



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas
Posgrado en Ciencias Químicas
Área de Bioquímica y Biología Molecular

Laboratorio de Investigaciones
Químico-Clínicas

Tesis presentada para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Químicas

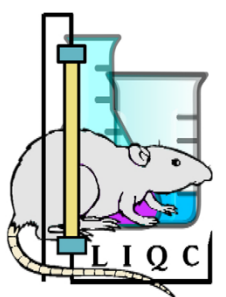
***“Administración crónica del resveratrol como una
molécula antienvjecimiento en hipocampo de ratas
Wistar”***

Presenta:

Q.F.B. Ivan Cesar Arteaga

Director de tesis:

D.C. Samuel Treviño Mora



LABORATORIO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO CLÍNICAS

Mayo, 2022

Índice

RESUMEN.....	1
1.INTRODUCCIÓN.....	2
Envejecimiento	2
Características del envejecimiento	3
Genética y envejecimiento	5
Teorías del envejecimiento	7
Teoría neuroendocrina	7
Teoría de radicales libres.....	7
Estrés oxidante	8
Óxido nítrico (\bullet NO).....	8
Peroxidación lipídica.....	10
Antioxidantes endógenos	11
Superóxido dismutasa	11
Catalasa	12
Sistema de Glutación	14
Glutación peroxidasa.....	15
Glutación reductasa.....	16
Glutación-S-Transferasa.....	16
Alteración del sistema endógeno antioxidante	18
Senescencia celular	18
Muerte celular programada	19
Mitocondria y estrés oxidativo	22
El estrés oxidativo mitocondrial y la disfunción en el cerebro envejecido.....	27
Producción de ROS en diferentes regiones del cerebro.....	28
Hipocampo	30
Función del hipocampo.....	31
Antioxidantes exógenos.....	32
Resveratrol.....	32
2. JUSTIFICACIÓN	35
3. HIPOTESIS	36
4. OBJETIVO GENERAL	37
5. OBJETIVOS ESPECIFICOS	37
6. METODOLOGÍA	38
Administración de Animales	39

Conformación de grupos	39
Sacrificio.....	40
Pruebas conductuales.....	40
Campo abierto	40
Prueba de reconocimiento de objeto novedoso.....	40
Análisis Bioquímico.....	41
Cuantificación de proteínas totales.....	41
Cuantificación de nitritos	41
Determinación de MDA+ 4-HDA	41
Análisis Enzimático	42
Determinación de la Actividad enzimática de Catalasa	42
Determinación de la Actividad de Superóxido Dismutasa	42
Determinación de la Actividad enzimática de Glutación transferasa.....	43
Determinación de la Actividad enzimática de Glutación reductasa	43
Determinación de la Actividad enzimática de Glutación peroxidasa	43
Estudio Histológico.....	44
Inclusión en parafina	44
Tinción de Hematoxilina Eosina	44
Tinción con Naranja de Acridina	45
Análisis estadístico	45
7. RESULTADOS.....	46
Parámetros fisiológicos	46
El tratamiento con resveratrol previene el deterioro motor y cognitivo.....	47
Actividad locomotora	47
Memoria de corto plazo	48
Memoria de largo plazo	49
Efecto del resveratrol sobre el estado redox en tejido hipocampal durante el envejecimiento.	50
Una administración de resveratrol reduce los cambios morfológicos en el hipocampo en el envejecimiento.	54
El resveratrol previene la muerte neuronal del hipocampo en la región de GD, CA3 y CA1.	59
8. DISCUSIÓN.....	60
9. CONCLUSIÓN.....	87
10. REFERENCIAS	88

Índice de figuras

Figura 1. Distribución porcentual de la población de 60 años y más por sexo según grupos de edad en México	3
Figura 2 Síntesis de óxido nítrico (NO) y productos relacionados.	10
Figura 3. Proceso de lipoperoxidación. La lipoperoxidación comienza cuando iniciadores como ROS y RNS generan un radical de ácido graso que reacciona rápidamente con oxígeno molecular, creando un radical peroxilo R-OO*	11
Figura 4. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y autodefensa del organismo por enzimas endógenas	14
Figura 5. Mecanismo celular de la actividad de glutatión y sus enzimas	17
Figura 6. Muerte celular programada o apoptosis.....	22
Figura 7: Una disfunción mitocondrial causada por daño al DNA mitocondrial incrementa la producción de ROS	23
Figura 8. Hipocampo de Rattus Norvergicus.....	31
Figura 9. Estructura del trans-resveratrol.....	33
Figura 10. Efecto del resveratrol en el proceso de envejecimiento.....	46
Figura 11. Actividad locomotora de los grupos experimentales en relación a la edad.....	47
Figura 12. Evaluación de la memoria de corto plazo por la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NOR)	48
Figura 13. Evaluación de la memoria de largo plazo por la prueba de reconocimiento de objeto novedos (NOR).	50
Figura 14. Efecto del resveratrol en niveles de lipoperoxidación.....	50
Figura 15. Efecto del resveratrol sobre los niveles de nitritos.	51
Figura 16. Impacto de la administración con resveratrol sobre la actividad de enzimas antioxidantes A) Superóxido dismutasa (SOD) y B) Catalasa (CAT) durante el envejecimiento	52
Figura 17. Efecto del resveratrol sobre el sistema antioxidante de glutatión.....	53
Figura 18. Efecto del resveratrol sobre el número y la organización celular en la región de GD del hipocampo durante el proceso de envejecimiento	56
Figura 19. Efecto del resveratrol sobre el número y la organización celular en la región de CA3 del hipocampo durante el proceso de envejecimiento	57
Figura 20. Efecto del resveratrol sobre el número y la organización celular en la región de CA1 del hipocampo durante el proceso de envejecimiento	58
Figura 21. El resveratrol protege de la muerte celular durante el envejecimiento.....	59

ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
EP	Enfermedad de Parkinson
EH	Enfermedad de Huntington
EMJ	Enfermedad de Machado-Joseph
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
NAD ⁺	Nicotín adenín dinucleótido
RC	Restricción calórica
LCAD	AcilCoA deshidrogenasa de cadena larga
GDH	Glutamato deshidrogenasa
ATP	Adenosín Trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADNr	ADN ribosómico
MCP	Muerte celular programada
O ₂ ⁻	Anión superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO [·]	Radical hidroxilo
NO	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
MDA	Malondialdehído
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
CAT	Catalasa
SOD	Superóxido dismutasa
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación transferasa
SNC	Sistema nervioso central
NaCl	Cloruro de sodio

RESUMEN

En el envejecimiento un organismo sufre una serie de modificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. El envejecimiento cerebral se considera la principal causa de deterioro cognitivo y un factor de riesgo para desarrollar algún trastorno neurodegenerativo. Se han propuesto diversas teorías relacionadas con el envejecimiento, una de las más estudiadas es la relacionada al estrés oxidante. En este sentido la acumulación de radicales libres promueve la progresión de procesos oxidativos como la lipoperoxidación y el consecuente daño a las macromoléculas. Para contrarrestar este daño, el sistema antioxidante endógeno mantiene el estado homeostático en el organismo, sin embargo, con la edad la eficacia de este sistema disminuye y se requiere de apoyo externo mediante terapias preventivas como los antioxidantes exógenos. El resveratrol un importante antioxidante que ha demostrado funciones antienvjecimiento, por ello en este trabajo nos planteamos el objetivo de evaluar el efecto de la administración crónica con resveratrol sobre el daño celular asociado al envejecimiento en hipocampo de ratas Wistar. 216 ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad, fueron divididas aleatoriamente en 3 grupos: control; vehículo (etanol 7.5%) y resveratrol (10mg/kg de peso + etanol 7.5%). Los periodos de administración fueron por 2 y hasta 18 meses. Se realizaron pruebas conductuales, bioquímicas, enzimáticas e histológicas. Los resultados mostraron que un tratamiento crónico con resveratrol en una dosis de 10 mg/kg de peso genera un efecto protector de las células hipocampales en ratas macho de la cepa Wistar ya que mejora la esperanza de vida, el desempeño cognitivo en la memoria de corto y largo plazo, disminuye moléculas oxidantes y mejorar la actividad enzimática antioxidante. Adicionalmente, se mostró una disminución del daño y muerte celular en las subregiones CA1, CA3 y GD del hipocampo. Este trabajo permite incrementar el conocimiento del papel del resveratrol como una molécula neuroprotectora, la cual previene el proceso de neurodegeneración.

1.INTRODUCCIÓN

Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso gradual y adaptativo que se caracteriza por un declive de la respuesta homeostática de un organismo, que sufre una serie de modificaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas, propiciadas a su vez por los cambios inherentes a la edad y por el desgaste acumulado ante los retos que enfrenta el organismo en un ambiente determinado [Fajemiroye, et al., 2018].

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas (ONU), los 60 años se han establecido como pauta de edad a partir de la cual se puede considerar que una persona es adulta mayor, aunque en los países desarrollados se considera que la vejez empieza a los 65 años [Gobierno de la Ciudad de México, 2019]. De la misma forma, la Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere dentro de sus definiciones que las personas de 60 a 74 años ya son consideradas de edad avanzada, de 75 a 90 son denominadas viejas o ancianas, y las que sobrepasan los 90 se les asigna el término de grandes viejos o grandes longevos [Quintanar, 2010].

El informe mundial sobre el envejecimiento publicado por la OMS en 2021 indica que la cifra de personas de 60 años o más aumentará en un 34%, pasando de 1000 millones en 2019 a 1400 millones en 2030. Se estima que, en el año 2050, la población de adultos mayores será más del doble a la que existe actualmente y alcanzará los 2100 millones de personas, esto a nivel mundial [OMS 2020]. Según la ONU, cuando una población mayor de 60 años supera el 7% en un país, se considera que ese país está envejecido. Actualmente, en México el 12% de la población total corresponde a las personas adultas mayores de 60 años o más, y se espera que en las siguientes décadas incremente esta población hasta en un 20% (Figura 1). Fijar la atención en el envejecimiento es ineludible, ya que las tendencias de crecimiento lo demuestran. Es primordial implementar estrategias

públicas que atiendan a este sector y afrontar los desafíos en materia económica, social y biológica que esto representa.

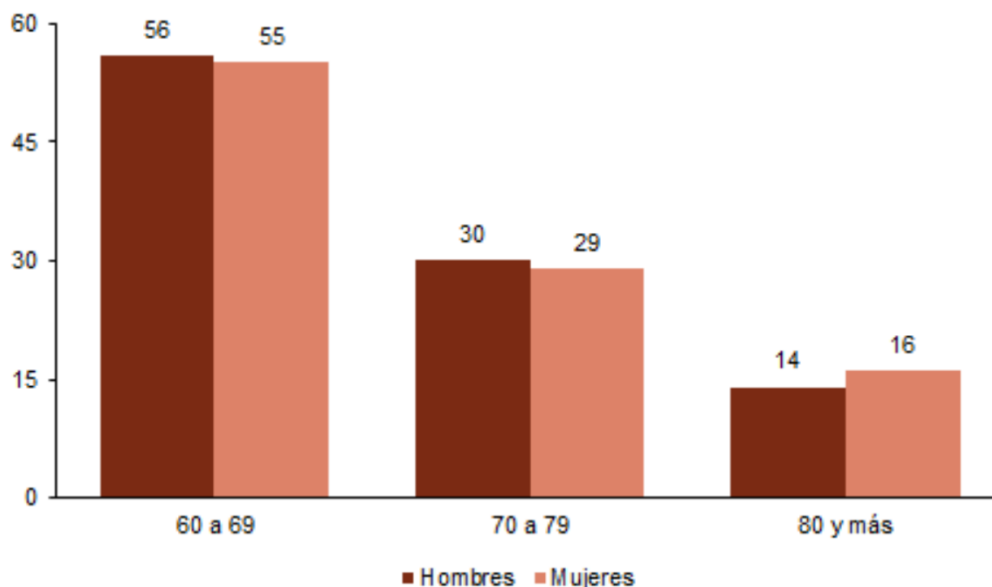


Figura 1. Distribución porcentual de la población de 60 años y más por sexo según grupos de edad en México. Fuente: INEGI. Censo de Población y Vivienda 2020.

A pesar de que en las últimas décadas la esperanza de vida se ha incrementado, no se garantiza que toda esta población envejezca con una vida plena y digna, debido a que la mayoría de estas personas se encuentran en países en vías de desarrollo y, por lo tanto, no tienen acceso a los recursos básicos necesarios, por lo que se enfrentan a numerosos obstáculos que le impiden participar plenamente en la sociedad. Cabe señalar que “La vejez en los seres humanos es un constructo biológico y social; de esta manera, se entiende como un proceso fisiológico que se ensambla con diversos factores: nivel de actividad física, cuadros patológicos, estado genético, interacción social, entre otros” [Cuecuecha y Díaz, 2017].

Características del envejecimiento

Durante el envejecimiento ocurren cambios fisiológicos en todos los órganos y sistemas. El gasto cardíaco disminuye, aumento de la presión arterial y una mayor susceptibilidad de desarrollar patologías como arterioesclerosis [Homan, et al., 2018]. Los pulmones muestran alteración del intercambio gaseoso, disminución de

la capacidad vital y tasas de flujo espiratorio más lentas [Sharma, et al., 2006]. El aclaramiento de creatinina disminuye con la edad, aunque el nivel de creatinina sérica permanece relativamente constante debido a una disminución proporcional de la producción de creatinina relacionada con la edad [Kamasaki, et al., 2012; Shahbaz & Gupta, 2020]. También, se han reportado pérdida de la integridad de la barrera intestinal como: patrones de motilidad alterados, generación de gastritis atrófica y metabolismo hepático disminuido son comunes en los ancianos [Boss & Seegmiller, 1981]. Los cambios degenerativos en articulaciones, combinado con la pérdida de masa muscular impactan sobre la locomoción de los individuos [Larsson, et al., 2019].

Por otro lado, este proceso se ha asociado con trastornos neurológicos, ya que se reduce la capacidad del cerebro para transmitir señales y comunicarse. La pérdida de la función cerebral es el mayor temor entre los ancianos, ya que incluye la pérdida de la propia personalidad por demencia (generalmente la enfermedad de Alzheimer) [Murman, 2015]. Muchas otras condiciones neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o un accidente cerebrovascular también son cada vez más comunes con la edad.

Las habilidades cognitivas se pueden dividir en varios dominios específicos que incluyen la atención, la memoria, la función cognitiva ejecutiva, el lenguaje y las habilidades visuoespaciales [Bigler, 2012]. Cada uno de estos dominios tiene disminuciones medibles con la edad. Para cada uno de estos dominios, un sujeto primero debe percibir el estímulo, procesar la información y luego responder. Tanto la percepción sensorial como la velocidad de procesamiento disminuyen con la edad, lo que afecta el rendimiento de las pruebas en los dominios cognitivos. En los últimos 30 años, la investigación sobre el envejecimiento ha pasado de identificar fenotipos subyacentes a la genética concomitante a este fenómeno [Campisi et al., 2019; Kapahi et al 2010; Kritsilis et al., 2018].

Genética y envejecimiento

Tom Johnson, fue un pionero en la investigación de la genética del envejecimiento y la longevidad, estudió grupos de *C. elegans* donde pudo separar a los individuos de vida larga de los sujetos de vida corta, los diversos estudios de Johnson demostraron claramente que la variabilidad genética sí podría afectar la esperanza de vida [Kenyon, 2011]. Inicialmente se realizaron investigaciones en levaduras, *C. elegans*, drosophila y ratones y esto permitió destacar numerosos genes, si estos mutan podrían afectar la vida útil [Passarino, et al., 2016]. Luego de la caracterización de estos genes en *C. elegans*, se encontró que en ratones el ortólogo de *daf16* (FOXO) podría afectar la vida útil. En los mamíferos, FOXO se correlaciona con el eje factor de crecimiento insulínico tipo 1 (Insulina/IGF-1) que es estimulado por la disponibilidad de nutrientes y, a través de FOXO, promueve la síntesis de proteínas [Taguchi, et al., 2007; Kenyon, 2010].

Cabe señalar que algunos autores sugirieron que estos mecanismos moleculares que modulan la vida útil podrían deberse a un efecto pleiotrópico de genes que han evolucionado para diferentes propósitos (como los genes en la vía IGF-1 que han evolucionado para enfrentar la presencia/ausencia de nutrientes) pero puede, en última instancia, afectar la vida útil; otros propusieron que algunos genes pueden haber evolucionado para programar el envejecimiento y evitar la "inmortalidad", ya que esto dificultaría la sustitución continua de sujetos viejos por otros más jóvenes [Rose, et al., 2002; Skulachov, 2001].

Era inevitable que la investigación de la base genética de la longevidad se dirigiera a los seres humanos e investigara si la variabilidad genética común de las poblaciones humanas podría afectar las diferencias interindividuales en la duración de la vida, pero también si los genes encontrados para prolongar la duración de la vida en organismos modelo, a su vez, se correlacionan con la esperanza de vida humana [Passarino, et al., 2016].

Las células están constantemente expuestas a un entorno nocivo durante toda su vida. El aumento del daño celular contribuye a la disfunción que caracteriza

al cuerpo que envejece [Li, et al., 2009]. El mejor ejemplo de daño en el ADN como causa del envejecimiento son los síndromes progeroides, que son causados por una deficiencia en los mecanismos involucrados en la reparación del ADN y cuyos síntomas comienzan temprano en la vida [Agherbi, et al., 2009].

Las mutaciones en ciertos genes confieren una mayor resistencia al estrés y una tasa reducida de acumulación de daños, lo que aumenta la longevidad. Por ejemplo, la mutación en el gen que codifica la proteína de respuesta al estrés oxidativo p66^{shc}, que prolonga la vida y protege de una variedad de enfermedades asociadas con el envejecimiento en ratones, mejora la resistencia a la apoptosis después del estrés oxidativo en células cultivadas *in vitro* [Trinei, et al., 2009].

Por otro lado, el envejecimiento del cerebro humano es una de las causas del deterioro cognitivo y el principal factor de riesgo de desarrollar algún trastorno neurodegenerativo. El momento de la vida en que comienza el envejecimiento del cerebro no está definido, sin embargo, Lu, et al., 2004, mostraron que el perfil transcripcional de la corteza frontal humana de individuos de 26 a 106 años define un conjunto de genes con expresión reducida después de los 40 años. Estos genes juegan un papel central en la plasticidad sináptica, transporte vesicular y la función mitocondrial, a esto le sigue la inducción de genes de respuesta al estrés, antioxidantes y de reparación del ADN.

De hecho, una serie de sólidos estudios celulares, moleculares y genéticos han revelado cinco genes asociados significativamente con la edad, estos son: RHBDL3, NR3C2, GPX3, VPS18 y TMEM106B [Kumar, et al., 2012]. Este último desempeña un papel fundamental en la regulación de la dinámica de los lisosomas *in vitro* e *in vivo*, y TMEM106B está asociado con el envejecimiento cerebral y múltiples trastornos cerebrales [Feng, et al., 2021]. Con ello, se ha revelado una compleja red de vías de señalización, proponiéndose diversas teorías relacionadas con el envejecimiento. Una de las más estudiadas es la relacionada al estrés oxidante.

Teorías del envejecimiento

Teoría neuroendocrina

Esta teoría fue desarrollada por Vladimir Dilman donde postula que los ajustes homeostáticos del cuerpo disminuyen con el envejecimiento, lo que conduce a una falla en los mecanismos de adaptación, envejecimiento y muerte. De acuerdo con esta teoría, el eje hipotálamo-pituitario (HPA), el principal sistema regulador que controla la homeostasis en los seres humanos pierde eficiencia con el envejecimiento, lo que resulta en aumento del número y la gravedad de las respuestas patológicas a cambios corporales y una disminución de múltiples funciones fisiológicas [Diggs, 2008; Dean, 2009].

Teoría de radicales libres

Esta teoría propone que el envejecimiento es el resultado acumulativo del daño oxidativo a las células y tejidos del cuerpo que surge principalmente como resultado del metabolismo aeróbico, fue escrita originalmente por el Dr. Denham Harman, en la década de los 50's.

Se han utilizado varias líneas de evidencia para respaldar esta hipótesis, incluidas las afirmaciones de que: **(1)** la variación en la duración de la vida de especies se correlaciona con la tasa metabólica y la actividad antioxidante protectora; **(2)** la mejora de expresión de enzimas antioxidantes en animales de experimentación puede producir un aumento significativo en la longevidad; **(3)** los niveles de daño celular por radicales libres aumentan con la edad; y **(4)** la ingesta reducida de calorías conduce a una disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a un aumento en la duración de la vida [Wickens, 2001; Vadim, 2014]. Se han desarrollado una gran cantidad de estudios que demuestran que las ROS y el daño oxidativo aumentan con la edad [Stadtman, 1992], y que la reducción del daño oxidativo prolonga la vida útil de varios organismos modelo (levadura, nematodos, moscas de la fruta, ratones, etc.), mientras que un aumento de la producción de ROS acorta la vida útil [Kirkwood & Kowald, 2012].

Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como el desequilibrio entre moléculas oxidantes y antioxidantes, que se genera como resultado de la producción excesiva de radicales libres y de un sistema antioxidante endógeno deficiente [Singh, Kukreti y Saso 2019]. El oxígeno (O_2) juega un papel importante en el funcionamiento celular y fisiológico de todos los organismos, participando en la transducción de señales, transcripción de genes y otras actividades celulares. Sin embargo, durante el metabolismo celular se forman radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que solo es moderadamente reactivo por sí mismo [Winterbourn, C. 2018], pero a su vez participa en diversas reacciones que producen una variedad de ROS y de nitrógeno (RNS) tales como: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot HO$), óxido nítrico ($\cdot NO$) y peroxinitrito ($ONOO^-$), a partir de los cuales se puede generar daño a las macromoléculas celulares [Singh, Kukreti and Saso 2019]. Entre los procesos de reacción, destacan la nitración de proteínas, cariorrexis, disfunción mitocondrial y lipoperoxidación, lo que conlleva a un incremento en la permeabilidad de la membrana y finalmente la muerte.

Óxido nítrico ($\cdot NO$)

El óxido nítrico es producido por tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS): endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). Las isoformas de óxido nítrico sintasa catalizan la oxidación dependiente de NADPH y tetrahidrobiopterina (BH_4) de L-arginina a L-citrulina, y producen $\cdot NO$ como uno de los productos de reacción (Fig. 2) [Chen, W. et al., 2014]. Múltiples factores están involucrados en la regulación de la actividad enzimática de la NOS, tales como la biodisponibilidad de sustrato y cofactores, los niveles de calcio, los niveles de proteína y la dimerización, así como modificaciones postraduccionales [Tenopoulou, M. and Doulias, P. 2020]. Se ha descrito que en ausencia de L-arginina o BH_4 , la eNOS se desacopla y la forma monomérica de la eNOS sintetiza al anión superóxido en lugar de $\cdot NO$ [Chen, W. et al., 2014].

La química del $\bullet\text{NO}$ engloba reacciones con radicales libres, diversas moléculas de señalización y de carácter nocivo, por lo que se trata de un conjunto de procesos muy complejos que incluyen numerosas reacciones potenciales con distintos efectos fisiológicos. Para ello es conveniente separar la química del $\bullet\text{NO}$ en efectos directos e indirectos [Wink, D y Mitchell, J. 1998]. Los efectos directos son los que resultan de aquellas reacciones en las que el $\bullet\text{NO}$ interactúa directamente con una molécula o diana biológica, mientras que los efectos indirectos derivan de aquellas reacciones mediadas por intermediarios derivados del $\bullet\text{NO}$ tales como las RNS, derivadas de la reacción del $\bullet\text{NO}$ con O_2^- o anión superóxido. Las células que contienen las isoformas eNOS o nNOS producen flujos relativamente pequeños de $\bullet\text{NO}$ y suelen generar efectos directos. Esta es la razón por la que, bajo condiciones fisiológicas, las células producen pequeñas pero significativas cantidades de $\bullet\text{NO}$ y solo trazas de RNS, y cuando la producción de $\bullet\text{NO}$ es lo suficientemente discreta, predominan los efectos directos en tejidos.

Por el contrario, en los tejidos en los que la isoforma iNOS está sobre expresada, como en el caso de inflamación crónica, cuadros patológicos y el envejecimiento, prevalecen los efectos indirectos que conducen a daños celulares. Con la edad, la producción de $\bullet\text{NO}$ se ve desregulada, por lo que esta molécula se convierte en un importante mediador de la fisiopatología asociada a procesos inflamatorios, así como a enfermedades crónico-degenerativas [Ghimire, K. et al., 2017]. Una reacción del $\bullet\text{NO}$ y O_2^- puede generar moléculas radicalarias como el anión peroxinitrito (ONOO^-), el cual es capaz de dañar en gran medida una amplia gama de elementos celulares, generando estrés nitrosativo y peroxidación lipídica.

