold, K. U., Barclay, L. R., & Locke, S. J. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et biophysica acta*, 924(3), 408-419.
- Wullner, U., Seyfried, J., Groscurth, P., Beinroth, S., Winter, S., Gleichmann, M., . . . Klockgether, T. (1999). Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Research*, 826(1), 53-62.
- Xu, Y., Zhang, J. J., Xiong, L., Zhang, L., Sun, D., & Liu, H. (2010). Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(8), 741-748.
- Zhao, B. L., Li, X. J., He, R. G., Cheng, S. J., & Xin, W. J. (1989). Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell biophysics*, 14(2), 175-185.

9. CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES

9. CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES

- Artículos que constituyen el cuerpo de la tesis:

Artículo 1

Rubio-Perez, J. M., Vidal-Guevara, M. L., Zafrilla, P., & Morillas-Ruiz, J. M. (2014). A new antioxidant beverage produced with green tea and apple. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(5), 552-557.

Datos Index: Fuente JCR (2014). FI: **1.206**. Food Science & Technology: Q3. Posición 63 de 123.

Artículo 2

Rubio-Perez, J. M., Albaladejo, M. D., Zafrilla, P., Vidal-Guevara, M. L., & Morillas-Ruiz, J. M. (2015). Effects of an antioxidant beverage on biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's patients. *European Journal of Nutrition*, doi:10.1007/s00394-015-1024-9

Datos Index: Fuente JCR (2014). FI: **3.467**. Nutrition & Dietetics: Q1. Posición 16 de 77.

Artículo 3

Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2013). Serum cytokine profile in Alzheimer's disease patients after ingestion of an antioxidant beverage. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 12(8), 1233-1241.

Datos Index: Fuente JCR (2014). FI: **2.628**. Pharmacology & Pharmacy: Q2. Posición 107 de 254.

- Otros artículos publicados o aceptados para su publicación derivados del proyecto de tesis:

Artículo 4

Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2014). Oxidative damage in Alzheimer's disease. *Therapeutic Targets for Neurological Diseases*, doi: 10.14800/ttnd.246

Artículo 5

Rubio-Perez, J. M., Zafrilla, P., Palacio-Vales, P., & Morillas-Ruiz, J. M. (2013). Nutritional evaluation of daily intake in Alzheimer's patients. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63(suppl 1), 1175.

Datos Index: Fuente JCR (2014). FI: **2.618**. Nutrition & Dietetics: Q2. Posición 34 de 77.

Artículo 6

Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *The Scientific World Journal*, 2012, 756357.

Datos Index: Fuente Google Académico (2015). Índice h5:42; Mediana h5:52.

Artículo 7

Morillas-Ruiz, J. M., Rubio-Perez, J. M., Albaladejo, M. D., Zafrilla, P., Parra, S., & Vidal-Guevara, M.L. (2010). Effect of an antioxidant drink on homocysteine levels in Alzheimer's patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 299(1-2), 175-178.

Datos Index: Fuente JCR (2014). FI: **2.474**. Clinical Neurology: Q2. Posición 82 de 192.

Artículo 8

Zafrilla, P., Morillas, J. M., Rubio-Perez, J. M., & Cantos Villar, E. (2009). Ingredients for functional drinks in neurodegenerative diseases: a review. *Natural Product Communications*, 4(5), 719-740.

Datos Index: Fuente JCR (2014). FI: **0.906**. Food Science & Technology: Q3. Posición 76 de 123.