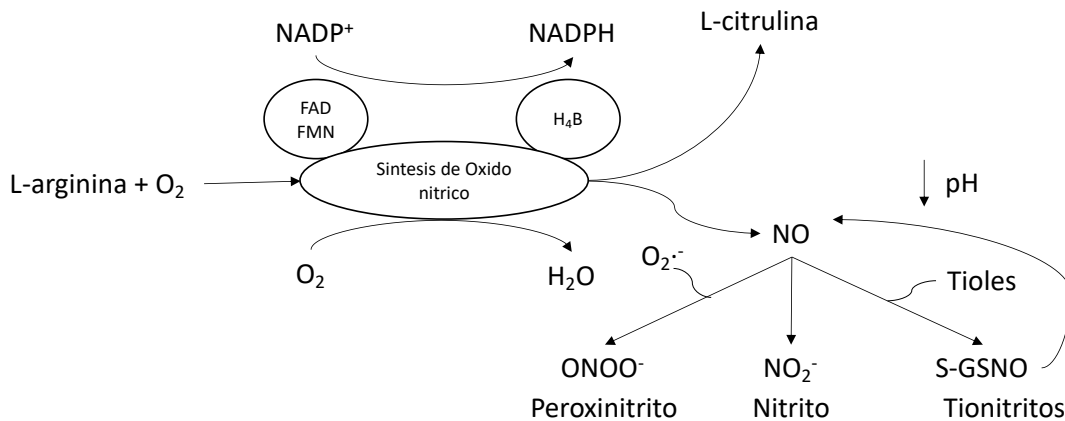


Figura 2. Síntesis de óxido nítrico (NO) y productos relacionados. Tomado y modificado de [Kharitonov, & Barnes, 2001].

Peroxidación lipídica

El exceso de radicales libres produce modificaciones adversas en los componentes celulares, tales como daño al ADN, proteínas y lípidos, que de manera conjunta aumentan la susceptibilidad de deterioro sistémico [Lundgren, C. et al., 2018]. Las membranas celulares, debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como ácido araquidónico, linoleico y docosehexaenoico, son especialmente susceptibles al daño causado por ROS. La lipoperoxidación es un proceso en el que los radicales libres capturan electrones de los lípidos y, posteriormente, producen intermediarios reactivos que pueden sufrir otras reacciones (figura3). La peroxidación lipídica daña los fosfolípidos directamente y también puede actuar como señal que induce muerte celular programada. Los fosfolípidos oxidados también pueden desempeñar un papel importante en muchas enfermedades inflamatorias y con frecuencia median cambios proinflamatorios [Que, X. et al., 2018]. Durante la lipoperoxidación y en condiciones fisiológicas, existen moléculas antioxidantes capaces de reducir la oxidación de ácidos grasos, atrapando radicales libres y en general cualquier molécula nociva, protegiendo de esta manera la membrana celular y el resto de los organelos. Los antioxidantes endógenos más importantes incluyen a diversas enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa y moléculas no enzimáticas como el tripéptido glutatión (GSH) [Su, L. et al., 2019].

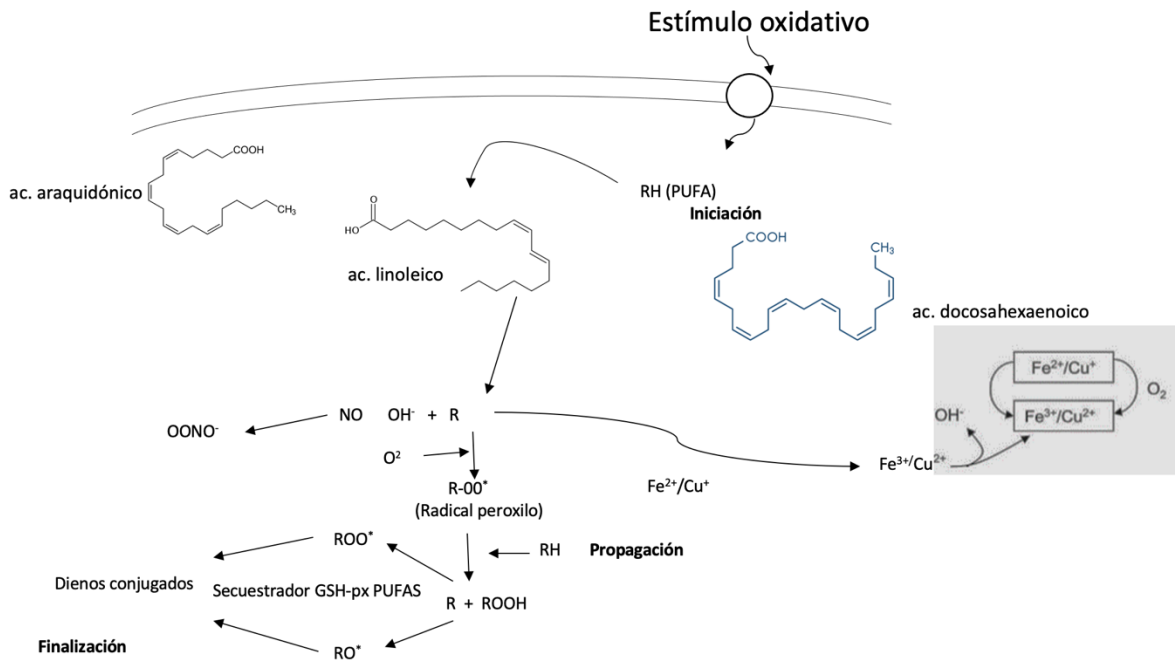


Figura 3. Proceso de lipoperoxidación. La lipoperoxidación comienza cuando iniciadores como ROS y RNS generan un radical de ácido graso que reacciona rápidamente con oxígeno molecular, creando un radical peroxilo R-OO*. Esta es una especie inestable, por lo que buscará estabilizarse al interactuar con otro ácido graso, dando lugar a otro ácido graso radical diferente y a un peróxido lipídico o un peróxido cíclico. Este ciclo continuo da lugar al proceso conocido como propagación. La reacción se detendrá cuando dos radicales reaccionen y produzcan una especie no radical o cuando intervenga un agente antioxidante como glutatión peroxidasa (GSH-px), dando lugar al paso de terminación.

Antioxidantes endógenos

Superóxido dismutasa

Los antioxidantes enzimáticos ejercen un efecto protector contra el daño oxidativo generado en la célula debido a su capacidad de contrarrestar los niveles radicales libres, ROS y RNS presentes en el ambiente celular. Las SOD pertenecen a la familia de isoenzimas implicadas en la captación de radicales de O₂ [Mondola, et al., 2016]. En mamíferos existen 3 isoformas de SOD, cada una con diferentes iones metálicos catalíticos: Cu/Zn-SOD ubicada en citosol, Mn-SOD principalmente en mitocondria y Cu/Zn-SOD ubicada en la matriz extracelular [Blackney, et al., 2014]. SOD es una enzima muy importante encargada de catalizar la conversión de O₂⁻ en O₂ y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) [Wang, Y. et al., 2018].

En organismos aerobios, muchas reacciones espontáneas y catalizadas enzimáticamente pueden dar lugar a $O_2^{\cdot-}$. Entre las principales fuentes de este incluyen la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el complejo NADPH oxidasa asociado a la membrana plasmática, la xantina oxidasa citosólica y las monooxigenasas del citocromo p450 [Holmström, KM y Finkel, T. 2014]. A pesar de su toxicidad potencial, el $O_2^{\cdot-}$ y algunos de sus derivados, especialmente del H_2O_2 , son moléculas de señalización que median una gran variedad de respuestas celulares. El $O_2^{\cdot-}$ no atraviesa fácilmente las membranas celulares y tiene una vida relativamente corta. Por el contrario, el H_2O_2 no tiene carga, es más estable y puede atravesar la membrana libremente, lo que lo convierte en una molécula más versátil.

La presencia de isoformas específicas de SOD en distintos compartimentos celulares destaca la necesidad de un control estricto de la homeostasis de ROS y sugiere un papel para ROS en la señalización entre compartimentos [Marinho, et al., 2014]. Sin embargo, a pH fisiológico, la reacción de $\bullet NO$ con $O_2^{\cdot-}$ ocurre tres veces más rápido que su descomposición por SOD [Beckman, J. 1996]. Además, el propio proceso de envejecimiento y la acumulación de daños favorecen una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ y una menor disponibilidad de SOD, lo que conlleva a una acumulación de H_2O_2 que posteriormente dará lugar a la formación de $\bullet HO^{\cdot}$, un radical altamente reactivo capaz de dañar membranas celulares (Fig. 4).

Catalasa

El H_2O_2 se produce en todos los tejidos, pero particularmente en el sistema nervioso central (SNC), se genera durante el metabolismo de las aminas, incluida la oxidación de las monoaminas [Tipton, 1968], y la oxidación de la glicina, sin dejar atrás la catálisis que es llevada a cabo por SOD. En condiciones fisiológicas, esta molécula es estable en un entorno abiótico, ya que por sí misma no reacciona con compuestos orgánicos (a excepción de grupos tioles selectos en algunas proteínas de señalización). Debido a esta característica, se presume que sería completamente inofensiva si no fuera por el hecho de que el hierro es altamente usado por todos los tipos de células [Andreini, et al., 2008].

La disponibilidad limitada del hierro Fe (III) obliga a las células a adquirirlo y almacenarlo activamente para mantener su metabolismo; esta restricción ocurre a nivel intracelular, donde la disponibilidad de Fe (II) libre es limitada y está estrictamente controlada. Sin embargo, cuando el Fe (II) libre interacciona con el H_2O_2 , se produce la reacción de Fenton y se desencadena la formación del radical $\bullet HO$ [González-Dávila et al., 2005].

La CAT es una enzima antioxidante ubicua, por lo que se encuentra presente en casi todos los organismos aeróbicos. Su función es la de descomponer dos moléculas de H_2O_2 en una molécula de O_2 y dos moléculas de H_2O . De esta manera, es capaz de disminuir y controlar la sobre producción de radicales altamente tóxicos para la célula (Fig. 4) [Deisseroth y Dounce 1970]. La actividad de CAT es similar en todos los tejidos, sin embargo, su expresión y disponibilidad de cofactor (hierro) y pH son elementos limitantes; ejemplo de ello es la CAT cerebral, la cual tiene una actividad extremadamente baja en comparación con otros tejidos y órganos como hígado, corazón y riñón, inclusive la actividad en eritrocitos es mayor que en cerebro. Aunque ciertos estudios han informado los cambios asociados con la edad en la actividad de CAT en el hipocampo, esta hipótesis no se ha dilucidado por completo.

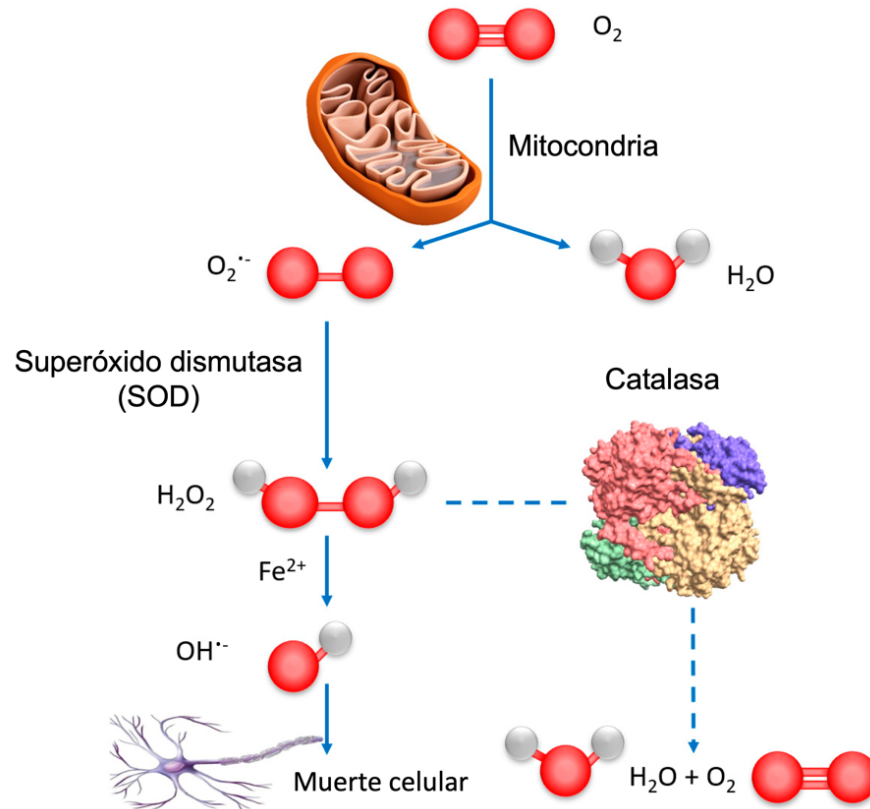


Figura 4. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y autodefensa del organismo por enzimas endógenas. Los niveles de ROS generados están principalmente vinculados a las mitocondrias. El radical superóxido $\bullet O_2^-$ se convierten en H_2O_2 (menos tóxico) por la enzima superóxido dismutasa (SOD). En presencia de Fe^{2+} , el H_2O_2 puede reducirse a $\bullet OH$, el cual es un ROS altamente reactivo que ataca a varias biomoléculas (proteínas, ADN y lípidos) y provoca la muerte celular. La catalasa bloquea ese camino y favorece la descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno. Tomado de [Rakotoarisoa et al., 2019]

Sistema de Glutatión

El GSH es un tripéptido que contiene cisteína, por lo que es el tiol no proteico más abundante que amortigua las ROS en los tejidos. Como se ha indicado este tripéptido se compone de tres aminoácidos, glutamato, cisteína y glicina, y juega un papel fundamental en los procesos fisiológicos como el mantenimiento del equilibrio redox, la reducción del estrés oxidante, la mejora de la desintoxicación metabólica y la regulación de la función del sistema inmunitario [Franci, R. et al., 2007]. El GSH se encuentra en concentraciones relativamente altas en múltiples tejidos corporales, por otro lado, varias enfermedades crónicas relacionadas con la edad, como la disfunción mitocondrial, cáncer, y neurodegenerativas, se han relacionado con niveles deficientes de glutatión [Pizorno J. 2014].

La primera enzima en la síntesis *de novo* del GSH es la γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS), que cataliza la unión del glutamato y la cisteína para formar γ -glutamilcisteína. La γ -glutamilcisteína y la glicina forman el GSH por la segunda enzima glutatión sintetasa (GS). El GSH es un producto tanto de la síntesis *de novo* como del ciclo redox del glutatión. El GSH es un inhibidor de retroalimentación no alostérico de la enzima GCS. En presencia de tioles como GSH, el puente disulfuro que conecta las subunidades pesada y ligera del heterodímero GCS se reduce, lo que lleva a un cambio conformacional dentro del sitio de unión al sustrato de GCS [Richman & Meister, 1975]. El sitio relajado de unión al sustrato puede acomodar tripéptidos como el GSH con mayor afinidad, lo que inhibe la unión al sustrato y conduce a una disminución de la síntesis de GSH. Por otro lado, durante la desintoxicación de radicales, la GPx reduce las ROS a expensas de GSH (especie reducida) para formar disulfuro de glutatión (GSSG), también referido como la especie oxidada de glutatión. El GSH se regenera mediante el reciclaje redox, en el que el GSSG se reduce a GSH mediante la acción de la glutatión reductasa (GR) con un consumo de un NADPH [Zhu et al., 2006].

Un factor que influye en el estado redox del glutatión es el grado de variabilidad en la capacidad de un individuo para producirlo, que va de la mano de la producción de enzimas involucradas en la generación y mantenimiento de GSH como: GST, GPx y GR. El mantenimiento del equilibrio redox celular es esencial para el destino de la propia célula. El estado redox celular a menudo se refiere al equilibrio de $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$, $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ y GSH / GSSG [Ortega, A. et al., 2011].

Glutatión peroxidasa

La GPx es una selenoproteína que funciona como agente reductor de peróxidos. Su ciclo catalítico involucra primero la reacción de la molécula de GSH con un ácido para generar un aducto de selenilo y posteriormente una segunda reacción con una segunda molécula de GSH para producir finalmente el selenol activo encargado de la reducción del peróxido. A nivel celular, la GPx es una enzima

que degrada el H_2O_2 a compuestos de hidroxilo no tóxicos, proceso en el que el GSH se convierte en GSSG, protegiendo así la estructura y función de las membranas celulares de la interferencia y el daño del peróxido de hidrógeno [Huanhuan, et al., 2019]. Asimismo, la GPx reduce los peróxidos lipídicos (Lípido-OOH) a alcoholes lipídicos no tóxicos (Lípido-OH) con GSH como sustrato. Este ciclo de transformación mutua permite la eliminación continua de radicales libres en las células (Fig. 5) [Traverso et al., 2013].

Glutación reductasa

La GR es una enzima esencial involucrada en el reciclaje del glutatión, transformando la forma oxidada de este compuesto de vuelta a su forma reducida. El mecanismo por el cual el GSSG es reducido nuevamente a GSH por acción de la GR está asociado a la oxidación de una molécula de NADPH a $NADP^+$, dando lugar al ciclo redox del glutatión para prevenir el daño oxidativo [Lu, 2009]. Por esta razón, su distribución sigue la tendencia de acumulación en regiones celulares de alto flujo de electrones, por lo que se localiza en citoplasma y dentro de orgánulos (mitocondria y núcleo) [Traverso et al., 2013].

Glutación-S-Transferasa

La GST cuenta con cuatro isoenzimas y que participa en diversas reacciones de conjugación de fase 2, dado que, sus sustratos son xenobióticos o productos del estrés oxidativo. Debido a esto, una de sus funciones principales es la conjugación del GSH con una gran variedad de compuestos electrofílicos. Las GST juegan un papel importante en la protección celular contra el estrés oxidativo [Cui et al., 2007]. La superfamilia humana de GST consta de al menos ocho isoformas y 16 subunidades que se encuentran en el citosol, mitocondrias y microsomas.

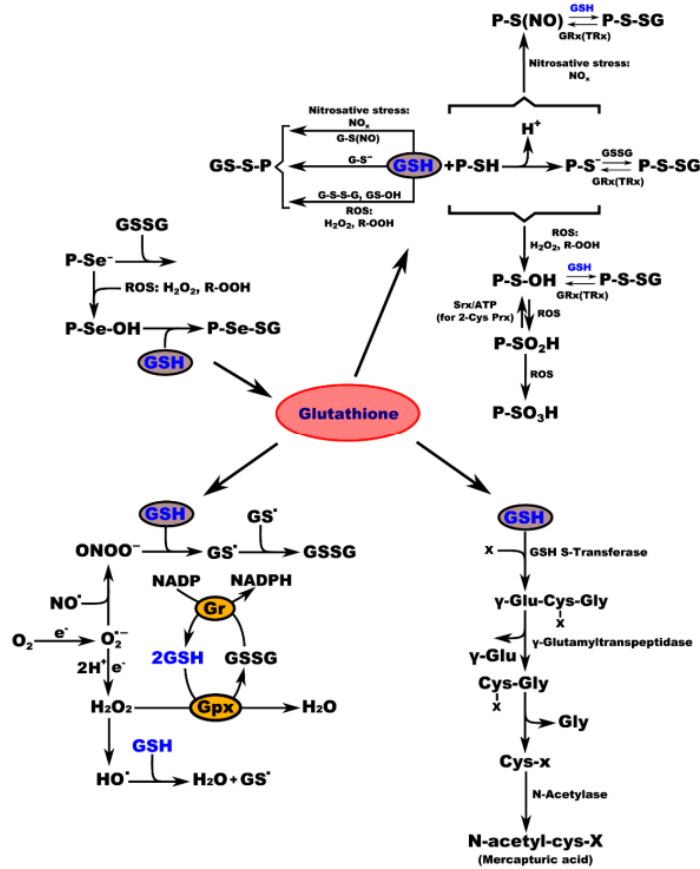


Figura 5. Mecanismo celular de la actividad de glutatión y sus enzimas. Tomada de Iskusnykh et al., 2022.

Las GST citosólicas son isoenzimas homo o heterodiméricas que se han asignado a siete clases principales: Alfa, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta y Zeta [Dourado et al., 2008; Hayes et al., 2005]. Las GST se encuentran en casi todos los tejidos; sin embargo, en el cerebro las isoenzimas Alfa, Mu y Pi muestran altos niveles de expresión. Curiosamente, la isoenzima Alfa solo está presente en el cerebro adulto, mientras que Pi se expresa en gran medida en el desarrollo cerebral temprano y es la isoenzima predominante en el cerebro [Carder et al., 1990; Theodore et al., 1985]. Las GST no solo metabolizan xenobióticos, sino que también desintoxican compuestos endógenos como lípidos peroxidados y proteínas oxidadas. Además, la GST desintoxica las quinonas cerebrales que se forman a partir de la oxidación de la dopamina y otras catecolaminas [Baez et al., 1997].

Alteración del sistema endógeno antioxidante

Algunos datos en animales sugieren una pérdida de actividad de las enzimas antioxidantes, así como de glutatión en la senescencia del cerebro, lo que podría comprometer la capacidad del cerebro que envejece para satisfacer las demandas del estrés oxidativo. Fernández et al., 2018, sugieren que las neuronas del hipocampo requieren grandes cantidades de glutatión para mantener la integridad de las dendritas y la función cognitiva, ya que al inhibir la síntesis de este tripéptido se muestra una importante disminución de estas características. El envejecimiento neuronal se asocia con la disfunción del metabolismo de GSH en el hipocampo a través de la alteración de la GPx. Recientemente se reveló que el envejecimiento modifica el patrón temporal de expresión y actividad de la GPx en el hipocampo [Lacoste, et al., 2017], lo que conlleva fácilmente a senescencia o muerte celular programada.

Senescencia celular

La senescencia celular es un proceso que ocurre cuando las células se encuentran en situaciones estresantes, implicando la disminución de la proliferación celular y favoreciendo la apoptosis. Con frecuencia, durante la senescencia se ve incrementada la síntesis de proteínas y surgen cambios metabólicos destacables como el aumento de la glucólisis, disminución de la oxidación de ácidos grasos y aumento de la producción de radicales libres, ROS y RNS [Gorgoulis, 2019]. Este proceso también se caracteriza por la erosión de los telómeros, evento que se distingue por la pérdida gradual de ADN en los extremos de los cromosomas. Este mecanismo ocurre en la fase S del ciclo celular, ya que las ADN polimerasas, al ser unidireccionales, no pueden cebar una nueva cadena de ADN, lo que provoca la pérdida de material genético [Rodier & Campisi, 2011]. La transformación morfológica, expresión de diversos marcadores como la β -galactosidasa, pérdida de supresores de tumores y daño al ADN, son estímulos intracelulares y extracelulares que inducen la senescencia celular [González-Puertos et al., 2015].

Las células senescentes detienen el crecimiento debido a mecanismos autónomos propios de la célula, impuestos por vías de proteínas supresoras de tumores p53 y p16INK4a/pRB y mecanismos celulares no autónomos, a cargo de proteínas que componen el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) [Coppé, et al., 2008]. Este podría ser un mecanismo por el cual la senescencia celular suprime la tumorigénesis maligna. Sin embargo, al mismo tiempo, esto puede contribuir al agotamiento de los conjuntos de células proliferativas (madre/progenitora). Además, los componentes del SASP pueden contribuir al envejecimiento [Carlson & Conboy, 2007; Campisi, 2016]. La senescencia celular acelerada puede impulsar la progresión de la inflamación crónica no remitente, la pérdida o alteración de la función inmunológica, glial y neuronal, falla de la remielinización, deterioro de la integridad de la barrera hematoencefálica y, en última instancia, neurodegeneración [Wilkinson & Hardman, 2020; Papadopoulos, et al., 2020].

Dado que las características de la senescencia celular abarcan más que una simple detención del crecimiento irreversible, recientemente se han realizado estudios para identificar marcadores de senescencia neuronal, es decir, senescencia de células incompetentes para la proliferación, tanto *in vivo* como *in vitro* [Tan et al., 2014; Kritsilis et al., 2018 Wengerodt et al., 2019]. De los cuales se reconocen biomarcadores como: reguladores positivos del inhibidor de Cdk p16 INK4A (Cdkn2a), pero no de p21 WAF1/CIP1(Cdkn1a), lo que activa p38-MAPK (Proteína Cinasa Activada por Mitógenos), y pérdida de lámina B1, lo que conduce a cambios en la cromatina, que pueden ser fácilmente detectados.

Muerte celular programada

La apoptosis es un proceso de orden secuencial de muerte celular. La muerte celular programada, cuyo término surgió por primera vez en 1964, contempla dentro de sí misma la existencia de una vía intrínseca y otra extrínseca (Fig. 6), en las que se generan cambios, morfológicos celulares tales como la formación de apoptosomas, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y surgimiento

de cuerpos apoptóticos, que son en gran parte el resultado de la activación de un conjunto de cisteín-proteasas [Bredesen, Rao and Mehlen, 2016].

Morfológicamente, este proceso hace que la célula se contraiga y el núcleo se vuelva picnótico, un estado caracterizado por la fragmentación del ADN, la condensación de la cromatina y la compactación del citoplasma. La formación de evaginaciones en la membrana plasmática es seguida por estas condiciones que hacen que el núcleo se rompa (cariorraxis). Esto hace que las células se separen de los tejidos circundantes y se separen en fragmentos celulares con el citoplasma incrustado y con orgánulos estrechamente empaquetados. Formándose los denominados cuerpos apoptóticos [Savill y Fadok, 2000; Kurosaka et al., 2003].

A partir de las condiciones antes mencionadas, como la escisión de proteínas, se puede asumir que la descomposición del ADN seguida de la degradación fagocítica se produce a través de un proceso bioquímico [Obeng, 2019]. En el centro de la regulación de la apoptosis se encuentra la activación de las caspasas, un grupo de cisteín proteasas que pueden escindir diversos sustratos para desmantelar el contenido celular [Salvesen, & Dixit, 1997]. Las caspasas existen como zimógenos o proenzimas inactivos. Durante la apoptosis, la procaspasa se escinde proteolíticamente para generar una subunidad pequeña y una subunidad grande. Los dos fragmentos escindidos forman un heterotetrámero, que es la forma activa de la enzima. La activación de las caspasas es un evento posterior en las vías de apoptosis y se ha demostrado que el bloqueo de la actividad de las caspasas elimina casi toda la muerte celular programada [Yuan, et al., 1993]. Por lo tanto, la activación de las caspasas debe estar y, de hecho, está bajo estricto control.

Como se mencionó previamente, existen dos vías apoptóticas principales: vías extrínsecas e intrínsecas que responden a diferentes señales. La vía intrínseca también se denomina vía mitocondrial debido a la participación esencial de las mitocondrias, que no solo es el sitio donde las proteínas antiapoptóticas y

proapoptóticas interactúan y determinan el destino celular, sino también el origen de las señales que inician la activación de las caspasas. a través de diversos mecanismos. Por ejemplo, el citocromo c (Cyt c) es un componente clave del complejo apoptosoma para la activación del iniciador caspasa-9. Después de la liberación de las mitocondrias, Smac (segundo activador de la caspasa derivado de las mitocondrias) y Omi pueden unirse a los inhibidores de la apoptosis (IAP) y aliviar sus efectos inhibidores sobre la actividad de la caspasa. Estas proteínas mitocondriales no son asesinas dedicadas y realizan varias funciones mitocondriales esenciales para el crecimiento celular normal. La separación espacial de las proteínas mitocondriales de sus objetivos con los que interactúan es un mecanismo de protección para evitar la activación no deseada de la apoptosis en células sanas. Solo después de la liberación adecuada pueden cambiar para volverse letales. Por lo que el control mitocondrial, en relación con el metabolismo, respiración y señalización debe ser finamente controlado [Wang & Youle, 2009].

Es bien conocido que en la célula existen múltiples fuentes de radicales libres como el retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas [Hauptmann, et al., 1996]. Sin embargo, las mitocondrias es la mayor fuente de ROS [Tönnies y Trushin, 2017]. Por esta razón, la teoría del envejecimiento de los radicales libres mitocondriales se considera para este estudio, debido a que propone que una disfunción mitocondrial progresiva ocurre al envejecer, provocando un aumento en las concentraciones de ROS y acumulación de daño celular global [Harman, 1965].

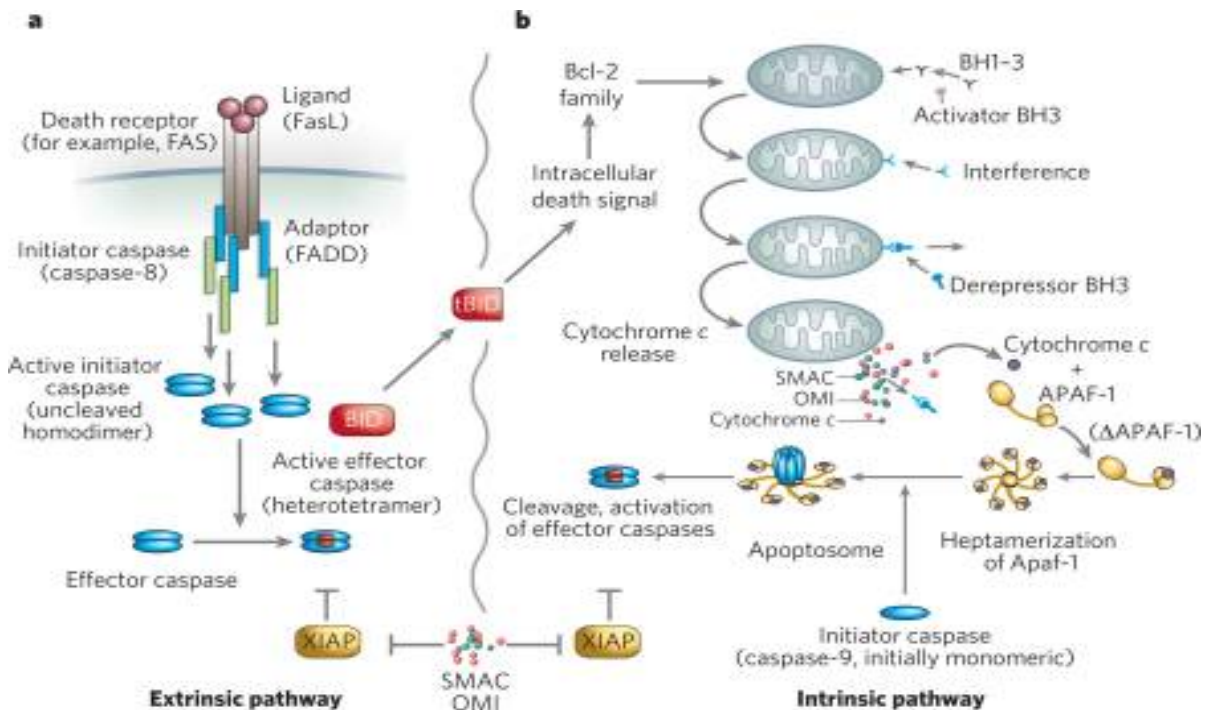


Figura 6. Muerte celular programada o apoptosis. La vía extrínseca a) comienza con la activación de los receptores FAS, recluta a FADD y la caspasa 8 generando un complejo trimérico FAS-FADD-caspasa 8 que conduce a las subsiguientes caspasas efectoras 3 y 7 por escisión. A su vez, caspasa 8 escinde BID y produce tBID, que induce la señal de muerte. La vía intrínseca, b) es activada por caspasa 9. El equilibrio entre los tres grupos de proteínas de la familia Bcl-2 determina en gran medida la apoptosis. El primer grupo, BAX y BAK con un dominio BH3, permeabilizan las membranas externas mitocondriales; el segundo grupo, BIM y tBID con un dominio BH3, activan a BAX y BAK; y el tercer grupo PUMA, NOVA y BAD son desrepresores de BH3 secuestran a los antiapoptóticos de Bcl2 y BclX para favorecer aún más la permeabilidad mitocondrial, promoviendo la liberación de proteínas proapoptóticas mitocondriales como citocromo c, OMI y SMAC. Una vez en citosol, el citocromo c induce cambios conformacionales y heptamerización de la proteína citosólica APAF-1. Posteriormente, este complejo se une a caspasa 9 resultando en su activación y escisión de las caspasas efectoras. Un mecanismo de defensa podría estar mediado por XIAP, inhibiendo la actividad de caspasas. Tomada de Bredesen 2006.

Mitocondria y estrés oxidativo

La mitocondria es un orgánulo que en las células eucariotas desempeña un papel importante en funciones como la modulación del estado redox, el balance osmótico, la regulación de la homeostasis de Ca^{+2} y el metabolismo energético [Kudryavtseva, et al., 2016]. Una alteración en las mitocondrias causada por acumulación de ROS conduce a daños en el ADN mitocondrial, modificando las funciones que derivan de este. Denham Harman, en 1956, fue el primero en describir que los radicales libres producidos en las mitocondrias atacan a diversos componentes celulares. Por su parte, en 1957, Mills describió por primera vez a la

GPx, implicada en la desintoxicación derivada de la presencia de H₂O₂. McCord y Fridovich, en 1969, describieron que la SOD actúa catalizando el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Luego se demostró que las mitocondrias de diferentes células podrían generar H₂O₂. De esta manera, Harman en 1972 planteó que la esperanza de vida de los mamíferos depende de la regulación de ROS y un daño oxidativo que se acumula con la edad, y sugirió así la teoría del envejecimiento por radicales libres mitocondriales (Fig. 7).

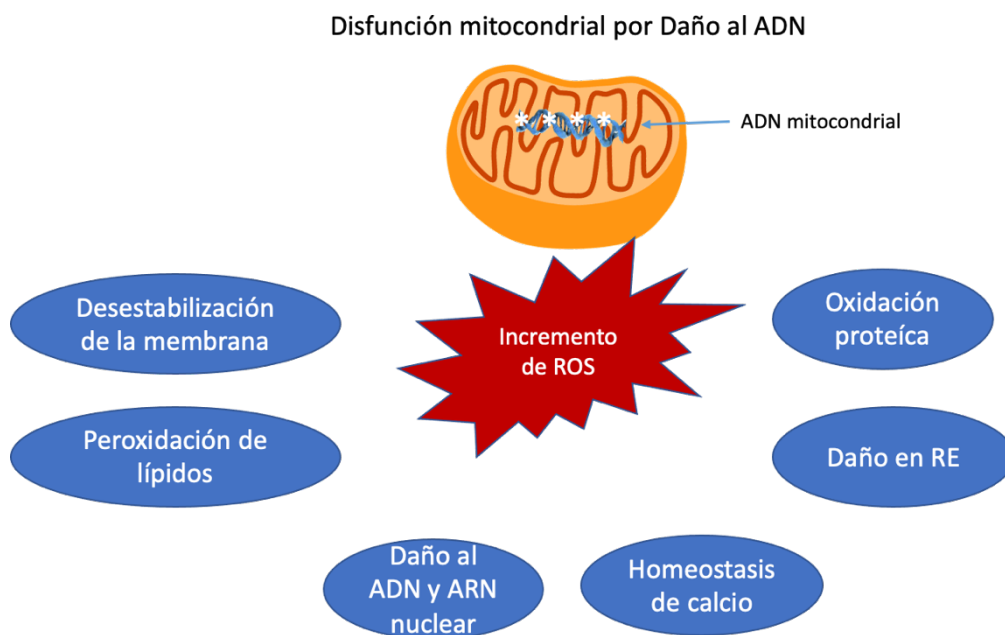


Figura 7. Una disfunción mitocondrial causada por daño al DNA mitocondrial incrementa la producción de ROS, dañando considerablemente macromoléculas y orgánulos como el retículo endoplásmico, el núcleo, etc. Como consecuencia, se genera daño al entorno celular que finalmente lleva a la muerte. Tomado y modificado de [Huang, et al., 2019].

En 1961, Jensen estuvo entre los primeros investigadores en demostrar que las mitocondrias producen ROS [Jensen, 1966]. Observó que una pequeña porción del oxígeno consumido por las partículas submitocondriales que oxidan el NADH o el succinato se convertía en H₂O₂ ya que este consumo era sensible a la catalasa. Más tarde, en 1972-1973, Britton Chance et al., realizaron un estudio clásico y más general en la Johnson Research Foundation en Filadelfia, quienes iniciaron la era moderna de la investigación de las ROS mitocondriales [Chance, et al., 1973;

Boveris, et al., 1972]. Los complejos mitocondriales involucrados directamente en la producción de ROS mitocondriales, como el complejo I, II y III, han sido tema de debate en diversos trabajos.

a) Complejo I mitocondrial

El dogma predominante sostiene que el complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) es la principal fuente de ROS en las mitocondrias. Sin embargo, la producción de ROS en el complejo I depende de las circunstancias. En consecuencia, el complejo I se convierte en una fuente principal de ROS en condiciones patológicas en lugar de ser una fuente dominante en condiciones saludables y de reposo.

Cuando las partículas submitocondriales o las mitocondrias aisladas oxidan NADPH o glutamato más malato, la producción de superóxido del complejo I es insignificante. Por lo que, una producción robusta de $O_2^{\cdot-}$ por este complejo estaría asociada a una reducción progresiva de los grupos redox, incluidos los grupos de Fe-S, el mononucleótido de flavina (FMN) y el grupo de ubiquinona estrechamente unido, que puede suministrar la molécula de oxígeno, con un solo electrón produciendo un radical de anión superóxido [Votyakova & Reynolds, 2001; Turrens, 2003]. Algunos trabajos consideran que el peso específico de la producción de ROS recae sobre FMN [Kussmaul & Hirstm, 2006; Pryde, et al., 2011; Vinogradov & Grivennikova, 2005], mientras que otros afirman que los grupos de hierro y azufre N1a y N2 [Genova, et al., 2001], el radical NAD [Krishnamoorthy, et al., 1988] o la ubisemiquinona son responsables de Generación de $O_2^{\cdot-}$ en el complejo I [Kotlyar, 1990].

Recientemente, la relevancia fisiológica y, por lo tanto, la importancia de la producción de ROS por el complejo I se cuestionó sobre la base de que la producción de superóxido catalizada por el complejo I respaldado por NADH por partículas submitocondriales muestra una actividad máxima a bajas

concentraciones de NADH ($\sim 50 \mu\text{M}$) mientras que en condiciones fisiológicas. concentraciones de NADH (en el rango milimolar) esta reacción se inhibe severamente [Grivennikova, et al., 2010; Grivennikova & Vinogradov, 2006].

Una de las características muy específicas de la NADH-ubiquinona oxidorreductasa de los mamíferos es la transición lenta del estado activo/inactivo, lo que sugiere reordenamientos conformacionales del complejo I, al menos en la reducción de la ubiquinona sensible a la rotenona, que puede estar involucrada en la producción de superóxido [Gavrikova & Vinogradov, 1999; Vinogradov, 1998]. Usando espectroscopía EPR, DeJong et al., demostraron que la NADH-coenzima Q oxidorreductasa sufre cambios estructurales dependientes de la energía en partes que determinan la producción de ubisemiquinona (grupo 2 de hierro y azufre) [Jong, et al., 2009]. Por lo tanto, bajo condiciones patológicas, los reordenamientos conformacionales en el complejo I pueden estar involucrados en los cambios en la eficiencia de la maquinaria productora de ROS.

b) Complejo II mitocondrial

Durante la oxidación del succinato en mitocondrias aisladas que respiran, el flujo de electrones puede bifurcarse formando transporte directo (hacia el citocromo oxidasa) e inverso (hacia NAD^+) y este último requiere aporte de energía [Chance & Hollunger, 1961; Hinkle et al., 1967]. La generación de ROS impulsada por succinato durante el transporte de electrones inversos de succinato a NAD^+ que da como resultado la formación de NADH, es mayor en comparación con la que se forma bajo la oxidación directa de sustratos dependientes de NAD^+ [Votyakova & Reynolds, 2001]. La relación observada entre la formación de ROS y el estado redox del par NADH/NAD^+ resulta en la proposición de que la formación de ROS es directamente proporcional al nivel de reducción de NAD^+ . Posiblemente, podría formularse una regla más generalizada de que cuanto más reducido es el interior de la mitocondria, más probable es que se forme ROS de forma primaria.

El estado redox del medio celular está determinado principalmente por las proporciones de cofactores reducidos/oxidados y proteínas que transportan la mayor parte de los residuos de aminoácidos y grupos funcionales sensibles a redox, NADPH/NADP⁺ y GSH/GSSG, que en conjunto forman un tampón redox compartimentado donde todos los componentes están en un equilibrio redox en condiciones de estado estacionario celular [Murphy, 2012]. Este amortiguador puede ser un factor importante para determinar los niveles de ROS en compartimentos como la matriz mitocondrial o el citosol [Hansen, et al., 2006]. La alta capacidad de amortiguamiento redox intramitocondrial, solo parcialmente representada por 3–5 mM NADPH y 2–14 mM GSH [Starkov, 2008], resistiría la exposición a corto plazo a ROS, mientras que la exposición profunda y sostenida a ROS eventualmente agotaría este amortiguador, resultando en la elevación de los niveles intramitocondriales de ROS [Rebrin, et al., 2003; Starkov, 2008; Wahlländer, et al., 1979].

Bajo condiciones patológicas, la contribución del complejo II a la producción neta de ROS sigue siendo controvertida. Aunque el nivel tisular de succinato es tan bajo como 200–500 μ M, bajo deficiencia de oxígeno (hipoxia/isquemia) puede aumentar de 5 a 10 veces, lo que incrementa la producción de ROS y liberación de Cyt c [Benzi, et al., 1982; Sato et al., 1995]. En consecuencia, se ha propuesto que el complejo II puede funcionar como un sensor general de apoptosis [Grimm, 2013; Lemarie, et al., 2011].

c) Complejo III mitocondrial.

El complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa) acepta los equivalentes reductores formados en los complejos I y II y los procesa mediante el mecanismo operativo del ciclo Q. La operación de este ciclo se inicia con el ubiquinol, que libera su protón al espacio intermembrana y dona un electrón a la proteína de hierro-azufre de Riske, produciendo una semiquinona inestable en el lado externo de la membrana mitocondrial interna. La semiquinona sirve como

donante de electrones para los grupos hemo del citocromo b_L y luego del citocromo b_H que se encuentra cerca del lado interno de la membrana [Trumpower, et al., 1990].

En condiciones normales, la probabilidad de existencia de semiquinona inestable ($Q^{\cdot-}$) es baja debido a su rápida oxidación; por lo tanto, la probabilidad de donación de un electrón al oxígeno molecular en este sistema es relativamente baja. Por lo tanto, el papel potencial del complejo III como causa de la producción masiva de ROS mitocondriales en el modo de funcionamiento fisiológico de estado estacionario sigue siendo incierto considerando que la liberación sustancial de ROS mitocondriales ocurre solo después de la aplicación de un fármaco (antimicina A) que no tiene análogos naturales en la fisiología animal o humana [Starkov & Fiskum, 2001]. Cabe destacar que, como en el caso de la producción de ROS en el complejo I, los cambios conformacionales detectados en el complejo bcl_1 después de la unión de la antimicina A, pueden ser un requisito previo para los reordenamientos moleculares que dan como resultado una cantidad marcada de ROS producción [Huang, et al., 2005; Rieske, et al., 1967]. Por lo que, la sobreproducción de ROS por el complejo III puede deberse a defectos adquiridos o genéticos en la cadena respiratoria mitocondrial en las proximidades de un sitio de unión a antimicina A.

El estrés oxidativo mitocondrial y la disfunción en el cerebro envejecido

Denham Harman propuso que las reacciones de radicales libres “pueden estar involucradas en cambios del envejecimiento asociados con el medio ambiente” [Harman, 1992]. Diversas investigaciones han confirmado esta teoría, así como en enfermedades asociadas a la edad avanzada como la enfermedad de Alzheimer (EA) [Butterfield & Halliwell, 2019; Grimm & Eckert, 2017; Guillaumet et al., 2017]. La teoría de los radicales libres del envejecimiento de Harman es más relevante para el sistema nervioso central (SNC), que consume el 20% del oxígeno del cuerpo y es muy vulnerable al estrés oxidativo [Bonda, et al., 2014]. Las neuronas son especialmente sensibles, ya que son células postmitóticas que no se

dividen y no se pueden reemplazar en caso de daño, lo que lleva a una disfunción mitocondrial al final de su vida útil [Grimm & Eckert, 2017; Wang & Michaelis, 2010]. Además, las mitocondrias en las terminales presinápticas están expuestas a altos niveles de calcio, lo que acelera el daño oxidativo sináptico [Grimm & Eckert, 2017]. La susceptibilidad del cerebro al estrés oxidativo conduce a un aumento de los biomarcadores oxidativos con la edad, incluidos niveles tóxicos de metales, daño al ADN y déficits en el metabolismo de las proteínas [Grimm & Eckert, 2017; Mecocci, et al., 2018; Thanan, et al., 2014].

Con la edad se generan marcados déficits en el metabolismo mitocondrial, específicamente una reducción en la subunidad α de la ATP sintasa en mitocondria, que acopla la fosforilación oxidativa con la síntesis de ATP. Esto conduce a una disminución de la producción de ATP, una mayor producción de ROS y oxidación de ADN, proteínas y lípidos [Grimm & Eckert, 2017; Lu et al., 2004; Mecocci et al., 2018]. El deterioro mitocondrial conduce no solo al daño del ADNmt sino también al daño del ADN nuclear, particularmente en la región promotora de los genes que regulan la función vesicular, y la plasticidad sináptica [Lu, et al., 2004] modificando la morfología celular en el cerebro.

Producción de ROS en diferentes regiones del cerebro.

Debido a la naturaleza heterogénea del cerebro que incluye varios tipos de células, ciertas áreas del cerebro son más sensibles que otras a los cambios en el estrés oxidativo o a los niveles de ROS [Naudi, et al., 2017; Cabre, et al., 2017]. Es importante resaltar que las ROS pueden causar modificaciones redox reversibles (principalmente en proteínas, por ejemplo, oxidación reversible de cisteínas específicas) así como daño oxidativo irreversible, es decir, causar daño estructural en biomoléculas. Por lo tanto, las neuronas y otros tipos de células pueden ser más susceptibles a los cambios en los niveles de ROS porque son más sensibles al daño oxidativo o menos resistentes a las alteraciones en la señalización de ROS. Comprender cómo las diferentes células, incluidos los diferentes tipos de neuronas

y glía, responden a los cambios en ROS es fundamental para diseñar terapias que prevengan el estrés oxidativo sin interrumpir la señalización de ROS.

Las neuronas y la glía tienen diversos tamaños, morfologías y características metabólicas. A pesar de producir menos ROS mitocondrial, las neuronas son más sensibles que la glía al estrés oxidativo porque tienen menos antioxidantes [Herrero, et al., 2009]. Además, debemos tener en cuenta que las neuronas son células posmitóticas que rara vez se reemplazan durante la vida del individuo. Esta última característica hace que las neuronas sean más sensibles a las alteraciones en la homeostasis celular, incluidos los cambios en el estado redox. Diferentes tipos de neuronas también muestran diferencias en topología, mielinización y número de conexiones sinápticas, todo lo cual puede alterar su sensibilidad a los cambios en los niveles de ROS. Este fenómeno se conoce como vulnerabilidad neuronal selectiva [Wang & Michaelis, 2010].

En general, las neuronas grandes con axones largos tienen más probabilidades de morir en respuesta al aumento del estrés oxidativo. Además, las neuronas que producen más ROS son las más sensibles al estrés oxidativo [Wang, et al., 2005]. Algunas áreas del cerebro, como el hipocampo, la sustancia negra, la amígdala y la corteza frontal, son más sensibles al estrés oxidativo. Dentro de estas áreas, algunas neuronas son más sensibles que otras, es decir, las neuronas CA1 en el hipocampo o las neuronas de la *pars compacta* en la sustancia negra [Wang, & Michaelis, 2010]. En respuesta a la hipoglucemia grave, las ROS aumentan más en el hipocampo y el cuerpo estriado [Amador, et al., 2014]. Coincidentemente, estas son las dos áreas que acumulan el nivel más alto de carbonilos de proteínas durante el envejecimiento [Foster, et al., 1996]. El hipocampo es también el área más sensible al daño debido a la isquemia-reperfusión y donde el consumo de oxígeno se encuentra más disminuido durante el envejecimiento [Candelario, et al., 2001; Navarro, et al., 2008].

Hipocampo

El hipocampo en humanos es una estructura alargada ubicada en lo más profundo del lóbulo temporal medial y que forma parte del sistema límbico. Debido a su parecido a un caballito de mar, en este se inspiró su nombre (género *hippocampus*). En roedores, el hipocampo es una estructura relativamente grande con forma de anacardo que se ubica justo debajo del neocórtex. Un corte transversal de su eje largo revela la descripción clásica de los libros de texto de la conectividad anatómica del hipocampo, el llamado “bucle trisináptico”.

Anatómicamente, el hipocampo está formado por el giro dentado (GD) (principalmente células granulares), el cuerno de Amón (CA) (principalmente células piramidales) y la corteza entorrinal (CE). El GD se proyecta a CA3 a través de las fibras musgosas (axones de células granulares) (sinapsis 1); el CA3, a su vez, se proyecta a la región CA1 a través de la vía colateral Schaffer (sinapsis 2); y finalmente CA1 se proyecta hacia la corteza entorrinal (sinapsis 3), completando el bucle (Fig. 8). Cabe resaltar que CA1, CA2 y CA3 también pueden tener una conexión con la CE, por lo que un daño en una de estas regiones podría causar un daño indirectamente a otras regiones del hipocampo [López, 2002].

Las alteraciones neurobiológicas que se observan en el hipocampo envejecido, incluido el aumento del estrés oxidativo y la neuroinflamación, la alteración de la señalización intracelular y la expresión génica, así como la reducción de la neurogénesis y la plasticidad sináptica, están asociadas con el deterioro cognitivo relacionado con la edad [Bettio, et al 2017].

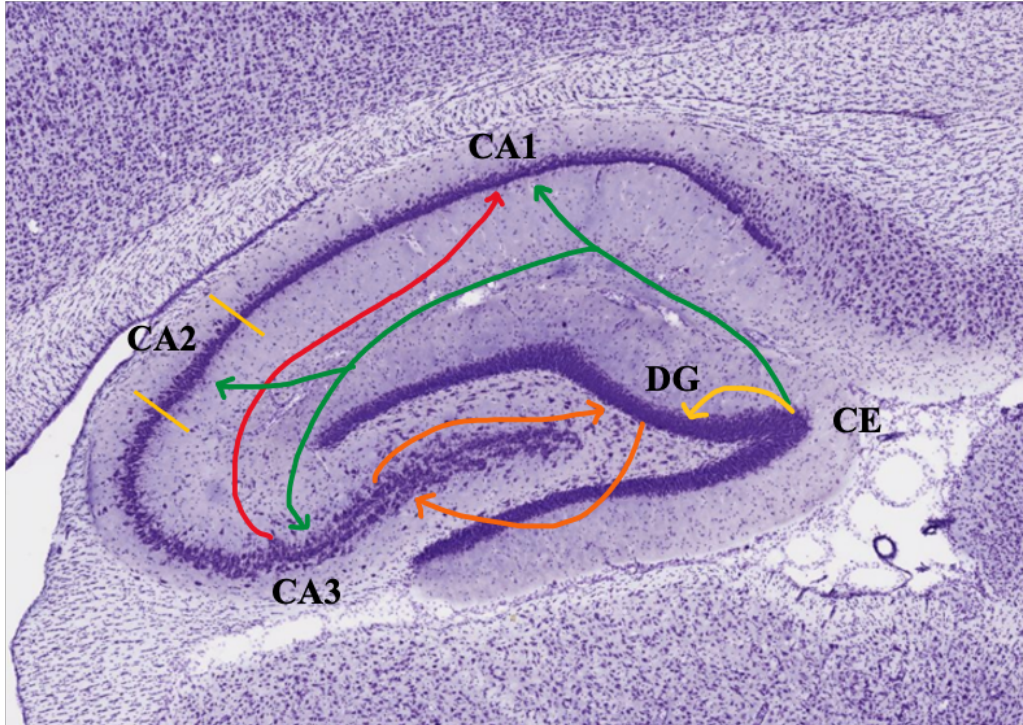


Figura 8. Hipocampo de *Rattus norvegicus*, tomada y editada de Brainmaps. Bucle trisináptico CA1 (Cuerno de Amón 1), CA2 (Cuerno de Amón 2), CA3 (Cuerno de Amón 3), DG (Giro Dentado), CE (Corteza Entorrinal).

Función del hipocampo

La función del hipocampo está relacionada con la memoria declarativa, la cual se puede subdividir en dos tipos: memoria episódica y memoria semántica. La memoria episódica se refiere a un recuerdo sobre un evento específico en el pasado, vinculado a un momento y a un lugar en específico. La memoria semántica se refiere al almacenamiento de conocimientos generales sobre todo el mundo. Algunos pacientes con daños tempranos en el hipocampo tienden a sufrir déficits en la memoria episódica, por lo que les resulta difícil recordar eventos de su vida diaria [Knierim, 2015].

Estudios han demostrado que la memoria episódica declina con la edad en vertebrados [Foster, DeFazio y Bizon, 2012], evento asociado principalmente a un incremento de ROS, favoreciendo la aparición de enfermedades relacionadas con el deterioro del hipocampo. Se pueden usar dos estrategias posibles para navegar

dentro de un entorno: el aprendizaje de “lugar” (aprender la ubicación espacial) y el aprendizaje de “respuesta” (aprender a donde girar) [Packard y McGaugh, 1996]. A lo largo de la niñez, numerosas estructuras cerebrales sufren cambios en la función y el tamaño, que se correlacionan con un mayor rendimiento en tareas que dependen de esas regiones. Sin embargo, durante el envejecimiento normal se han observado disminuciones en la memoria y la función ejecutiva, acompañado de la disminución en el volumen del hipocampo. Por lo que es indispensable contar con estrategias exógenas que eviten el daño hipocampal y, por tanto, posterguen la vida media útil de sus componentes celulares.

Antioxidantes exógenos

En condiciones fisiológicas, la primera línea de defensa antioxidantes endógenos, constituida principalmente por SOD y CAT, así como del sistema de glutatión, minimiza la concentración de radicales libres manteniendo la homeostasis celular. Sin embargo, a medida que el envejecimiento se hace evidente, alteraciones como la disfunción mitocondrial aumentan junto con la concentración de radicales libres, rebasando la capacidad del sistema endógeno, lo que hace necesario el uso de antioxidantes exógenos como terapia preventiva del estrés oxidante generado en este proceso. Entre los más utilizados, destacan todas aquellas moléculas que se adquieren a través de la ingesta de los alimentos, como vitamina A, vitamina C, vitamina E y resveratrol [Oliver and Reddy 2019].

Resveratrol

El trans-resveratrol (3,5,4-trihidroxi-*trans*-estilbeno) es la forma natural más abundante y estable respecto a la isoforma *cis* [Gambini, 2015]. De acuerdo con su estructura química, su actividad antioxidante se basa en sus tres grupos hidroxilo, capaces de donar electrones a radicales libres para estabilizarlos, participando de esta manera en la captación y quelación de metales tóxicos (Fig. 9) [GülÇin, 2010].

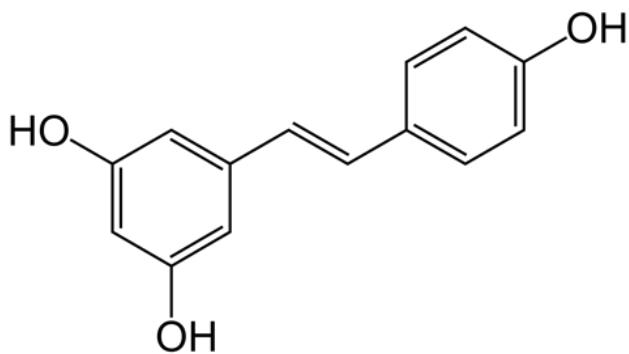


Figura 9. Estructura del *trans-resveratrol* (3,5,4-trihidroxi-*trans*-estilbeno).

Se ha propuesto que la biodisponibilidad del resveratrol depende de la matriz alimenticia en donde esté incorporado. En humanos, al administrarse resveratrol de forma oral, se detectan una gran cantidad de metabolitos secundarios en plasma y orina, primordialmente glucorónidos y la biodisponibilidad del resveratrol está en dependencia del vehículo en el que este inmerso, por ejemplo; dosis orales de jugo de uva reportan sulfato en plasma y orina mientras que la administración de vino presenta mayor evidencia del glucorónido [Amri, et al., 2011]. Anteriormente investigaciones dentro de nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que una administración con 7.5% de etanol como vehículo de resveratrol es eficiente para contrarrestar los efectos que se generan por un estrés oxidante.

A partir de diversos experimentos se reportó que, al administrarse por vía oral, puede absorberse hasta el 20% del resveratrol, presenta una rápida absorción a nivel de intestino delgado, y los metabolitos secundarios generados son glucorónidos y sulfatos principalmente; aunque aún no se tiene claro si estos son metabólicamente activos. Cabe mencionar que el resveratrol se metaboliza principalmente en órganos como hígado e intestino. Además, se conoce que presenta una rápida eliminación por orina, pero suelen reflejarse bajos niveles en plasma. Hasta ahora no se ha reportado que la toxicidad por el consumo de resveratrol sea frecuente, ya que se alcanza al administrar concentraciones muy elevadas (1 g) y su rápida eliminación evita efectos adversos en la mayoría de los casos [Walle, 2011; Cottart, et al., 2010].

A partir de los diversos ensayos derivados de los estudios de biodisponibilidad, se ha propuesto que dentro de los efectos de la administración de resveratrol se encuentra la prevención de algunos tipos de cáncer [Gupta et al., 2012], confiere propiedades neuroprotectoras [Shindler, et al., 2010], así como efectos protectores en lesión hepática colestásica [Tsu-Kung, et al., 2012]. Actualmente, se considera al resveratrol como un componente antienvjecimiento [Lopez, Dempsey y Vemuganti, 2015], ya que prolonga la vida útil de especies como levaduras, gusanos y moscas por la activación del regulador silente de la información 2 (SIR2), perteneciente a la familia de las sirtuinas, que han sido relacionadas frecuentemente con el incremento de la longevidad en algunas especies.

Cabe resaltar, que anteriormente la actividad de las sirtuinas había sido reportada en organismos sometidos a restricción calórica, por lo que se considera al resveratrol un mimético de los efectos de esta práctica nutricional [Barger, et al., 2008]. En los últimos años se ha propuesto al resveratrol como una prometedora molécula antienvjecimiento. Si bien sus efectos antioxidantes ayudan a retardar este proceso biológico, aún se desconocen los efectos que produce un tratamiento crónico sobre el hipocampo y una de sus funciones más importantes, la memoria.

2. JUSTIFICACIÓN

El envejecimiento junto con un incremento de estrés oxidante favorece el deterioro de órganos y sistemas, así como la aparición de enfermedades neurodegenerativas, alterando la calidad de vida de las personas adultas mayores, implicando gastos económicos en tratamientos y cuidados, lo cual afecta en gran medida el entorno socioeconómico y familiar. El estrés oxidante es parte de los mecanismos implicados en el daño celular y los cambios moleculares asociados a la edad, por lo que la búsqueda de antioxidantes sintéticos o naturales que prevengan o retarden la aparición de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y que, al mismo tiempo, contribuyan a mejorar la calidad de vida, ha ganado terreno e interés. Encontrar nuevas estrategias que disminuyan, retarden o impidan el deterioro cerebral que naturalmente se observa durante el envejecimiento es preponderante. Por lo que, en este trabajo se propone al resveratrol como un agente antioxidante que pueda disminuir el daño causado por las ROS en células hipocampales durante el proceso de envejecimiento, planteándose así la siguiente pregunta de investigación:

¿La administración crónica de resveratrol puede prevenir el daño celular característico del envejecimiento modulando el balance redox en el hipocampo de ratas Wistar?

3. HIPOTESIS

Nula: Una administración crónica de resveratrol no previene el daño celular característico del envejecimiento modulando el balance redox en el hipocampo de ratas Wistar.

Alternativa: Una administración crónica de resveratrol previene el daño celular característico del envejecimiento modulando el balance redox en el hipocampo de ratas Wistar.

4. OBJETIVO GENERAL

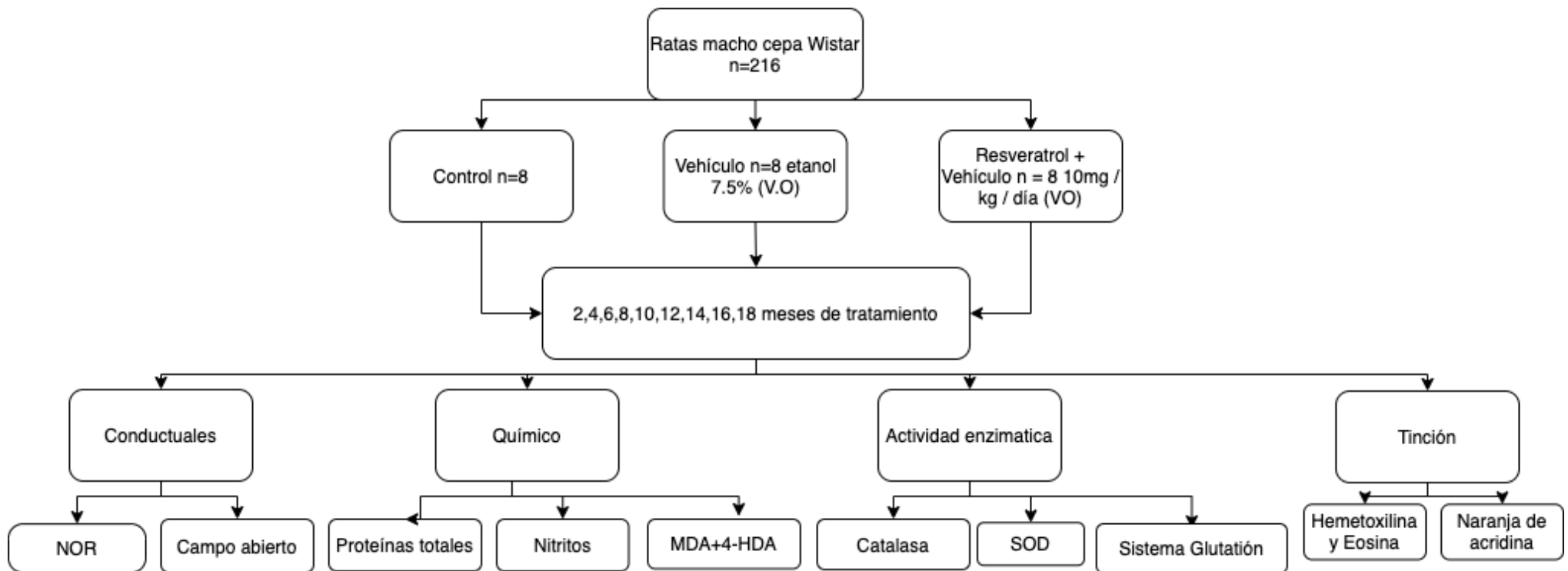
Evaluar el efecto de la administración crónica con resveratrol sobre el daño celular asociado al envejecimiento en hipocampo de ratas Wistar.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

En el curso temporal del envejecimiento de ratas Wistar tratadas con y sin resveratrol:

- Valorar la conducta declarativa de memoria a corto y largo plazo.
- Evaluar el balance redox hipocampal.
- Evaluar la viabilidad celular en las subregiones del hipocampo.

6. METODOLOGÍA



Administración de Animales

Se utilizaron 216 ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad con un peso aproximado de 280-320 g, obtenidas del Bioterio "Claude Bernard", de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales se alojaron en condiciones estándar de bioterio, se colocaron en cajas de acrílico, con ciclos de luz-oscuridad de 12-12 h y temperatura $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con acceso de agua y alimento *ad libitum*. Todos los sujetos de experimentación fueron alimentados con una dieta normocalórica base pellet balanceada LabDiet 5001. Se monitoreo el peso de cada rata cada semana para preparar el volumen adecuado de la solución de resveratrol correspondiente al peso de los animales. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-62-ZOO-1999, así como de la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" de México [Wolfle, et al., 1996]. Todos los procedimientos se llevaron a cabo minimizando el sufrimiento innecesario de los animales.

Conformación de grupos

Los animales fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos: un grupo Control (sin tratamiento), un grupo Vehículo (7.5% de etanol) y un grupo administrado con Resveratrol + Vehículo (10 mg/kg/día + 7.5% de etanol). Para la administración, la n total de animales se dividió en 9 grupos de 24 animales y se administraron durante 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 meses, respectivamente.

La administración se realizó mediante una cánula para todos los grupos por vía oral esofágica de lunes a viernes a las 8:00 am estrictamente. El resveratrol utilizado correspondió a la marca comercial ResVitále® procedente de la raíz de la planta *polygonum cuspidatum*. Para la administración de resveratrol se preparó la solución en un vehículo de agua-etanol a 7.5% en una concentración de 5 mg de resveratrol/mL. El volumen administrado diariamente de la solución se ajustó al peso del animal para administrar 10 mg/kg.

Sacrificio

La eutanasia de los animales se hizo mediante el uso de Ketamina/Xilazina en una dosis de 0.2 mL/100 g de peso. La mitad del hipocampo fue disectado y almacenado a -80 °C para las determinaciones bioquímicas y enzimáticas, y la otra mitad del hipocampo fue almacenado en formalina 4%.

Pruebas conductuales

Campo abierto

Se realizó la prueba mediante el protocolo de [Brooks & Dunnett, 2009; Denenberg, 1969]. Ésta prueba es una de las más antiguas y mayormente reportadas debido a su fácil evaluación, se lleva a cabo en un dispositivo cúbico de madera con medidas de 60 cm de largo x 60 cm de ancho y 60 cm de alto donde la base se divide en 3 cuadrantes de 20 cm x 20 cm.

La prueba consiste en colocar al animal en el cuadrante medio y evaluar la conducta horizontal (número de cuadros visitados), grabando durante 5 min. La evaluación se realizó a las 8:00 am.

Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

Se utilizó el método descrito por Lueptow, 2017; éste es un ensayo de comportamiento comúnmente utilizado para la investigación de varios aspectos del aprendizaje y la memoria en roedores. Esta prueba es bastante simple y se puede completar en 3 días: día de habituación, día de entrenamiento/memoria a corto plazo y el día de análisis de memoria a largo plazo.

Durante el entrenamiento, el animal exploró 2 objetos idénticos y después de 2-4 horas se analizó la memoria a corto plazo cambiando solo uno de los objetos colocados previamente. El tercer día, uno de los objetos con los que se analizó la memoria a corto plazo se reemplazó por un objeto nuevo.

Debido a que los roedores tienen una preferencia innata por la novedad, si el animal reconoce el objeto familiar, pasará la mayor parte de su tiempo en el objeto nuevo, en ambas pruebas. Debido a esta preferencia innata, no hay necesidad de refuerzos positivos o negativos ni de largos programas de entrenamiento.

Análisis Bioquímico

Cuantificación de proteínas totales

Las proteínas totales se cuantificaron mediante el método de Sedmak & Grossberg, usando albúmina sérica bovina como estándar [Sedmak & Grossberg, 1977]. Las proteínas se cuantificaron en 2 μL del sobrenadante más 500 μL del reactivo de color (azul de Coomassie 0.06% a 465 nm), llevado a 1 mL con agua destilada. El producto de reacción se leyó en un espectrofotómetro a 620 nm. La concentración de proteínas se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar de albúmina de suero bovina (1 a 10 μg).

Cuantificación de nitritos

La producción de $\bullet\text{NO}$ se analizó indirectamente mediante el contenido de NO_2^- por el método de Griess [Tsikas, 2006]. En este ensayo la reacción colorimétrica es inducida por la adición de 100 μL de sobrenadante + 100 μL del reactivo de Griess y 800 μL de H_2O . Posteriormente el producto de la reacción se leyó en un espectrofotómetro a 540 nm. La concentración de NO_2^- se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar de NaNO_2 determinada para el ensayo.

Determinación de MDA+ 4-HDA

La determinación del contenido de MDA y 4-HDA se realizó por el método de [Erdelmeier et al., 1998], en las muestras donde se analizó la generación de productos de la peroxidación lipídica, utilizando el N-metil-2-fenil-indol como reactivo cromógeno [10.3 mM]. Para esto se adicionó 100 μL de agua destilada + 100 μL de sobrenadante + 650 μL de solución 1 diluida, se agitó vigorosamente para

posteriormente adicionar 150 μL de ácido metanosulfónico (determinación de MDA + 4-HDA) o HCl al 35% (determinación de MDA). Los tubos se incubaron a 45°C por 60 minutos (MDA) y a 45°C por 40 minutos (MDA + 4-HDA), se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugan por 15 minutos a 3000 rpm. Posteriormente se leyó de la absorbancia del producto de la reacción a 586 nm. La concentración de MDA y 4-HDA se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar de 1, 1, 3, 3, tetrametoxipropano.

Análisis Enzimático

Determinación de la actividad enzimática de Catalasa

La actividad de CAT se determinó espectrofotométricamente por el método de Aebi [Aguilar-Alonso et al., 2018]. Se adicionó en una celda de cuarzo 635 μL de PBS [50 mM] pH 7.4, 330 μL de H_2O_2 [30 mM] y 35 μL de sobrenadante, se siguió la reacción por dos minutos tomando la lectura en el minuto 0 y 2 a una temperatura de 20 °C mediante baño María. Las lecturas se realizaron a 240 nm. Para la determinación de la actividad enzimática la ΔDO se multiplicó por el coeficiente de extinción molar 692.5 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ y se ajusta a 1 mg de proteína presente en el sobrenadante.

Determinación de la actividad de Superóxido Dismutasa

La actividad de SOD se determinó de acuerdo con el método de Marklund & Markund [Baltazar-Gaytan et al., 2019]. Se realizó el ensayo blanco de la reacción no inhibida hasta obtener una $\Delta\text{DO } 0.020 \pm 0.001$, en caso de no obtener los resultados con volúmenes estándar se varía el volumen de Pirogallol y Tris-HCl para obtener una $\Delta\text{DO de } 0.020 \pm 0.001$. La actividad enzimática fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\left| \left[\frac{VM\Delta DO \text{ muestra} \times 100}{VM\Delta DO \text{ Blanco}} - 100 \right] \times 0.6 \right|$$

Dónde: $\Delta \text{D.O.m}$: Diferencia de D.O. de la muestra.

Δ D.O.b: Diferencia de D.O. del blanco.

V.M. valor medio.

Determinación de la actividad enzimática de Glutación transferasa

La actividad de GST se determinó de acuerdo con el método de Bompart [Bompart et al., 1990]. Se homogenizó el tejido en buffer de fosfatos 50 mM. Posteriormente, se centrifugó manteniendo la cadena de frío. Se tomó 25 μ L de sobrenadante, se adicionaron 912.5 μ L de reactivo 1, 50 μ L del reactivo 2 y 12.5 μ L del reactivo 3, para obtener un volumen final de 1 mL. Se obtuvo la Δ ABS/min monitoreando la reacción por 5 min, a 37 °C y una longitud de 405 nm

Cálculos:

$$\text{Actividad de GST} \left(\frac{U}{mL} \right) = (\Delta \text{ABS muestra} - \Delta \text{ABS blanco}) \text{Factor}$$

Determinación de la actividad enzimática de Glutación reductasa

La actividad de GR se determinó de acuerdo con el método de Bompart [Bompart, et al., 1990]. Se homogenizó el tejido en buffer de fosfatos 50 mM. Posteriormente se centrifugó manteniendo la cadena de frío y se realizó los siguientes pasos:

-PASO A: Se adicionaron 440 μ L del reactivo principal + 60 μ L del buffer regulador + 40 μ L de muestra + 20 μ L de FAD 315 μ M. Se determina la Δ ABS/min durante 3 min en un espectrofotómetro a 340 nm (A).

-PASO B: Se añadió 20 μ L de buffer regulador + 60 μ L de GSSG. Se determinó la Δ ABS/min durante 3 minutos en un espectrofotómetro a 37 °C a una longitud de 340 nm (B).

Determinación de la actividad enzimática de Glutación peroxidasa

La actividad de GPx se determinó de acuerdo con el método de Bompart [Bompart et al., 1990]. Se homogenizó la muestra al 10% en buffer de sucrosa.

Posteriormente se centrifugó manteniendo la cadena de frío. Para la reacción se tomaron 100 µL de muestra y 875 µL de reactivo de acoplamiento. Se incubó durante 3 minutos a 37 °C. Se adicionaron 25 µL de sustrato de hidroperóxido. Se determinó la $\Delta\text{ABS}/\text{min}$ durante 2 minutos en un espectrofotómetro a 37 °C a una longitud de 340 nm.

Cálculos:

$$\text{Actividad de GPx} \left(\frac{U}{mL} \right) = (\Delta\text{ABS}/\text{min}) \text{Factor}$$

El factor se obtuvo de acuerdo con la Ley de Lambert Beer y a las diluciones de la reacción y el homogenado.

Estudio Histológico

Inclusión en parafina

Los cerebros fijados en formalina al 4% fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol etílico (70%, 80%, 96%, 100%), mezcla de alcohol-xilol y xilol. Una vez los tejidos estaban deshidratados, fueron embebidos e incluidos en parafina (Paraplast) para la formación de bloques. Posteriormente, utilizando un micrótopo, se obtuvieron cortes de 5 µM de grosor. Finalmente, los cortes se montaron en laminillas silanizadas previamente.

Tinción de Hematoxilina Eosina

Para observar la morfología celular de las diferentes subregiones del hipocampo, se realizó esta técnica cuyo fundamento son las diferencias ácido-base de los colorantes utilizados, la hematoxilina es un colorante básico que diferencia el núcleo celular que, coloreándolo de azul intenso, y la eosina que es un colorante ácido que tiñe el citoplasma en un color rosa-anaranjado o rojizo. Para esto una vez desparafinados y rehidratados los tejidos se tiñeron con Hematoxilina durante 5 minutos, se lavaron con agua y se colocaron las laminillas en Eosina, se volvieron a deshidratar y se eliminó el resto de colorantes con alcohol en concentraciones

crecientes (70%, 80%, 90%, 99%) y xilol, una vez terminado se sellaron con resina y se observó la morfología celular principalmente en el hipocampo en las regiones CA1, CA3 y GD y se tomaron fotografías a 20x.

Tinción con Naranja de Acridina

Las laminillas correspondientes para la técnica de naranja de acridina (NA) y DAPI fueron deshidratados como se describió anteriormente. Después de la deshidratación se agregó a cada tejido 40 μ L de solución de NA en un buffer de TRIS-cloruro de potasio-magnesio (TKM) durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS 1X y se realizó el montaje agregando 15 μ L de Vectashield-DAPI, haciendo el montaje y sellado, todo esto en condiciones de oscuridad. Se analizaron las laminillas utilizando los filtros azul y rojo de microscopio de fluorescencia y con un aumento de 20X.

Análisis estadístico

Para todos los experimentos, los datos obtenidos se expresan como la media de 6 animales \pm el error estándar de la media (EEM). ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey, como una prueba posterior para evaluar las diferencias estadísticamente significativas. (*) Indica $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Parámetros fisiológicos

El registro del peso corporal se muestra en la figura 10a. El peso se registró desde los 3 meses de edad y antes del sacrificio (cada 2 meses). Se observó una ganancia de peso respecto al tiempo, aunque estadísticamente no hubo diferencias entre grupos, la interacción estadística entre las variables independientes edad y tratamientos sobre la dinámica de peso fue baja ($F= 29.93$).

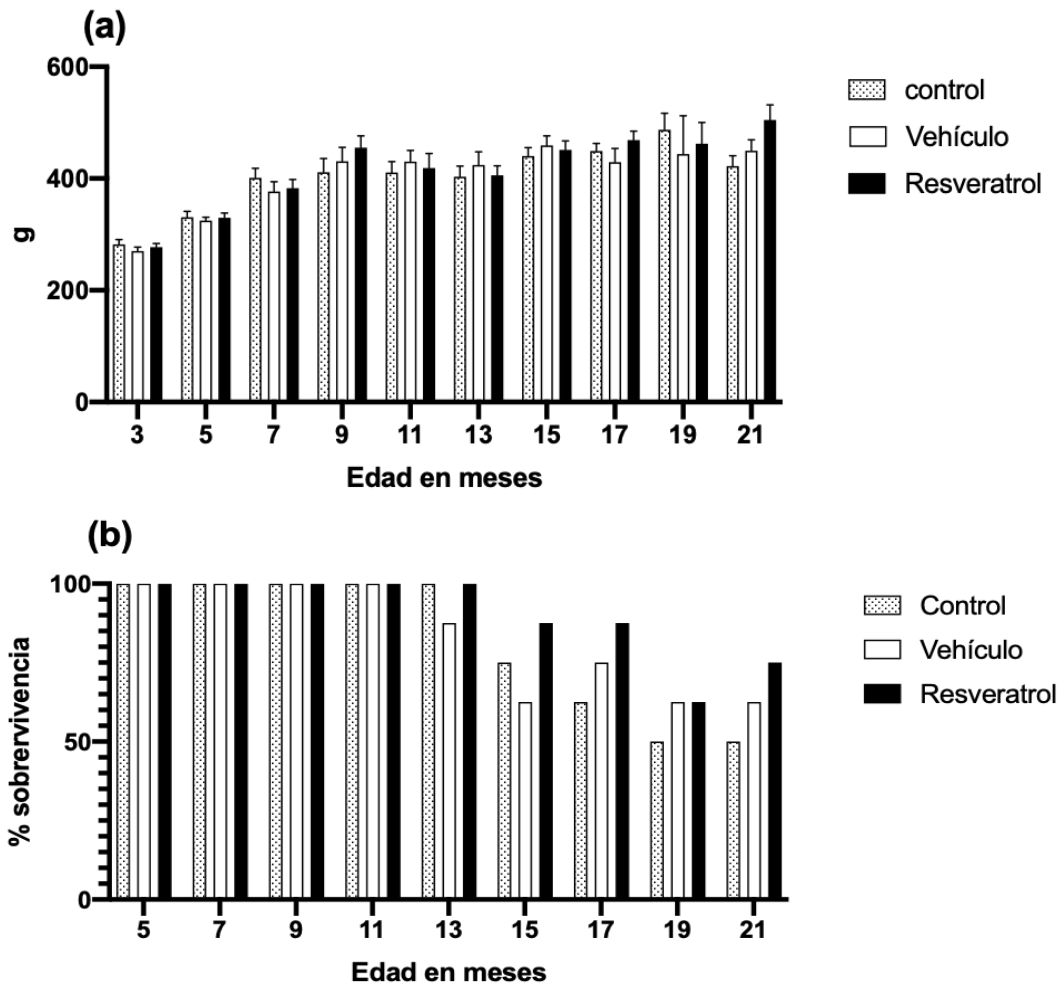


Figura 10. Efecto del resveratrol en el proceso de envejecimiento. **(a)** Peso corporal en gramos en función de la edad (meses). **(b)** Porcentaje de supervivencia de ratas en función de la edad. Los valores presentados son la media \pm EEM. Los datos de (a) fueron analizados por ANOVA de dos vías post-hoc Tukey. No se muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control $p < 0.05$.

En relación con el porcentaje de sobrevivencia (Fig. 10b), se observó que hasta los 11 meses de edad los animales con y sin tratamiento sobrevivieron en un 100%. A la edad de 13 meses el grupo control y resveratrol mostró una sobrevivencia del 100%, mientras que, se presentó un 10% de decesos en el grupo vehículo. A la edad de 15 meses, el porcentaje de sobrevivencia fue de 75%, 62.5% y 87.5% para el grupo control, vehículo y resveratrol, respectivamente. A la edad de 17 meses, se observó una menor tasa de sobrevivencia para el grupo control (62.5%), mientras que en el grupo vehículo y resveratrol correspondió a 75% y 87.5%. A la edad de 19 meses, el porcentaje de sobrevivencia disminuyó en todos los grupos, observándose 50%, 62.5% y 62.5% para los grupos control, vehículo y resveratrol, respectivamente. Finalmente, a la edad de 21 meses el grupo resveratrol mostró la mayor sobrevivencia (75%), mientras que los grupos control y vehículo presentaron un 62.5% de sobrevivencia en este estudio se presentó un valor de $F= 29.93$ para la variable tiempo.

El tratamiento con resveratrol previene el deterioro motor y cognitivo. Actividad locomotora

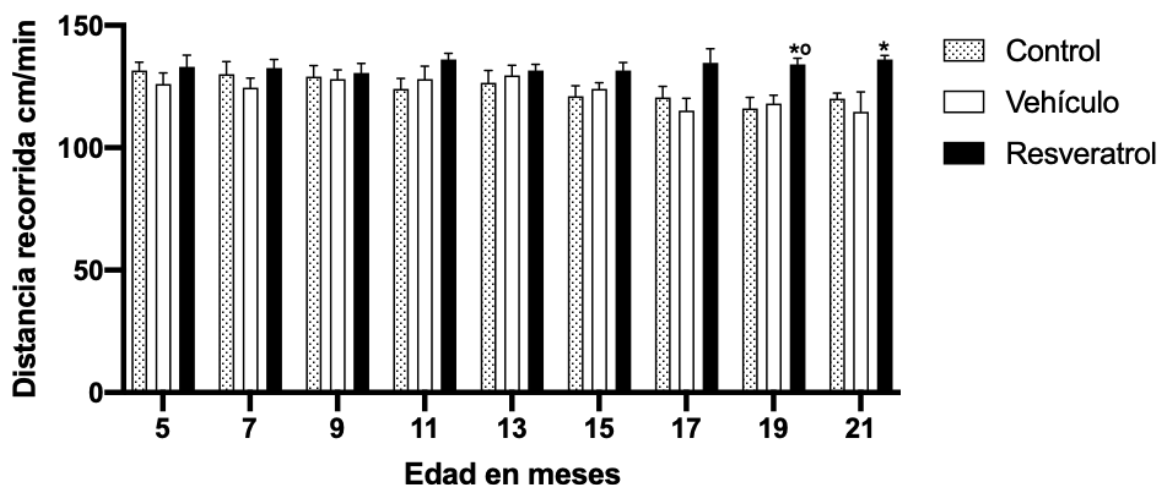


Figura 11. Actividad locomotora de los grupos experimentales en relación a la edad. Los valores presentados son la media \pm EEM, los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías y Tukey, ^{*}representa diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control, [°]representa diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo vehículo $p<0.05$.

En cada tiempo cohorte, se realizó la habituación para la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NOR), la cual consistió en cuantificar la distancia recorrida para evaluar la actividad locomotora. Los resultados mostraron que la distancia media recorrida no tuvo diferencias estadísticamente significativas en la edad de 5 meses y hasta la edad de 15 meses. Los datos mostraron que a partir de la edad de 17 meses, los animales tienden a disminuir su actividad locomotora. A la edad de 19 meses, el tratamiento con resveratrol manifestó una prevención, ya que al compararlo contra el grupo control sin tratamiento o vehículo, no hay pérdida de la locomoción, mostrando 15.5% mayor locomoción respecto del grupo control y un 13.5% y del grupo vehículo. A la edad de 21 meses (18 meses con tratamiento) se observó una diferencia estadísticamente significativa del grupo resveratrol respecto del grupo control de 18.6% (Fig. 11) para este grupo de análisis el valor $F=8.048$ fue importante para la variable tratamiento.

Memoria de corto plazo

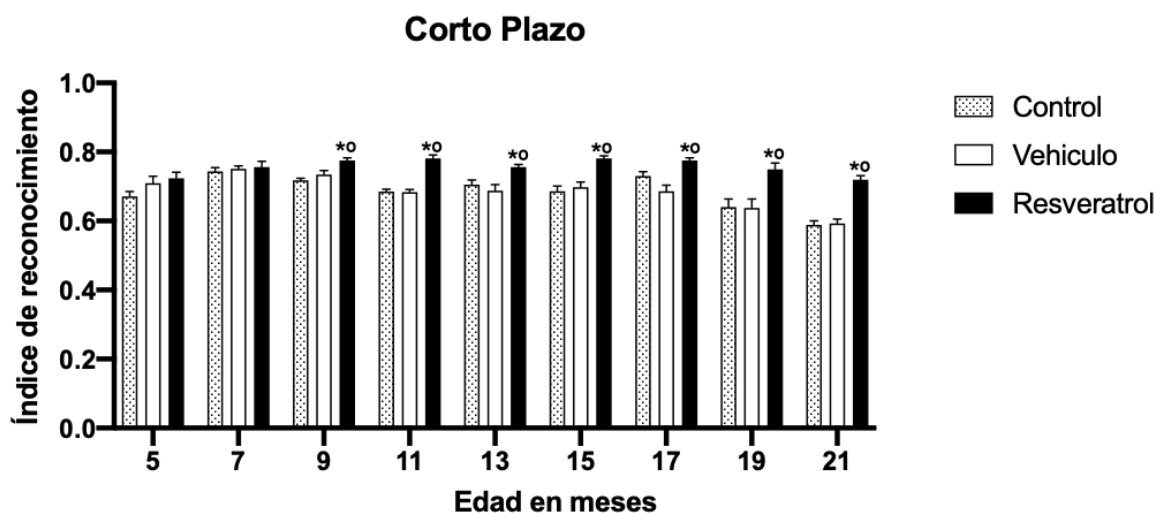


Figura 12. Evaluación de la memoria de corto plazo por la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NOR). Se muestran diferencias estadísticamente significativas en los grupos resveratrol respecto de los grupos control y vehículo. Los valores presentados son la media \pm EEM para una $n=8$, los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías y Tukey. *representa diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control, °representa diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo vehículo ($p<0.05$).

La prueba de NOR a corto plazo fue aplicada al día siguiente después de la habituación y dos horas después de la familiarización con 2 objetos idénticos, en cada tiempo cohorte. Los resultados exhibieron que en el curso temporal del envejecimiento se pierde paulatinamente la capacidad de memorizar a corto plazo a partir de la edad de 9 meses, como se observa en el grupo control. La administración crónica del vehículo no modificó el deterioro cognitivo con relación al control. Los resultados en la figura 12 indican que el grupo suplementado con resveratrol previno la pérdida de la memoria a corto plazo, ya que presentó un mayor índice de reconocimiento, el cual fue estadísticamente significativo desde los 9 y hasta 21 meses de edad (6 – 18 meses de tratamiento), correspondiendo de 10 - 15% en comparación con el grupo control y de 13 - 12% respecto del grupo vehículo ara la variable tratamiento se mostro una $F= 73.63$ mientras que en la variable tiempo se mostro una $F= 17.02$.

Memoria de largo plazo

Esta prueba fue aplicada al día siguiente después de realizar la prueba de memoria de corto plazo. Los resultados mostraron que hay una pérdida en la consolidación de la memoria a partir de la edad de 11 meses, como se observa en el grupo control. La administración crónica del vehículo no modificó el deterioro cognitivo de largo plazo, mientras que la administración con resveratrol previno la pérdida de la memoria a largo plazo (Fig. 13).

El índice de reconocimiento en el grupo resveratrol presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos control y vehículo a las edades de 11 meses ($37.8 \pm 2.53\%$ y $37.19 \pm 2.51\%$), 13 meses ($7.61 \pm 3.46\%$ y $8.96 \pm 3.51\%$), 15 meses ($7.93 \pm 4.46\%$ y $10.86 \pm 4.58\%$), 17 meses ($11.19 \pm 3.54\%$ y 13.12 ± 3.6), 19 meses ($12.71 \pm 3.12\%$ y $11.42 \pm 3\%$) y 21 meses ($9.73 \pm 2.85\%$ y $12 \pm 2.90 \%$) para este caso el valor de F para el tratamiento es de $F=70.99$.

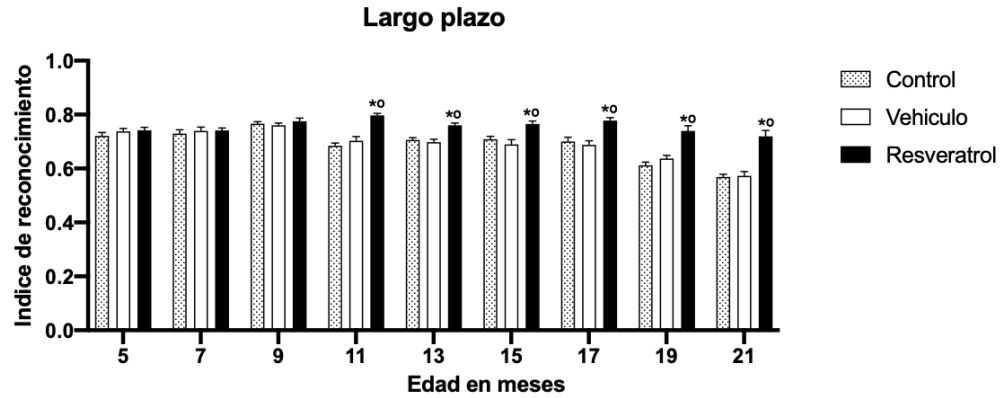


Figura 13. Evaluación de la memoria de largo plazo por la prueba de reconocimiento de objeto nuevos (NOR). Se muestran diferencias estadísticamente significativas en los grupos resveratrol respecto de los grupos control y vehículo. Los valores presentados son la media \pm EEM para una $n=8$. los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías *pot-hoc* Tukey, *representa diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control, °representa diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo vehículo ($p<0.05$).

Efecto del resveratrol sobre el estado redox en tejido hipocampal durante el envejecimiento.

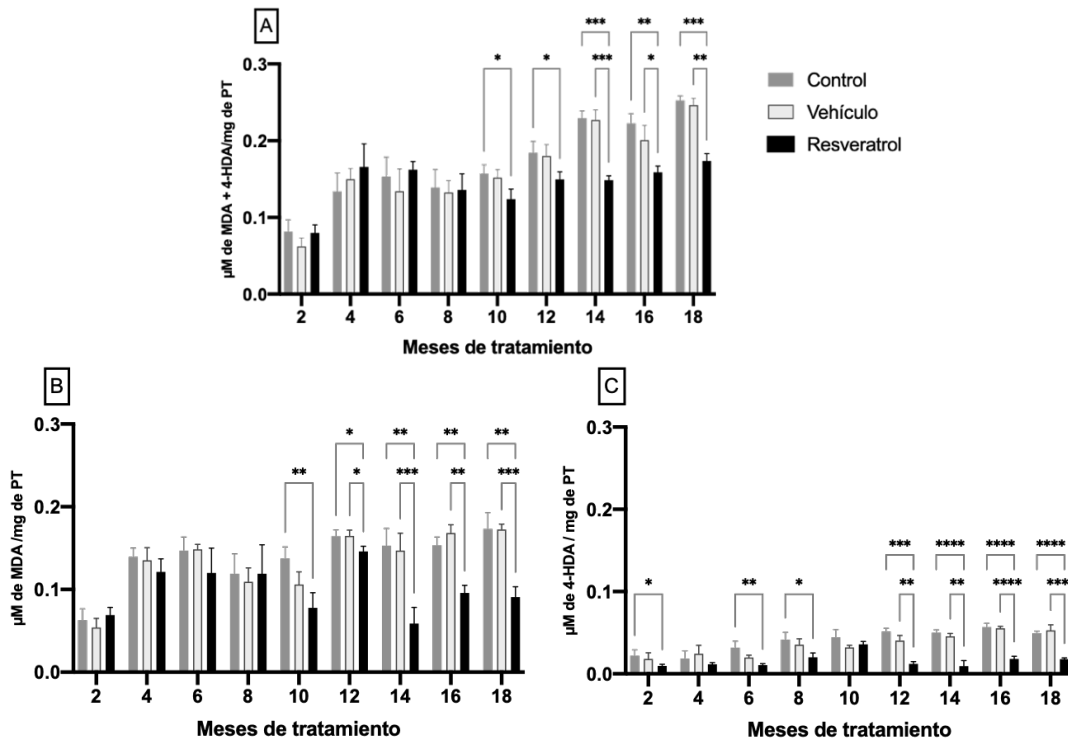


Figura 14. Efecto del resveratrol en niveles de lipoperoxidación A) MDA+4-HDA, MDA B) y 4-HDA C). Los valores presentados son la media \pm EEM, los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías *post-hoc* Tukey, representa diferencias estadísticamente significativas en * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$.

Para evaluar el estado redox en el hipocampo, se cuantificaron los niveles de moléculas prooxidantes y enzimas antioxidantes. Se encontró que, los grupos que no fueron administrados con resveratrol exhibieron un incremento de lipoperoxidación en términos de MDA y 4-HDA durante el envejecimiento, como se muestra en la figura 14A. Mientras que, en los grupos tratados con resveratrol se redujeron significativamente estos marcadores oxidativos ($p < 0.05$) a partir de los 10 meses y hasta los 18 meses de tratamiento como se muestra en la figura 14A, 14B y 14C. La interacción de la variable independiente tiempo ($F=128.3$) contra la variable independiente tratamiento ($F=27.4$) indica que el tratamiento es efectivo para reducir el proceso de lipoperoxidación cuando se administra por tiempos prolongados. Por otro lado, para el metabolito 4-HDA (figura 14C) se mostró una ($F=107.1$) para la variable tratamiento mientras que para la variable tiempo una ($F=39.08$), poniendo en evidencia que el tratamiento con resveratrol puede disminuir las concentraciones de 4-HDA, conservando esa tendencia hasta los 18 meses; este comportamiento explica la capacidad antioxidante del resveratrol para prevenir el deterioro celular.

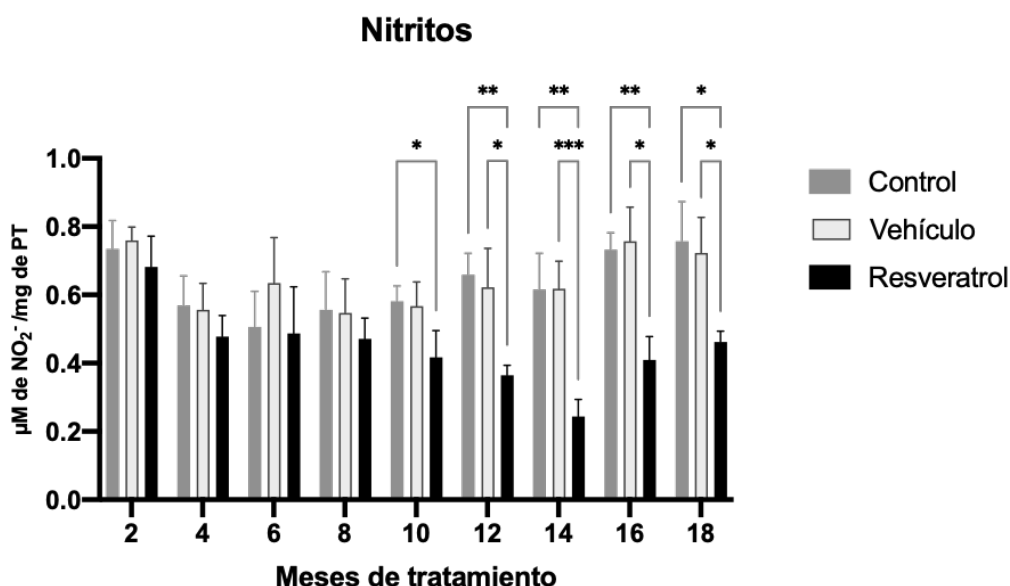


Figura 15. Efecto del resveratrol sobre los niveles de nitritos. Los valores presentados son la media \pm EEM, los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías post-hoc Tukey, representa diferencias estadísticamente significativas en * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En la concentración de nitritos (Fig. 15) se observó que el grupo administrado con resveratrol disminuye los valores significativamente a partir de los 10 y hasta los 18 meses de tratamiento ($p < 0.05$) en promedio hasta un 32% respecto del grupo control y vehículo. Para este caso, la distribución F para la variable tratamiento ($F = 54.15$) indicó que a partir de este periodo el resveratrol es oportuno para lograr disminuir los niveles de óxido nítrico, independientemente del tiempo.

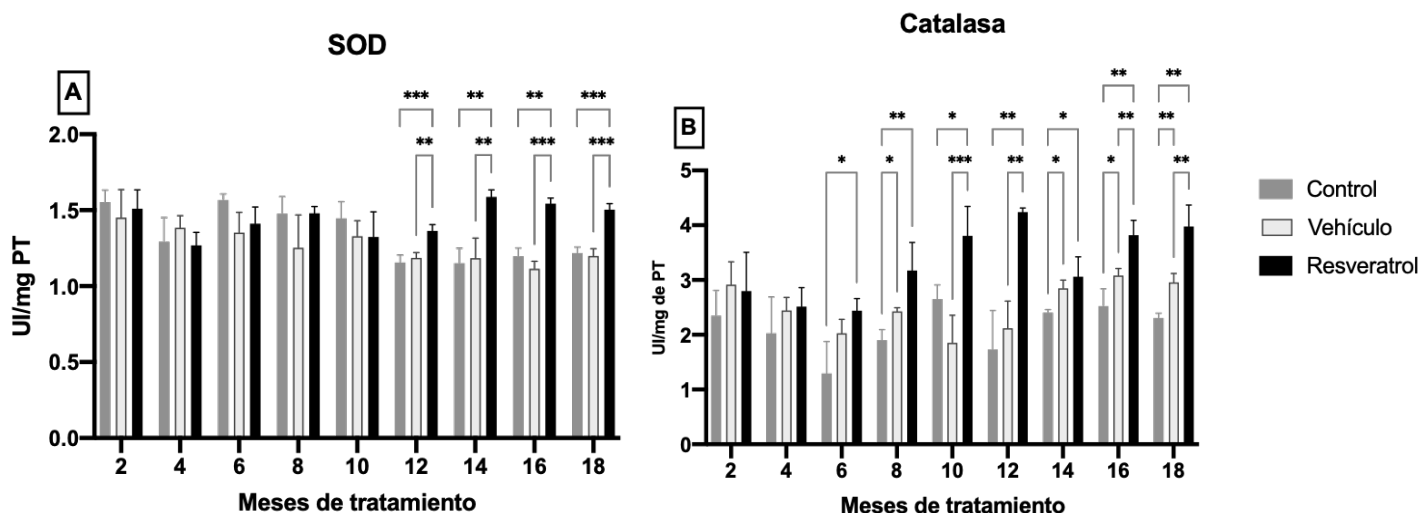


Figura 16. Impacto de la administración con resveratrol sobre la actividad de enzimas antioxidantes A) Superóxido dismutasa (SOD) y B) Catalasa (CAT) durante el envejecimiento. Los valores presentados son la media \pm EEM, los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías y pos hoc Tukey, representa diferencias estadísticamente significativas en * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Para analizar la actividad antioxidante de la primera línea de defensa en el hipocampo de ratas tratadas con resveratrol durante el envejecimiento, se evaluó la actividad enzimática de SOD y CAT. En particular, la administración con resveratrol mantuvo la actividad de SOD a partir de los 12 meses de tratamiento respecto de los grupos control y vehículo ($F = 18.61$) e incrementó la actividad de CAT desde los 6 meses de tratamiento respecto de los grupos control y vehículo ($F = 73.05$). Este patrón podría explicar procesos de acondicionamiento y adaptación por el tejido para un proceso de envejecimiento (Fig. 16A y 16B).

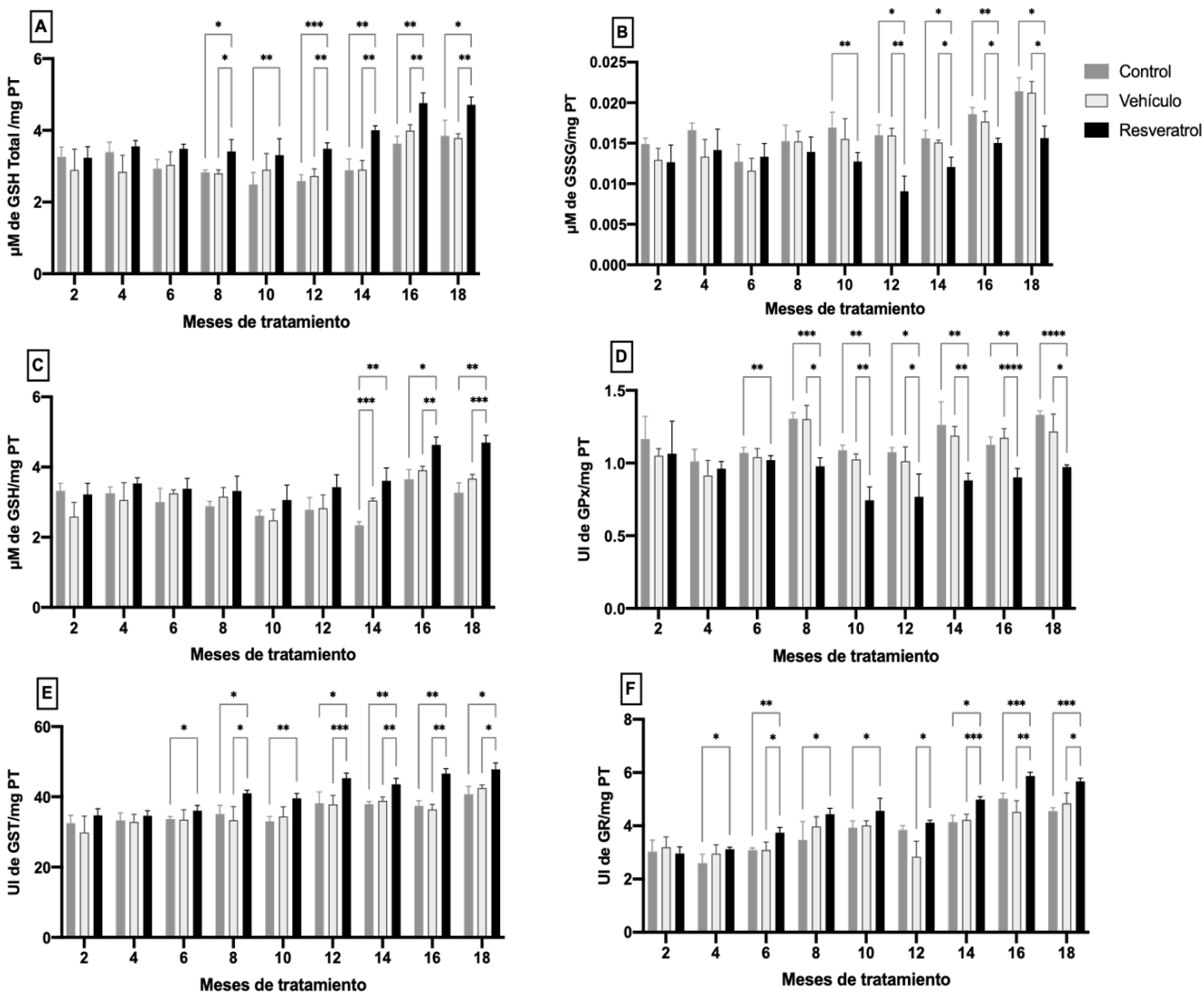


Figura 17. Efecto del resveratrol sobre el sistema antioxidante de glutación. A) Glutación total (GT), B) Glutación Oxidado (GSSG), C) Glutación Reducido (GSH), D) Glutación Peroxidasa (GPx), E) Glutación Transferasa (GST), F) Glutación Reductasa (GR). Los valores presentados son la media \pm EEM, los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías y pos hoc Tukey, representa diferencias estadísticamente significativas en * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

El sistema glutación también se evaluó en tejido hipocampal (Fig. 17). Los resultados mostraron que una exposición al resveratrol por periodos prolongados disminuye significativamente los niveles de glutación oxidado (GSSG) ($F=65.01$, Fig. 17B) y la actividad de la enzima glutación peroxidasa (GPx) ($F=181.1$, Fig. 17D) a

partir de los 10 meses de tratamiento respecto de los grupos control y vehículo. Por su parte, aumentó la disponibilidad de glutatión reducido (GSH) ($F=58.13$, Fig. 17C) desde los 14 meses de tratamiento, e incrementa la actividad de enzimas glutatión transferasa (GST) ($F=115$, Fig. 17E) desde los 6 meses, y la actividad de glutatión reductasa (GR) ($F=51.28$, Fig. 17F) desde los 4 meses de tratamiento, cuando se comparan con los grupos control y vehículo. Estos datos sugieren que el mantenimiento del sistema antioxidante es debido a la administración del resveratrol.

Una administración de resveratrol reduce los cambios morfológicos en el hipocampo en el envejecimiento.

Para la región del giro dentado (GD), se observó una ligera desorganización celular a partir de los 8 meses de tratamiento en los tres grupos. Sin embargo, después de los 10 meses de tratamiento, esta desorganización fue más evidente en los grupos control y vehículo y no en el grupo resveratrol. Por otro lado, el número de células fue significativamente más bajo en los grupos vehículo a partir de los 12 meses de tratamiento y significativo en los grupos control desde de los 14 meses en adelante (Fig. 18) ($F= 28.88$). En esta región del hipocampo se evidenció una picnosis neuronal a partir de los 4 meses de tratamiento en los grupos control, mostrando diferencias significativas respecto de los grupos vehículo y resveratrol. A partir de los 6 meses se observó una picnosis evidente en los grupos control y vehículo. Sin embargo, en los animales tratados con resveratrol se previno la picnosis ($F= 682$).

La celularidad de la región CA3 (Fig. 19) del hipocampo disminuyó en los grupos control y vehículo a partir de los 8 meses hasta los 18 meses de tratamiento con respecto del grupo resveratrol ($F=65.07$). Para esta región no se observó una desorganización celular; sin embargo, se evidenció un incremento en la presencia de células picnóticas en todos los grupos de todos los periodos de tratamiento, mostrándose diferencias estadísticamente significativas en los grupos vehículo y control a partir de los 12 y hasta los 18 meses de tratamiento con respecto a los

grupos resveratrol ($F=12.25$), lo que sugiere que el tratamiento con resveratrol disminuye la generación de células picnóticas.

Después de 8 meses de tratamiento, las ratas control y vehículo mostraron una disminución neuronal en el hipocampo de la región CA1 en comparación con el grupo resveratrol, una tendencia observada hasta los 18 meses de tratamiento ($F=39.50$) (Fig. 20). También fue posible observar una estructura levemente desorganizada en el grupo control y vehículo de 8 meses en adelante en comparación con el grupo resveratrol. Estos datos sugieren que el resveratrol está cumpliendo su función de proteger a las células neuronales, lo que podría explicar que las ratas envejecidas tratadas con resveratrol conservan las funciones de memoria y el aprendizaje.

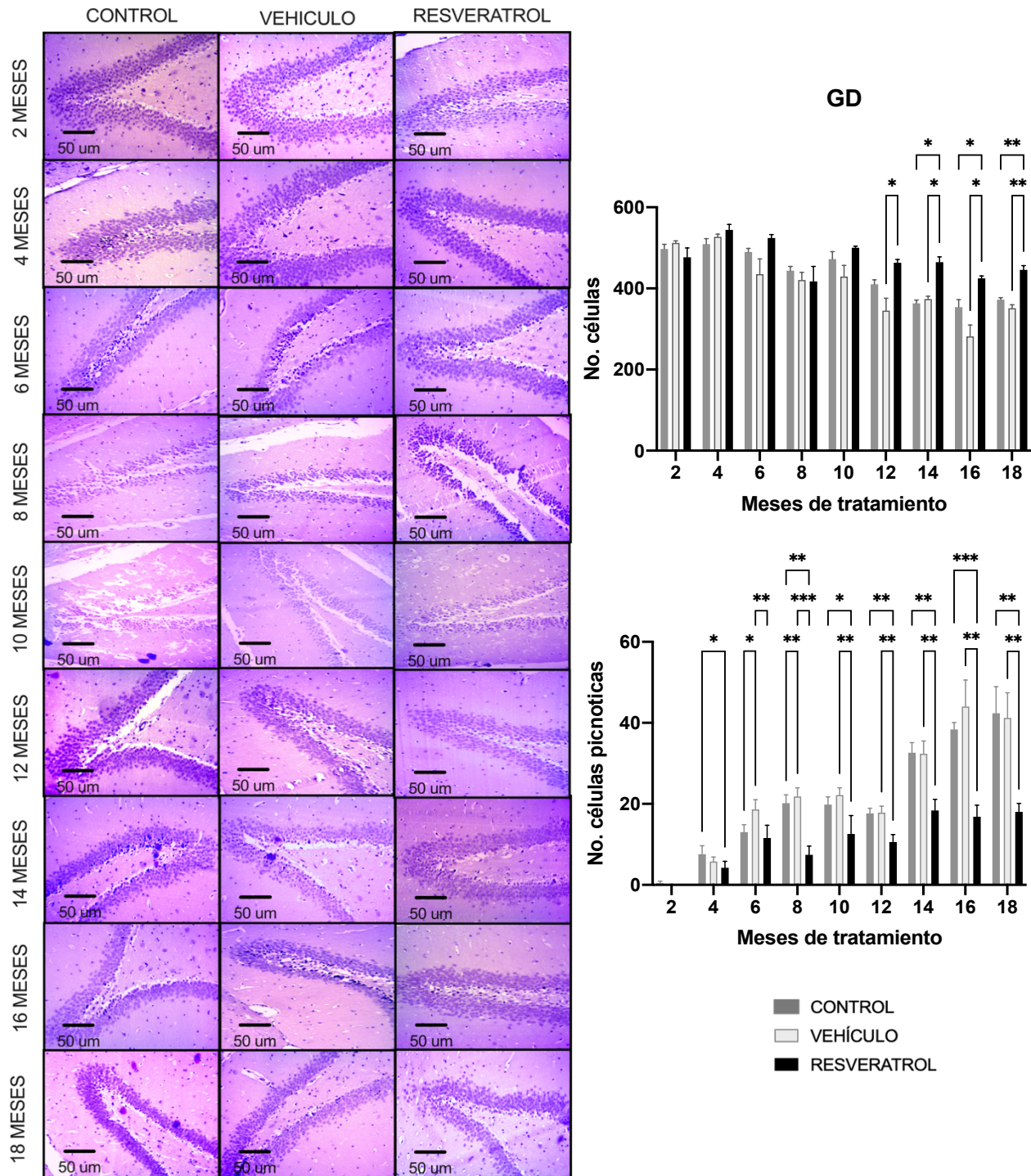


Figura 18. Efecto del resveratrol sobre el número y la organización celular en la región de GD del hipocampo durante el proceso de envejecimiento. Micrografías tomadas a 10X. Se muestran diferencias estadísticamente significativas en los grupos resveratrol respecto de los grupos control y vehiculo. Los valores presentados son la media \pm EEM, los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías y pos hoc Tukey, representa diferencias estadísticamente significativas en * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

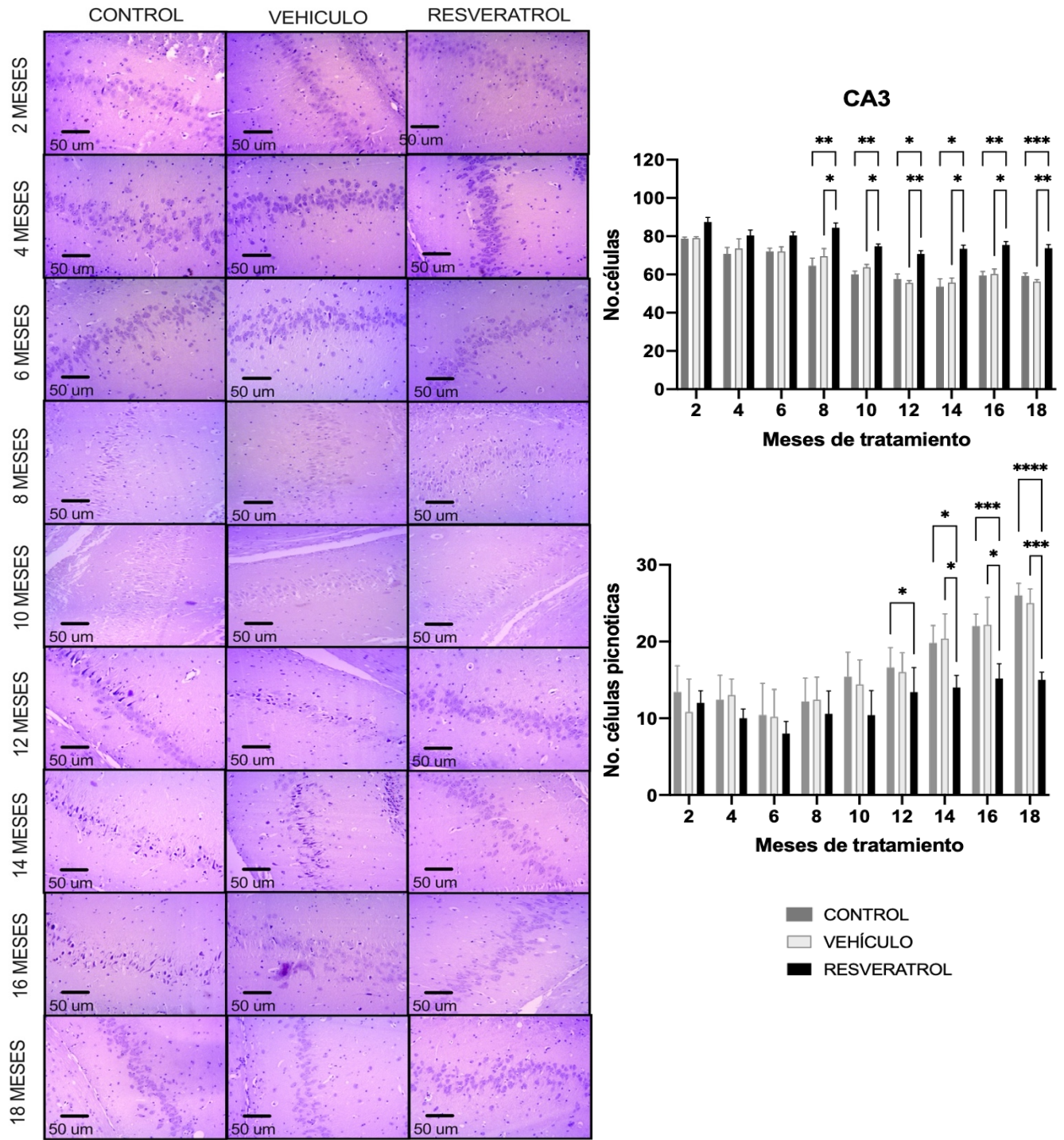


Figura 19. Efecto del resveratrol sobre el número y la organización celular en la región de CA3 del hipocampo durante el proceso de envejecimiento. Micrografías tomadas a 10X. Se muestran diferencias estadísticamente significativas en los grupos resveratrol respecto de los grupos control y vehiculo. Los valores presentados son la media \pm EEM, los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías y pos hoc Tukey, representa diferencias estadísticamente significativas en * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

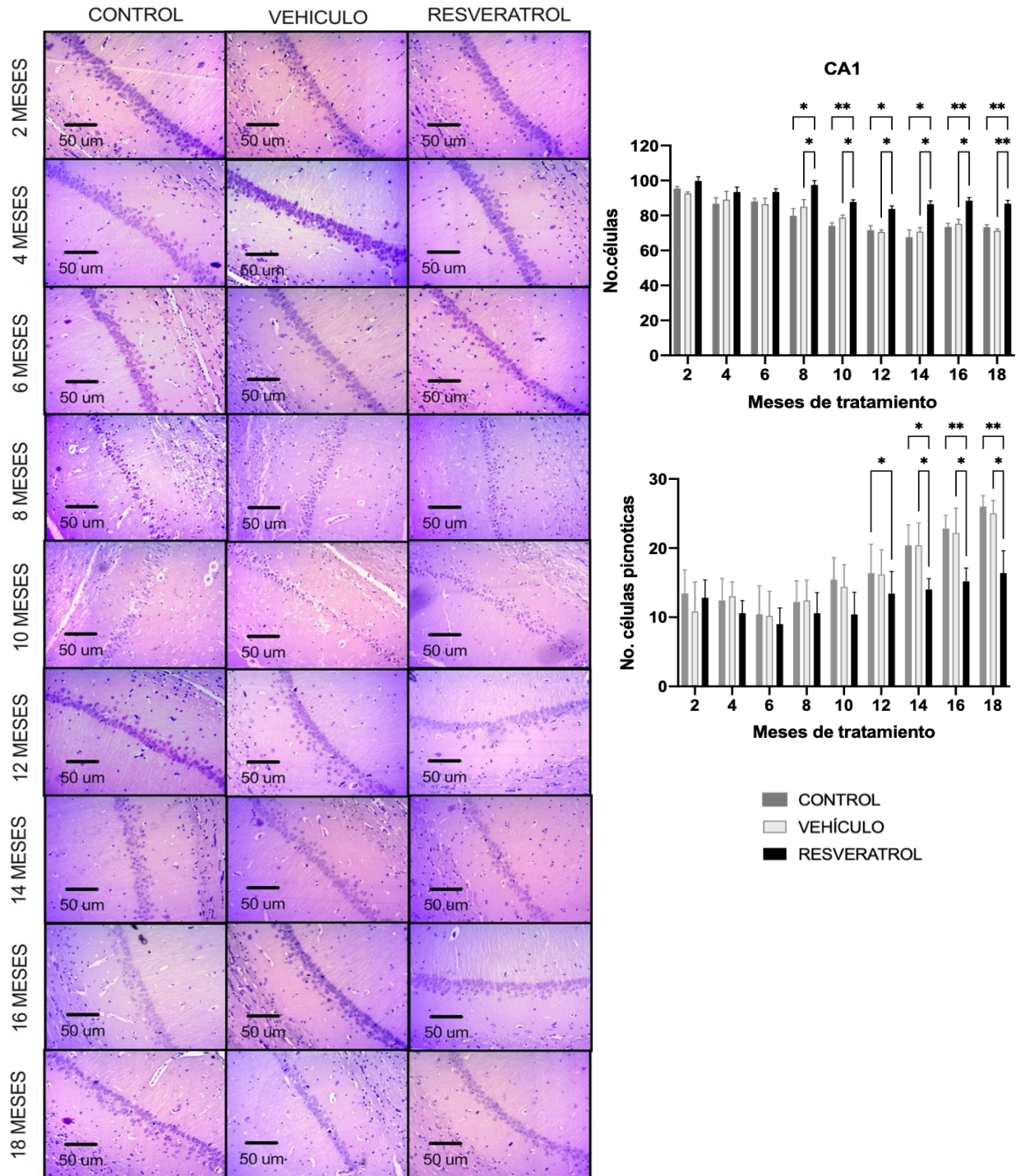


Figura 20. Efecto del resveratrol sobre el número y la organización celular en la región de CA1 del hipocampo durante el proceso de envejecimiento. Micrografías tomadas a 10X. Se muestran diferencias estadísticamente significativas en los grupos resveratrol respecto de los grupos control y vehiculo. Los valores presentados son la media \pm EEM, los datos fueron analizados por ANOVA de dos vías y pos hoc Tukey, representa diferencias estadísticamente significativas en * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

El resveratrol previene la muerte neuronal del hipocampo en la región de GD, CA3 y CA1.

Los datos se obtuvieron mediante tinción con naranja de acridina, como se describió anteriormente. El número de neuronas disminuyó en los grupos de control y vehículo. Por otro lado, el resveratrol conservó un número significativo de neuronas viables. Según la comparación de las células hipocampales presentes en GD, CA3 y CA1 de los grupos control y vehículo tenían mayor susceptibilidad a la muerte neuronal de una manera dependiente del tiempo (células con fluorescencia verde y mayor fluorescencia roja) (figura 21) que las del grupo resveratrol, las cuales mostraron una transición inicial de muerte celular (células con fluorescencia verde y mínima fluorescencia roja).

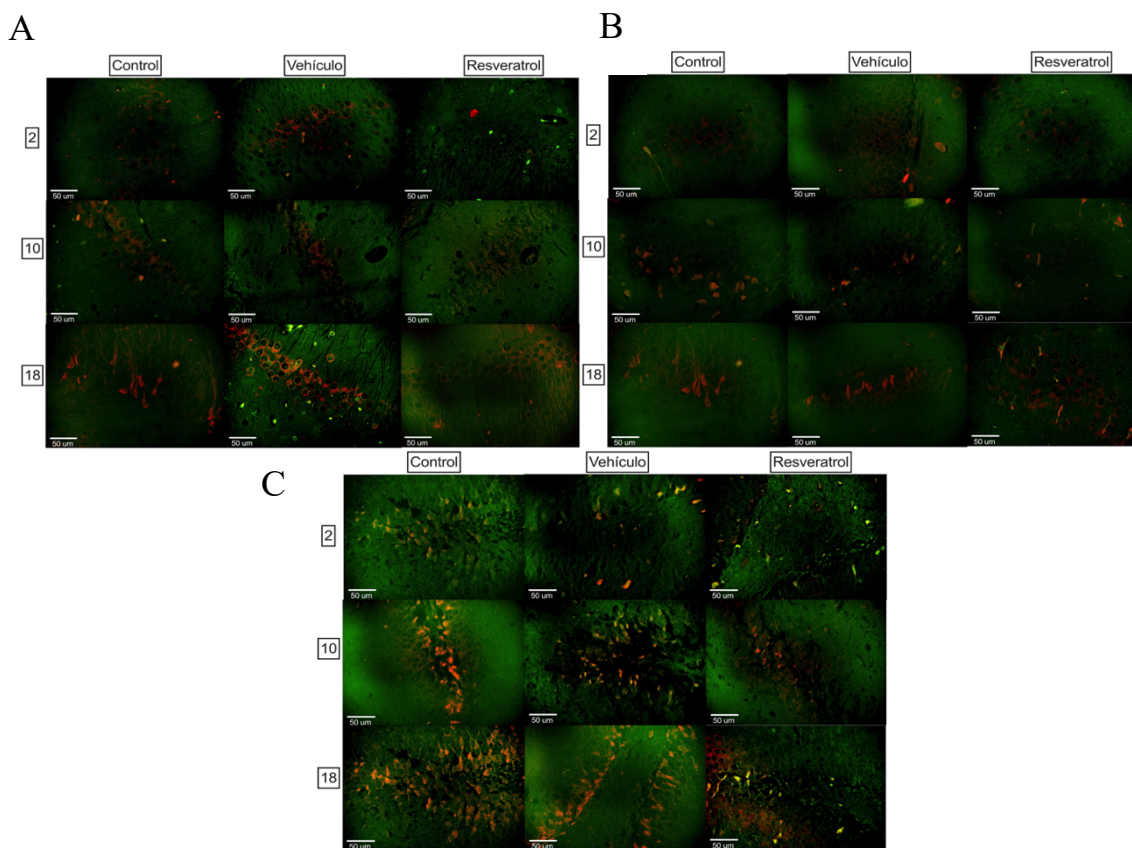


Figura 21. El resveratrol protege de la muerte celular durante el envejecimiento. A) células del hipocampo región CA1, tinción con naranja de acridina. B) células del hipocampo región de CA3. C) células del hipocampo región GD, tinción con naranja de acridina. Micrografías tomadas a 20X.

8. DISCUSIÓN

El uso de modelos murinos para el estudio de aspectos relacionados con la edad tiene diversas ventajas, incluyendo su tamaño y fácil manejo, tiempo de vida media, que permiten evaluar el efecto de diversos tratamientos en periodos cortos y durante el desarrollo del envejecimiento. Particularmente estudios en rata han cobrado gran fiabilidad para evaluar los cambios cognitivos y conductuales que ocurren a partir del sistema nervioso central ya que se ha demostrado que son similares a las alteraciones presentadas en seres humanos durante el envejecimiento [Carola et al., 2021]. En el presente trabajo, con el fin de observar si el resveratrol genera cambios positivos durante el envejecimiento, evaluamos a nivel conductual, químico, enzimático e histológico el hipocampo de ratas de la cepa Wistar.

En los últimos años el resveratrol ha sido una molécula de interés para la comunidad científica debido a los múltiples beneficios que han sido demostrados para la salud. Algunos de los efectos que se han descrito del resveratrol son: quimio protectora [Jang M, 1997], mimético de la restricción calórica [Nicolai, et al., 2015], extiende la vida, mejora los fenotipos relacionados con el envejecimiento [Park S. et al., 2012] y actúa como neuroprotector [Chuang, et al., en 2019]. Para este trabajo se consideró la actividad del resveratrol como una molécula preventiva de daño celular asociado al envejecimiento, neuroprotectora de células hipocampales.

El resveratrol, uno de los fenoles de mayor importancia, su administración como compuesto puro se ve afectada su actividad biológica, por lo que entre los factores considerados como esenciales para favorecer su farmacocinética y farmacodinámica, el vehículo de base alcohólica similar al vino se ha retomado en este estudio. Los parámetros básicos asociados con la actividad del resveratrol son la concentración plasmática máxima (C_{max}), el tiempo transcurrido hasta lograr la C_{max} , la vida media de la molécula y el tiempo de exposición. Existe evidencia sólida de que la respuesta *in vitro* e *in vivo* al resveratrol depende de la dosis y tiempo exposición [Thompson, et al., 2014; Stocco et al., 2012; Peltzl L. et al., 2012].

También se desconoce actualmente si maximizar la C_{max} o el tiempo de exposición es más importante para la eficacia clínica del resveratrol. Independientemente del tipo de exposición que sea más importante, primero se deben absorber cantidades suficientes de resveratrol hacia el torrente sanguíneo y biodistribuirse a los tejidos blanco.

Los ensayos clínicos en humanos se han centrado en dosis orales únicas o múltiples de cápsulas y tabletas de resveratrol, y la mayoría de los datos de biodisponibilidad en humanos reflejan este método de administración. Estas dosis orales se han administrado a través de varios regímenes de dosis, tamaños y formulaciones fisiológicas [Eliot, P. et al., 2022]. En última instancia, varios factores influyen en los parámetros farmacocinéticos de la administración oral, incluidos todos aquellos relacionados con la molécula en sí, la fisiología y las características individuales [Fan, et al., 2014]. El resveratrol se absorbe a un ritmo relativamente alto a través del intestino delgado [Walle, et al., 2006]. El carácter pequeño y no polar del *trans*-resveratrol puede permitir su absorción a través de las membranas por difusión pasiva; sin embargo, existen pruebas convincentes de que el resveratrol se transporta principalmente a través del epitelio intestinal a través de las células a través del casete de unión dependiente de ATP (ABC) transportadores [Planas, JM. et al., 2012]. Dentro de los enterocitos del intestino delgado y los hepatocitos del hígado, la conjugación de glucurónido y sulfato del *trans*-resveratrol con los principales metabolitos es extensa [Miksits, M. et al., 2005]. Esta conjugación con sulfatos y glucurónidos aumenta la solubilidad acuosa del resveratrol y reduce el flujo a través de las membranas, lo que evita que las moléculas no polares interactúen con las macromoléculas esenciales y permite la excreción renal a través de la orina [Boocock, et al., 2007]. El amplio metabolismo de los conjugados de glucurónido y sulfato durante la absorción está bien descrito y disminuye los niveles circulantes de *trans*-resveratrol libre. Por lo tanto, el metabolismo del resveratrol finalmente da como resultado cantidades relativamente pequeñas de *trans*-resveratrol libre en el plasma para ser entregado a otros tejidos [Vitaglione, P. et al., 2005].

La evidencia de la actividad y el reciclaje de los metabolitos en ciertos tejidos requiere cierta consideración de su biodisponibilidad, pero la biodisponibilidad del resveratrol en sí sigue siendo actualmente la más relevante. Al medir la farmacocinética y la actividad de un profármaco, es habitual centrarse en los niveles de la molécula activa y, por lo tanto, la biodisponibilidad del resveratrol sigue siendo relevante dado el estado actual de la literatura. Independientemente, los metabolitos contribuyen a la mayor parte de la concentración total de resveratrol después de la administración oral y, por lo tanto, lógicamente existen pocas opciones para aumentar aún más los niveles de metabolitos *in vivo* [Brown, *va et al.*, 2010]. Boocock informó la C_{max} para dos metabolitos de monoglucurónido separados, para una concentración total de metabolitos de glucurónido de $\sim 7,5 \mu M$ después de una dosis oral única de 5.0 g de resveratrol [Boocock, *et al.*, 2007]. Incluso con esta dosis alta, la concentración de metabolitos se mantiene muy por debajo de las concentraciones utilizadas para los experimentos *in vitro*. Por lo tanto, incluso si los metabolitos juegan un papel en los efectos fisiológicos *in vivo* del resveratrol, las estrategias para mejorar la biodisponibilidad siguen siendo muy relevantes. Sin embargo, dosis únicas no generan un efecto prolongado, es por ello que, en el presente trabajo se optó por una dosis baja, pero de administración crónica (10 mg/kg/día), que garantice un flujo y biodistribución constante, y por tanto se observen efectos positivos a largo plazo, tanto en la fisiología de los individuos, como en el funcionamiento tisular.

En este sentido se sabe que, con el paso de los años el peso corporal de un individuo presenta cambios, generalmente tiende a aumentar durante la vida hasta los 70 u 80 años, después de lo cual se observa un declive gradual [Kim, 2018]. Los cambios fisiológicos del envejecimiento se reflejan en la composición corporal, traducidas en la pérdida de masa muscular y el aumento de la masa grasa total. Además, la masa grasa subcutánea disminuye, mientras que la grasa visceral, la grasa hepática y la infiltración de grasa muscular generalmente aumentan con la edad. El aumento de la masa grasa total y la pérdida de masa muscular son

independientes de los cambios de peso [Reinders I, Visser M, and Scahaap L, 2017].

Silveira et al. 2019 describen que el peso corporal en rata la incrementa gradualmente hasta 18 meses de vida y posteriormente una tenue disminución durante los siguientes meses de vida. A partir de nuestro análisis se observó un incremento gradual en el peso en los animales hasta los 19 meses de vida y posteriormente un ligero decremento a los 21 meses por parte del grupo control y vehículo. El peso de las ratas de experimentación puede ser afectado por múltiples factores como la manipulación, el tipo y calidad de la comida, la densidad poblacional de los animales en una jaula, la temperatura, humedad, el régimen de luz/oscuridad y la oportunidad de movimiento activo de los animales. Dentro de las características de la alimentación se encuentra la suplementación, en donde dependiendo del tipo de suplemento se puede favorecer o no la regulación del peso corporal, en este trabajo, la administración con resveratrol cumplió esta función. El peso corporal de los animales tratados con resveratrol mostró una tendencia al mantenimiento de este parámetro en función del tiempo. Este patrón en el peso de los sujetos de experimentación coincide con lo descrito por el grupo de investigación de Cossio [Cossio BM, 2013]. Un estudio de tipo metanálisis demostró que la ingesta de resveratrol redujo significativamente el peso, el índice de masa corporal y de cintura cadera, la masa grasa, y aumentó significativamente la masa magra, pero no afectó los niveles de leptina y adiponectina de los participantes [Tabrizi, R. et al., 2020]. Aunque en otro metaanálisis el cual se enfocó en pacientes con obesidad se demostró que la suplementación con resveratrol no tuvo efecto sobre los parámetros antropométricos antes mencionados [Delpino, FM et al., 2021]. Nuestros resultados en cuanto al peso corporal no mostraron diferencias del grupo resveratrol respecto de los grupos control y vehículo (Fig. 10A).

Otra arista de la mejora en la calidad de vida por la suplementación de antioxidantes tipo polifenol es la longevidad de los individuos que los consumen. En este sentido, las ratas de la cepa Wistar viven un promedio de 2 a 3.5 años, mientras

que un humano vive un promedio de 80 años [Lares Asseff, et al., 2008]. Aunque, la esperanza de vida de cada individuo depende de varios factores como la alimentación, el ambiente social y natural donde se desarrolla, etc. En este estudio, la esperanza de vida aumentó en los animales los 21 meses de edad después de ser tratadas con resveratrol, mientras que, la tasa de mortalidad incrementó en los grupos control y vehículo a partir de los 15 meses de edad (Fig. 10B). Estos datos sugieren que uno de los efectos del resveratrol como molécula preventiva del daño por envejecimiento es mejorar la esperanza de vida.

Se ha demostrado que el resveratrol está involucrado en una gran variedad de vías de señalización que preservan la vida útil de las células, reflejándose en la extensión de vida de un organismo. Una de las rutas metabólicas más estudiadas con relación a la extensión de vida de un individuo, es el de las sirtuinas. Las sirtuinas son una familia conservada evolutivamente de desacetilasas y ADP-ribosiltransferasas que derivan su nombre de *Saccharomyces cerevisiae* SIR2 (Silent Information Regulator 2), el primer miembro de la familia en ser descrito. Los homólogos de SIR2 prolongan la vida cuando se sobreexpresan en levaduras, gusanos y moscas. A diferencia de otras desacetilasas, la actividad de las enzimas sirtuinas está vinculada a procesos metabólicos dentro de la célula a través de un requerimiento de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) [Jesko and Stroszbajder, 2016; Kupis et al., 2016; Vaziri ,H. et al., 2001]. La participación de factores específicos asociados a las sirtuinas depende del protocolo empleado Greer, E. L. et al., 2009]. El potencial de las siete sirtuinas en mamíferos (SIRT1–7) para influir positivamente en la longevidad aún no está claro, aunque se ha visto que son ampliamente distribuidas en los tejidos. Sin embargo, ratones sin SIRT1 tienen una vida corta y cuando se les sobreexpresa SIRT1 induce fenotipo de longevidad Lamming, et al., 2006]. En este fenotipo se ha demostrado la actividad de la SIRT4 en el páncreas y SIRT1 en el Hígado Haigis, et al., 2006].

Basándose en la idea de que las sirtuinas podrían mediar los efectos beneficiosos, Howitz et al. realizó un cribado de activadores de moléculas pequeñas

de SIRT1 e identificó que el resveratrol tiene actividad quimiopreventiva por esta vía [Howitz, et al., 2003]. Se ha demostrado que el resveratrol prolonga la vida en levaduras, gusanos y moscas de una manera dependiente de SIR2 (homólogo de SIRT1) [Wood, J C et al., 2004]. Adicionalmente, una serie de experimentos en *N. furzeri*, una especie de pez de vida corta proporcionó más apoyo a la capacidad del resveratrol para mejorar la salud y prolongar la vida. El resveratrol no solo prolongó el promedio de vida hasta en un 56%, sino que también mejoró la función motora y retrasó los procesos neurodegenerativos en estos animales [Valenzano, et al., 2006]. Estos experimentos en organismos inferiores sentaron las bases para probar los efectos del resveratrol en la longevidad de los mamíferos. En ratones obesos la suplementación con resveratrol aumenta la supervivencia, de tal manera que su esperanza de vida fue equivalente a la de los animales delgados no tratados. Sin embargo, agregar resveratrol a la dieta de ratones con una dieta normal no produce ningún aumento adicional, lo que sugiere que el resveratrol podría estar contrarrestando principalmente las consecuencias negativas de la obesidad, en lugar de retrasar el envejecimiento [Pearson, K. et al., 2008].

Un estudio realizado en humanos, tanto en varones como en mujeres como parte del Programa de Pruebas de Intervención del Instituto Nacional sobre el Envejecimiento tampoco encontró un aumento significativo en la supervivencia [Miller, R. et al., 2010]. Sin embargo, al analizar los datos en relación con el tiempo de suplementación, se observó que las intervenciones preventivas tienen un mayor efecto sobre la longevidad [Weindruch, R. et al., 1982]. Por esta razón, varios grupos se enfocan actualmente en intervenciones y cohortes temporales que se inician una suplementación con resveratrol y otros polifenoles a una edad más temprana, aunque hasta el momento no se han reportado resultados positivos. Los análisis post-mortem respaldan la hipótesis de que la prolongación de la vida que se ha observado se debe principalmente a la mejora de las complicaciones vasculares y el hígado graso [Agarwal B. et al., 2011].

Con base en estos estudios se ha planteado la hipótesis de que el resveratrol actúa como un mimético de la restricción calórica basado en la observación de que puede activar SIRT1 [Howitz, K. T. et al., 2003]. Muchos de los efectos que se han observado en animales tratados con resveratrol son consistentes con la modulación de los objetivos de SIRT1, particularmente el coactivador transcripcional peroxisome proliferator activador gamma coactivator 1 alfa (PGC-1 α), el factor respiratorio nuclear (NRF-1) y el factor de transcripción mitocondrial (Tfam), todos ellos juegan un papel preponderante en la sobrevivencia y bioenergética celular [Chuang et al., en 2019; Hou et al., 2018]. Sin embargo, se sabe que el resveratrol produce una amplia gama de efectos en células de mamíferos, incluida la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), un sensor de energía que está involucrado en algunas de las mismas vías que SIRT1 y fosforila PGC-1 α directamente [Baur, J. A. et al., 2006]. Aunque SIRT1 puede activar la quinasa aguas arriba de AMPK, esta vía no parece ser necesaria para la estimulación de AMPK por resveratrol y, de hecho, hay alguna evidencia que sugiere que SIRT1 podría estar aguas debajo de AMPK [Dasgupta, B. et al., 2007; Canto, C. et al., 2010]. Por lo tanto, en estudios futuros será importante probar cuidadosamente el papel de SIRT1 en los cambios fisiológicos inducidos por el resveratrol.

A medida que las personas atraviesan edades superiores a los 60 años el cerebro se vuelve susceptible a cambios que lo convierten en el órgano más afectado durante el proceso de envejecimiento [Flores et al., 2020]. La plasticidad cerebral cambia con el tiempo porque es altamente vulnerable a modificaciones estructurales, químicas y funcionales dependientes del tiempo [Islam et al., 2017; Danka Mohammed et al., 2017; Baghel M S et al., 2017]. La disminución del número, diámetro, longitud, ramificación y densidad dendrítica, también se hace evidentes [Isaev et al., 2018]. La conexión de estas estructuras se da por proyecciones glutamatérgicas y se alteran durante la progresión de trastornos neurodegenerativos. La pérdida gradual de la conectividad neuronal debida al envejecimiento provoca déficits cognitivos [Flores et al., 2016]. Así mismo, los cambios morfológicos están asociados a una disminución en varias vías de

neurotransmisión incluida la vía de acetilcolina, glutamato y dopamina, que también participan en procesos cognitivos y motores [Kumar and Foster, 2019; Luo et al., 2019].

Recientemente se describió que la longitud de las espinas dendríticas es regulada por algunos factores incluida la familia de neurotrofinas como el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y su receptor TrkB [Zhang, et al., 2016]. Estas neurotrofinas disminuyen con la edad. Especialmente el BDNF es considerado como un factor de riesgo para desarrollar déficits cognitivos, ya que deficiencias en la señalización de BDNF/TrkB están altamente correlacionadas con cambios en las espinas dendríticas durante el envejecimiento [Zagrebelsky, et al., 2020]. Particularmente, el hipocampo es una región sumamente susceptible a cambios estructurales que conllevan a la pérdida de la memoria declarativa [Navarro, et al., 2017].

En este sentido en la primera fase de nuestro estudio se evaluó el efecto del resveratrol sobre la conducta (actividad horizontal) y la cognición (memoria a corto y largo plazo). Para ello, a menudo se utiliza el paradigma de reconocimiento de elementos de Stenberg, este evalúa el deterioro cognitivo en humanos. Sin embargo, se ha adaptado y validado en modelos murinos, en estos, se presenta un pequeño grupo de elementos llamado conjunto positivo, para que el sujeto lo memorice, después de un rato se presenta un sólo elemento que puede ser familiar o novedoso que se haya mostrado o no antes, y se evalúa el reconocimiento por medio de la exploración [Nosofsky, et al., 2011; Ratto et al., 2019], la prueba es comúnmente conocida como NOR, que evalúa la capacidad para reconocer un objeto familiar o novedoso [Lueptow, 2017].

Los resultados del análisis de la actividad locomotora indican que el rendimiento de los roedores disminuye con respecto de la edad en los grupos control y vehículo (Fig. 11). Sin embargo, en los animales administrados con resveratrol la capacidad motora se mantiene independientemente de la edad. Adicionalmente, los

animales de este mismo grupo tienen menor riesgo en la pérdida de la memoria de corto y largo plazo (Fig. 12 y 13). Se sabe que la suplementación con resveratrol puede modular la actividad de diversos elementos celulares incluyendo las sirtuinas. Esta característica acopla la actividad de la sirtuina al estado metabólico celular, lo que permite la modulación de proteínas cruciales de la cadena de transporte de electrones (ETC), la respuesta al estrés y la señalización de sobrevivencia / muerte [Covington and Bajpeyi, 2015].

En el cerebro, estas enzimas presentan un patrón espacio-temporal altamente regulado y pueden influir en el curso del envejecimiento y los cambios patológicos. Además, se interrelacionan con un amplio espectro de factores de transcripción, incluido el subgrupo O (FOXO), p53, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-KB) y proteínas que participan en la reparación del ADN como proteína quinasa dependiente del ADN (ADN-PK) [Jesko and Stroszbajder, 2016; Watroba and Szukiewicz, 2016]. Adicionalmente, las sirtuinas controlan y contrarrestan el estrés y el daño macromolecular asociado al envejecimiento. Las sirtuinas están unidas bidireccionalmente a las vías de señalización de la insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1). IGF-1 aumenta la expresión de SIRT1 a través de JNK1 (c-Jun N-terminal quinasa 1). A su vez, SIRT1 restaura la actividad de la diana Akt del receptor de IGF / insulina. La síntesis de IGF-1 disminuye en organismos viejos, lo que probablemente causa una proporción significativa de las alteraciones observadas, que finalmente se correlacionan con el envejecimiento y la función cerebral. La supresión de FOXO se observa en el estrés asociado al envejecimiento, como el daño oxidativo o la inanición. La SIRT1 sobre la supervivencia neuronal a largo plazo actúa como moduladora de la longevidad, esta enzima se produce a través de eventos de señalización en regiones específicas del SNC, influenciadas por FOXO [Lee and Min, 2013; Pardo et al., 2016; Hyun et al., 2008].

Se ha observado un bajo nivel o actividad de SIRT1 en el hipocampo en ratas envejecidas y en humanos que desarrollan enfermedad de Alzheimer también se observó una acumulación de β -amiloide (A β) y proteína *tau* hiperfosforilada

[Wiciński, et al., 2020]. Sin embargo, la administración de resveratrol (30 mg/kg/día durante 8 semanas) en modelos animales restauró el nivel y la actividad de SIRT1 [Chao, et al., 2017]. SIRT1 promueve el crecimiento de neuritas, mejora la plasticidad neuronal en la región del hipocampo, reduce el nivel hiperfosforilado de *tau* y protege contra la neurodegeneración. La administración de resveratrol reduce la expresión de ubiquitina ligasa midline-1 (MID1) y aumenta la actividad de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), que promueve la desfosforilación de tau al evitar su acumulación [Cicero, et al., 2019; Wiciński, et al., 2020].

La importancia de esta vía también se ha descrito en modelos de rata con patrón de tipo Alzheimeriano neuropatológico inducido. La administración de resveratrol reduce el depósito de amiloide fibrilar, la carga de placas y ovillos, y elimina los péptidos A β [Wahl, et al., 2019]. Otros estudios informan que el resveratrol disminuye la neuroinflamación, aumenta la plasticidad sináptica y mejora la inmunidad [Wahl et al., 2019]. La activación de SIRT1 después de la administración de resveratrol atenuó la hiperfosforilación de *tau* inducida por la inyección intracerebroventricular de estreptozotocina, lo que confirma la protección de las neuronas del hipocampo, previniendo la neurodegeneración y los déficits cognitivos [Cicero et al., 2019; Wiciński, et al., 2020].

Con lo antes mencionado y en base a los resultados conductuales y de memoria recopilados en este proyecto sugerimos que el resveratrol tiene la capacidad de interactuar de manera directa e indirecta con diversos elementos celulares implicados en procesos de degeneración, neurotoxicidad y en contraste con vías de señalización implicadas en supervivencia celular ya que nuestro análisis mostró un mantenimiento de la memoria a corto y largo plazo aún en edades avanzadas sin mostrar diferencias significativas con los grupos control de 2 meses, como se observó en los grupos control y vehículo.

Por otro lado, es bien conocido que el cerebro es propenso al daño oxidativo debido a sus niveles comparativamente altos de metabolismo del oxígeno y la composición única de su membrana celular que contiene grandes cantidades de

PUFAs sensibles a la oxidación. El estrés oxidativo se ha asociado en una variedad de condiciones neurológicas agudas y crónicas e incluso el envejecimiento. En este proyecto se evaluó el estado redox mediante algunos marcadores oxidativos, así como el sistema antioxidante endógeno. La progresión al envejecimiento mostró un deterioro progresivo del balance redox de las células hipocampales en los grupos experimentales control y vehículo. Mientras que, el estado redox mejoró notablemente en el grupo administrado crónicamente con resveratrol.

El proceso de envejecimiento fisiológico induce cambios en todos los niveles de la organización biológica que son contrarrestados por mecanismos de respuesta adaptativa alostática encaminados a preservar la composición y función dentro de los límites homeostáticos. La membrana celular no es una excepción y, en consecuencia, cuanto más tiempo se mantenga la composición lipídica óptima de la membrana, mejor será la supervivencia y función de la célula [Hagen, s. et al., 2010]. Sin embargo, el deterioro de la estructura y función del cerebro humano adulto durante el envejecimiento no es uniforme. En consecuencia, el envejecimiento del cerebro humano debe considerarse como un proceso heterogéneo probablemente sujeto a una vulnerabilidad específica de la región (e incluso de la célula). Sin embargo, la vulnerabilidad regional a menudo se ignora en el estudio del envejecimiento cerebral. La vulnerabilidad regional se refiere a la particular sensibilidad de una determinada región al daño por distintos estímulos nocivos y a su capacidad específica para responder con las defensas adecuadas. En este marco, es plausible plantear la hipótesis de que las diferencias interregionales en la composición de lípidos del cerebro humano, además de las diferencias en las condiciones de estrés oxidativo, podrían ser responsables de esta vulnerabilidad que, a su vez, conduce a diferentes tasas de envejecimiento.

Dos estudios iniciales, de los años 50 y 60, ambos realizados en muestras de cerebro completo, ofrecieron la primera evidencia de que la composición lipídica de la membrana del cerebro humano cambia con el envejecimiento [Burger, K. 1958; Rouser, A. 1968]. Encontraron que la cantidad de lípidos totales disminuía después

de la segunda década de vida. Estudios posteriores confirmaron la aparición de alteraciones lipídicas relacionadas con la edad en diferentes áreas del cerebro humano. En general, los cambios descritos están alineados con el carácter progresivo y perjudicial del proceso de envejecimiento, y demuestran que las concentraciones de la mayoría de los lípidos en el cerebro humano disminuyen después de los 50 años. Sin embargo, los niveles cerebrales de diferentes glicerofosfolípidos (Gpl) como fosfatidil inositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilcolina (PC) disminuye muy lentamente con la edad, con menos del 10% de pérdida en el período entre los 40 y los 100 años de edad [Farooqui, L. 1988]. En otro estudio, se observó una pérdida del 10 al 20 % de Gpl en diferentes regiones del cerebro (sustancia gris, sustancia blanca, núcleo caudado, hipocampo, protuberancia, cerebelo y bulbo raquídeo) solo en personas de 90 años en comparación con personas de 35 años de edad, mientras que la composición de fosfolípidos en varias regiones del cerebro se mantuvo sin cambios durante el envejecimiento [Söderberg ,et al., 1990].

Por otro lado, el contenido sostenido de ácidos grasos saturados, monosaturados y DHA con la edad podría interpretarse como una respuesta adaptativa al envejecimiento para preservar las neuronas y la función cerebral al ayudar a mantener las propiedades geométricas de los lípidos y, en consecuencia, las propiedades funcionales como la exocitosis y la formación de dominios de membrana [Piomelli, G., Astarita, R., 2007]. Queda por explorar el significado de los cambios (aunque menores) en la longitud promedio de la cadena y el índice de doble enlace en edades avanzadas, que también pueden influir en las propiedades geométricas de los lípidos y sus propiedades funcionales. En contraste con estas observaciones, las disminuciones en PUFA n-6, y particularmente el contenido de ácidos grasos 20: 4n-6 y 22: 4n-6, podrían tener efectos biológicos en el sentido de que son sustratos para los mediadores de lípidos. Por lo tanto, una explicación para este hallazgo radica en la disminución reportada en la ruta de biosíntesis de PUFA [Cobré, A., et al., 2018]; pero también aumenta el consumo de enzimas involucradas en vías antiinflamatorias que sintetizan una diversidad de compuestos con

propiedades neuroprotectoras para asegurar la supervivencia y el funcionamiento celular durante el envejecimiento normal [Cobré, A., et al., 2018]. Por esta razón se propone que, durante el envejecimiento normal del cerebro humano, el perfil lipídico es particularmente resistente a los cambios con la edad porque están bajo un estricto control para asegurar la supervivencia y función neuronal.

Sin embargo, aunque la composición lipídica de la membrana se mantiene en gran medida para garantizar la supervivencia y función celular, existe un ataque lipoperoxidativo fisiológico continuo a la membrana. La peroxidación es un proceso radicalario autocatalítico resultante de la oxidación de PUFAs como el ácido araquidónico, ácido linoleico y ácido docosahexaenoico, los cuales aumentan con la edad particularmente en el hipocampo [Pryor and Stanley, 1975], generando malondialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetaldehído (4-HDA) como moléculas mayoritarias, pero además esta se convierte en una fuente de compuestos carbonílicos con capacidad de dañar otros componentes celulares. En consecuencia, se sugiere que el daño molecular derivado de la lipoxidación progresiva es un mecanismo central conservado de la disminución funcional relacionada con la edad en el cerebro humano y cada región cerebral tiene un patrón de lipoperoxidación de acuerdo con su composición. Las diferencias regionales en los marcadores de daño proteico derivados de los neurocetales ligadas a especies de carbonilación (NKT), MDA y 4-HDA en doce regiones cerebrales en dos grupos de individuos, de mediana y avanzada edad, fueron analizadas en trabajos de Braak y Ferrer. En donde los autores reportan que el grupo de mediana edad no presentó lesiones neuropatológicas y el grupo de edad avanzada presentó una patología de ovillos neurofibrilares (NFT) en el estadio I-II considerado compatible con el envejecimiento cerebral normal [Braak, et al., 2011]. Los niveles de proteínas modificadas con NKT mostraron variaciones regionales discretas en el cerebro humano de edad avanzada. Los aductos de proteína NKT aumentaron en la corteza frontal, la corteza visual y la sustancia negra, y se redujeron en el tálamo.

En contraste, los niveles de MDA y 4-HDA presentan un amplio espectro regional en el cerebro humano envejecido, afectando a un mayor número de regiones en la vejez. Cinco regiones del cerebro muestran una mayor aducción de MDA y 4-HDA en personas de edad avanzada, incluida la corteza frontal, la corteza parietal, el hipocampo, el tálamo y el putamen. Curiosamente, los niveles reducidos de aducción de MDA y 4-HDA con la edad ocurren en la corteza temporal y la corteza entorrinal cuando se comparan individuos de mediana edad con personas de edad avanzada. Además, el MDA y 4-HDA son considerados como segundos mensajeros tóxicos que se diseminan y aumentan el daño celular [Esterbauer, and Schaur, 1991].

Los resultados de este estudio mostraron que durante el envejecimiento los niveles de LPO incrementan progresivamente, observándose que la especie dominante es el MDA y la especie secundaria es el 4-HDA, acumulándose significativamente en los grupos control y vehículo, a partir del mes 8 de tratamiento. Mientras que, la administración de resveratrol en una dosis de 10 mg/kg redujo significativamente los niveles de LPO y de aductos producidos MDA y 4-HDA (Fig. 15). Estos datos son comparables con lo demostrado por Yuan en 2020, en donde la administración de resveratrol protegió de la formación excesiva productos de LPO, acompañada de un aumento del nivel de GSH [Yuan et al., 2020]. Se ha demostrado que, la administración oral de *trans*-resveratrol a una concentración de 25 mg/kg de peso corporal una vez al día durante un período de 21 días disminuyó los niveles de LPO en el hipocampo de ratones obesos, mostrando un efecto neuroprotector [Rege et al., 2013]. En ratas Wistar macho adultas en la que se indujo diabetes experimental mediante una única inyección de estreptozotocina, tres días después se inyectó resveratrol (10 mg/kg) por vía intraperitoneal diariamente durante 6 semanas; observándose que es un potente agente neuroprotector contra el daño oxidativo diabético, al reducir significativamente la producción de MDA y •NO en el hipocampo, la corteza, el cerebelo, el tronco encefálico y la médula espinal [Ates O, et al., 2007]. Asimismo, en un estudio que exploró los mecanismos subyacentes a la acción antidepresiva del resveratrol en ratas expuestas al estrés

crónico leve impredecible, mediante la medición de los parámetros de estrés oxidativo en el hipocampo y la CPF, se observó que, el tratamiento con resveratrol (80 mg/kg/i.p. 4 semanas) revirtió significativamente las anomalías conductuales, el tiempo de inmovilidad y disminución de la actividad locomotora, y el aumento de la LPO [Liu S. et al., 2016].

Así mismo, la sobreproducción de 4-HDA puede afectar la función de los lisosomas y proteosomas en las neuronas corticales cerebrales, lo que resulta en la acumulación de daño y la posterior muerte neuronal [Zhang et al., 2017] ya que este aducto puede interactuar con residuos de lisina, histidina y cisteína, alterando la función de numerosas proteínas de membrana críticas para el metabolismo y la supervivencia celular, incluidos los transportadores de glucosa, los receptores de factores neurotróficos y las ATPasas con motivo de iones [Mattson et al., 2009]. Aunado a esto, mediciones de la actividad del proteasoma en diferentes regiones del cerebro de ratas envejecidas revelaron una disminución significativa en algunas regiones del cerebro (hipocampo y corteza cerebral), pero no en otras como el tronco encefálico, lo que sugiere una vulnerabilidad diferencial de las poblaciones neuronales a la disfunción del proteasoma durante el envejecimiento [Keller et al., 2000]. Claramente este mecanismo y la disminución transduccional podría explicar porque en los resultados de este estudio se mostró que los animales no tratados presentan una disminución en la memoria y aprendizaje.

Adicionalmente, es bien sabido que la formación de lipoperoxidos se presenta ante un incremento del anión ONOO^- , el cual se produce por exceso de $\bullet\text{NO}$ y $\bullet\text{O}_2^-$. El $\bullet\text{NO}$ regula la estructura, el número y función de las espinas dendríticas en el cerebro y el hipocampo. Este es un gas con efectos pleiotrópicos dependientes de su concentración a nivel celular se ha sugerido que este gas a nivel presináptico tiene una relación con las transmisiones glutamatergicas especialmente con el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) por su papel en la regulación de la plasticidad presináptica en neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas [Picón-Pagès, et al., 2019]. Además, el $\bullet\text{NO}$ favorece las funciones sinápticas

mediante el mantenimiento LTP y la traducción de proteínas en las espinas dendríticas. También ha demostrado ser una molécula antiapoptótica y reguladora de la función neuronal por nitrosilación [Feng, et al., 2018]. Varios estudios sugieren que en el envejecimiento la iNOS puede ser afectada y podría ser una de las causas de los cambios en los niveles de óxido nítrico durante el envejecimiento cerebral [Tewari, et al., 2021].

Experimentos de Law et al, han demostrado que niveles elevados de ARNm de NOS en el hipocampo y en las neuronas corticales en ratas ancianas con deterioro y, en ratas cognitivamente intactas, conduce a una neurotoxicidad mediada por •NO [Law et al., 2002]. En adición, se ha reportado que la producción excesiva de •NO genera ataque a ácidos grasos de membrana, mediado por la sobreproducción de ONOO⁻ y, por ende, aductos de LPO con diversas consecuencias neurológicas, reflejadas por la pérdida de funciones motoras y cognitivas [Banach et al., 2011]. Lo cual coincide con los resultados presentados en este trabajo, en donde la concentración de nitritos se incrementó a partir de los 13 meses de edad en el grupo control y 10 meses de tratamiento en el grupo vehículo. Sin embargo, en el grupo tratado con resveratrol se previno la acumulación (Fig. 16), lo que coincide con la disminución de la LPO.

Los efectos benéficos del resveratrol descritos en la paradoja francesa se enfocan primordialmente sobre enfermedades cardiovasculares, en donde se regula al alza la producción de •NO y la actividad de eNOS [Catalgol B, et al., 2012]. No obstante, las intervenciones con resveratrol han reportado una regulación variable en función de su producción y concentración. El resveratrol presente en el vino tinto ha exhibido una actividad antioxidante suficiente para proteger el hipocampo y, en otros tejidos favorece la generación de •NO. En primera instancia, los resultados de nuestro biomodelo correspondientes al grupo resveratrol sugieren que este compuesto regula a la baja la concentración de •NO, desde los primeros meses de la administración, observándose este cambio de manera significativa a partir del mes 10 de tratamiento.

El resveratrol y los flavonoides como quercetina y catequina han mostrado efectos beneficiosos cuando su consumo es moderado. Los posibles mecanismos por los cuales estos compuestos fenólicos podrían ejercer sus efectos protectores incluyen sus capacidades de captación de oxígeno y propiedades antioxidantes, efectos inhibitorios sobre la cascada del ácido araquidónico, y la actividad de la sintasa de óxido nítrico [Kim HK. et al., 1999]. Por lo que, estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo moderado de polifenoles se correlaciona significativamente con una reducción de la incidencia de degeneración muscular relacionada con la edad, como de la enfermedad de Alzheimer [Obisesan, et al., 1998]. Adicionalmente, los estudios en animales *in vivo* han demostrado los efectos protectores del resveratrol en varios modelos de neurotoxicidad [Orgogozo, JM et al., 1997]. En conjunto, estos últimos hallazgos plantean la posibilidad de que el resveratrol y otros polifenoles puedan ser beneficiosos en la prevención de trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad. Es probable que la actividad antioxidante y secuestrador de ROS del resveratrol expliquen, al menos en parte, su capacidad protectora y de rescate hipocampal, como muestran nuestros resultados.

Por otro lado, diversos autores han descrito que, en el envejecimiento, las enzimas antioxidantes como CAT, SOD, GPx, GST y GR sufren deterioro en cuanto a expresión y actividad. En este contexto, se ha descrito el incremento progresivo de $\bullet\text{O}_2^-$ en diferentes áreas del cerebro de ratas incluyendo la corteza occipital, parietal, temporal y el hipocampo durante el envejecimiento, enfatizando que esta molécula es el precursor del H_2O_2 mitocondrial y su asociación con el progreso de procesos inflamatorios, lesión por reperfusión y envejecimiento [Duchesne, et al., 1977]. Tsay et al. encontraron en ratas que a partir del primer mes y hasta los 12 meses de vida incrementa paulatinamente la actividad de catalasa, encontrando su pico en dicho periodo, posterior a ello comienza a decrecer al menos hasta los 21 meses de vida [Tsay et al., 2000]. Por su parte, SOD ha mostrado el mismo comportamiento a lo largo de la vida de roedores. En adición, un análisis de

interacción Proteína-Proteína en la plataforma STRING se encontró que CAT tiene relación directa con proteínas involucradas en vías de los peroxisomas, la vía de FOXO y vías de regulación de la longevidad modulando enzimas como SOD y segundos mensajeros como AKT. Tal relación y la gran versatilidad funcional intracelular de estas enzimas puede explicar la variación en la actividad de ciertas enzimas a lo largo de las diferentes edades evaluadas en este trabajo.

Sin embargo, la suplementación y tratamiento con polifenoles son capaces de modular la vía de transcripción del factor 2 relacionado con el eritroide nuclear 2 (Nrf2). Se ha demostrado que Nrf2 tiene un papel preponderante en la regulación del estado redox celular, ya que es encargado de modular la expresión de los genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, incluidos SOD, GPx, GST y CAT [Abdelfattah et al., 2019]. La regulación al alza de los genes diana de Nrf2 confiere una mayor protección a las neuronas ante el daño oxidativo [Ighodaro et al., 2017]. El resveratrol es un activador directo del factor Nrf2, incrementando su translocación y la expresión de las enzimas antes mencionadas, en particular de SOD y CAT. La isoforma de esta enzima cuya traducción se ve más favorecida es la isoforma Mn-SOD [Abdelfattah et al., 2019]. Nuestros resultados mostraron que, la actividad de SOD en hipocampo se favorece tras 12 meses de administración de resveratrol, mientras que la actividad de CAT en hipocampo se incrementó tras 6 meses de tratamiento con el polifenol (Fig. 17).

El funcionamiento adecuado de la vía Nrf2 es indispensable para contrarrestar el estrés oxidativo y proteger múltiples órganos y células [Lu MC et al., 2016]. Los estudios de desactivación del gen Nrf2 en varios órganos, como pulmón, hígado, riñón y cerebro, han demostrado que la desregulación de Nrf2 afecta gravemente la sensibilidad al oxidante/ROS y predispone al sistema a varios cambios patológicos con lesiones celulares aberrantes [Narasimhan, et al., 2016]. Farkhondeh et al., muestra el mecanismo por los cuales resveratrol activa al Nrf2, al interactuar con los residuos de cisteína de proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap1) alterando la unión con Nrf2, este se acumula en citoplasma y

aumenta la translocación al núcleo donde activa NRF2/ARE a través de la estimulación de las vías p38 MAPK y SIRT/ FOXO [Farkhondeh, et al., en 2020; Al omaili Naif et al., 2018]. De esta manera, Nrf2 activa la transcripción de los genes antioxidantes y las principales enzimas desintoxicantes de fase II [Hirotzu Y. et al., 2012]. Existen varios grupos de genes dependientes de Nrf2 algunos de ellos codifican proteínas que contribuyen al equilibrio redox celular, principalmente a través de recursos de tiol endógeno, estos incluyen enzimas que sintetizan o regeneran glutatión, así como enzimas que producen NADPH, un cofactor esencial para recuperar tanto GSH como TRX de sus formas disulfuro.

Los genes regulados por Nrf2 desempeñan una función crítica en la homeostasis redox basada en tiol al mantener los niveles de glutatión, un importante sistema antioxidante con funciones aditivas en el cerebro y garantiza un estado reducido de tioles de cisteína [Paladino et al 2018]. El GSH secretado por los astrocitos sirve como base para la síntesis de GSH neuronal [Hertz, L., 2006]. Para mantener las concentraciones neurales de GSH, los astrocitos captan glutamato. En los astrocitos, el glutamato se convierte en glutamina mediante la enzima glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) [Hertz, L., 2006]. La glutamina es liberada por los astrocitos y absorbida por las neuronas para convertirse nuevamente en glutamato; este sistema se denomina ciclo glutamato-glutamina [Matés J., 2002]. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, y en particular del hipocampo, en donde juega un papel importante en la plasticidad neuronal y la neurotoxicidad [Danbolt, NC., 2001]. La modulación del glutamato extracelular determina sus acciones fisiológicas y excitotóxicas. El principal mecanismo responsable del mantenimiento de bajas concentraciones extracelulares de glutamato lo lleva a cabo una familia de proteínas transportadoras de glutamato, que utilizan los gradientes electroquímicos a través de las membranas plasmáticas como fuerzas impulsoras para la captación. Una gran variedad de trastornos neurológicos y psiquiátricos, que incluyen depresión, trastornos de ansiedad, esquizofrenia, dolor crónico, epilepsia y enfermedades de Alzheimer y Parkinson, demuestran alteraciones fisiopatológicas en el sistema glutamatérgico [De Almeida, et al., 2007].

Dado que las células astrogliales son responsables de la captación de glutamato extracelular, se ha estudiado el efecto del resveratrol sobre el metabolismo del glutamato en cultivos primarios, líneas celulares y cortes histológicos de hipocampo. Se ha demostrado en células astrogliales C6 que el resveratrol aumenta la captación de glutamato con dosis que oscilaron entre 0,1 y 250 μM [Dos Santos, et al., 2006]. Posteriormente, de acuerdo con estos resultados, se ha reportado que el resveratrol aumenta la captación de glutamato tanto en cultivos de astrocitos primarios como en cortes frescos de hipocampo. En todos los estudios reportados el aumento de la captación de glutamato fue de alrededor del 50% en comparación con la condición control, excepto por un efecto contrario obtenido con la mayor concentración de resveratrol (250 μM), que disminuyó la captación de glutamato en el cultivo celular primario, lo que indica un fenómeno hormético [Kouda, K. and Iki, M., 2012]. Dado que, el resveratrol aumenta la captación de glutamato por parte de los astrocitos, se han investigado los dos destinos principales del glutamato en las células gliales: **(1)** la conversión de glutamato en glutamina, midiendo la actividad de la enzima marcadora de astrocitos glutación sintetasa (GS); y **(2)** la regulación de los niveles de GSH [Westergaard, et al., 1995].

El tratamiento con resveratrol aumenta la actividad de la enzima GS tanto en células astrogliales C638, como en cultivos primarios de astrocitos, lo que indica un papel importante en el ciclo glutamato-glutamina [Dos Santos, et al., 2006]. Los niveles de glutamina están relacionados con las variaciones redox celulares y se han reducido bajo estrés catabólico [Matés, J., 2002]. Las ROS parecen ser un modulador pleiotrópico clave que puede estar involucrado en diferentes vías que conducen a modificaciones de macromoléculas como proteínas y lípidos. La actividad de la enzima GS se ve afectada por el estrés oxidativo, y el resveratrol puede prevenir este efecto. Como la glutamina es una fuente importante de glutamato, también ayuda a mantener los niveles de GSH tras lesiones en el SNC [McKenna, MC., 2007]. En modelos de administración de estreptozotocina

intracerebroventricular se presenta una disminución en los niveles de GSH, y el resveratrol pudo restaurar la cantidad de este antioxidante, mostrando un importante efecto *in vivo* en la demencia [Chow HH., et al., 2010]. El tratamiento con resveratrol aumentó el GSH intracelular en cultivos de células astrogiales y cortes de hipocampo [Quincozes-Santos, et al., 2009]. Sin embargo, bajo agresión oxidativa, el resveratrol también muestra un efecto dual que depende de la condición redox del medio, similar al efecto observado con la captación de glutamato. En una agresión oxidativa intensa (1 mM H₂O₂) y aguda (30 min), el resveratrol evitó la disminución de GSH inducida por H₂O₂, pero después de 6 h de agresión oxidativa, el resveratrol mostró un efecto prooxidante, potenciando la disminución de GSH [Quincozes-Santos, et al., 2009].

Nuestros resultados observaron un incremento en los niveles de glutatión total desde los 8 meses de tratamiento tras la administración de resveratrol, mientras que los niveles de la especie reducida incrementaron significativamente a los 14 meses de tratamiento y se redujeron los niveles de la especie oxidada desde los 10 meses de tratamiento (Fig. 17A, 17C), lo cual es sugerente de las acciones duales del tratamiento con resveratrol, ya que al actuar como antioxidante, evita la depleción de este sistema de defensa. Asimismo, el resveratrol puede mejorar la actividad de las enzimas de reciclaje debido a un reacondicionamiento citoplasmático, pero también por actividad del Nrf2 que mantiene la expresión proteica.

Se sabe que, las isoenzimas GST ejercen su actividad de neutralización de compuestos reactivos mediante la conjugación con el GSH. Destacándose la isoforma GST-Mu debido a su regulación a la baja en el tejido nervioso durante el envejecimiento. Diferentes modelos de inducción de estrés han estudiado la actividad total de GST, con especial énfasis en las variaciones de GST-Mu. Se ha evaluado en estudios preclínicos la respuesta de diversas enzimas de fase II, donde en humanos tratados con 1 g/día de resveratrol durante un periodo de 4 semanas, si bien el efecto global fue mínimo, los individuos que mostraron niveles mayores de

la actividad de GST-Mu en linfocitos antes de la intervención, con un incremento de esta proteína. El mecanismo sugerido de activación del resveratrol de esta expresión génica involucra la modulación de la vía MAPK [Sharma M., et al., 2002].

La administración de 20 mg/kg de resveratrol durante cuatro semanas determinó una regulación positiva de la actividad total de GST en el hipocampo de un modelo de rata diabética, mientras que los análisis de western blot en el mismo biomodelo muestran una mayor expresión génica en la diabetes sin tratamiento, observándose con el tratamiento de resveratrol una regulación positiva, la cual es similar al requerimiento fisiológico. No obstante, cabe destacar que la expresión génica sólo sugiere los niveles esperados de proteína, mas no siempre correlata su actividad. Los niveles de ARNm, la cantidad y actividad de la proteína dependen de diversos factores posteriores a la traducción [Sadi and Konat, et al., 2015]. Nuestro biomodelo tratado con resveratrol presentó una actividad de GST mayor que el grupo control y vehículo, con incrementos significativos desde los 6 y 8 meses de tratamiento, respectivamente (Fig. 17E). Esto concuerda también con los hallazgos en la literatura, donde la actividad de GST en nuestro grupo control se presume incrementada ante un estímulo de estrés, con disminuciones progresivas con el paso del tiempo. Los efectos de la administración de resveratrol durante un periodo de tiempo superior a los 16 meses no se han registrado, por lo que nuestro estudio arroja nuevos datos sobre la actividad enzimática del reciclaje del glutatión cuando el resveratrol es administrado de manera prolongada.

La actividad de GR durante el envejecimiento puede estar disminuida o no presentar cambios. No obstante, las alteraciones en el estado redox pueden inducir modificaciones en la actividad de la enzima. El bloqueo de la actividad de GR en modelos de estrés inducido por D,L-butionina-S,R-sulfoximina (BSO) en células astrogliales C6 se vio revertido ante la preincubación con resveratrol, con incrementos hasta del 16% por encima de los valores observados en el control. El mecanismo se propone por regulación de HO-1 vía Nrf2, ya que la inhibición de este bloqueó los efectos del resveratrol [Arús, et al., 2017]. Específicamente para el

hipocampo, los niveles de actividad de GR en un modelo rata con estrés por inmovilización se vieron reducidos de forma significativa, caso contrario a lo observado durante la administración de resveratrol a dosis de 10 y 20 mg/kg bajo las mismas condiciones de estrés. Cabe destacar que también se registró un mayor número de neuronas con el tratamiento de resveratrol tanto en la CPF como en HP [Kalpana, T. et al., 2019]. En nuestro biomodelo, el grupo administrado con resveratrol mostró incrementos estadísticamente significativos en la actividad de la enzima desde los 4 meses de tratamiento (Fig. 17F); Mientras que, la actividad de GPx disminuyó significativamente a partir del mes 6 de tratamiento con resveratrol, lo que sugiere una menor producción de H₂O₂ (Fig. 17D). En un modelo de ratones con senescencia acelerada que se les administró resveratrol (25, 50, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) durante 8 semanas, se observó una mayor actividad de SOD y GPx en el hipocampo. Los resultados mostraron que el resveratrol mejoró significativamente la capacidad de aprendizaje y memoria en la prueba del laberinto acuático de Morris y la coordinación neuromuscular y la capacidad sensoriomotora en la prueba de la cuerda floja, lo cual coincide con nuestros resultados [Liu, GS. et al., 2012]. Resultados similares se observaron en un modelo de obesidad, el cual es bien conocido que incrementa el estrés oxidativo en la región hipocámpal, aunque la administración de resveratrol correspondió a 25 mg kg⁻¹ por 3 semanas [Rege, et al., 2013]. Bellaver et al. demostraron que en rata Wistar adulta y envejecida la defensa antioxidante incrementa y, en particular la actividad de GPx disminuye tras administrar resveratrol [Bellaver, et al., 2014].

Como se ha mencionado, el envejecimiento se asocia con una disminución progresiva en la conducta, la memoria y el aprendizaje, principalmente porque se generan cambios a nivel del sistema nervioso central [Frick, 1994; Dickstein, 2013], estos cambios incluyen modificaciones en los circuitos neuronales como: disminución del número, diámetro, longitud, ramificación de las dendritas y densidad de las espinas dendríticas [Isaev et al., 2018]. disminución de la neurogénesis, [Flores et al., 2016], disminución en la neurotransmisión [Segovia et al., 2001; Catani, 2013; Mostany, 2013; Dickstein, 2013; Zhang, 2011], reducción del grosor

de la sustancia gris subcortical [Escobar, 2001] y finalmente una disminución en el peso y volumen cerebral [Flores et al., 2020]. Como ya hemos descrito anteriormente la plasticidad cerebral cambia con el tiempo porque es altamente vulnerable a modificaciones estructurales, químicas y funcionales dependientes del tiempo [Islam et al., 2017; Danka Mohammed et al., 2017; Baghel et al., 2017]. Estas estructuras están interconectadas por proyecciones glutamatérgicas y se alteran en los trastornos neurodegenerativos.

Informes recientes sugieren que los cambios morfológicos en el hipocampo envejecido están relacionados con procesos inflamatorios y un incremento en la iNOS [Cianciulli, et al., 2021]. Tratamientos con moléculas antioxidantes como la cúrcuma promueven el desarrollo del fenotipo microglial M2 de manera dependiente de HO-1 para reducir la inducción de iNOS y, así proteger las células microgliales contra el estrés oxidativo generado en el envejecimiento [Parada et al., 2015]. Otro estudio demostró que el resveratrol suprimió la expresión de ARNm de COX-2 e iNOS en células microgliales BV2 estimuladas por ácido lipoteicoico (LTA). Además, los mismos autores demostraron que la curcumina reduce el estrés oxidativo y la neuroinflamación en la microglía BV2 estimulada por LTA a través de la activación de los mecanismos citoprotectores HO-1/Nrf2/ARE [Yu, et al., 2018].

La pérdida gradual de la conectividad local debido al envejecimiento provoca déficits cognitivos [Flores et al., 2016]. Las regiones del GD dada su capacidad de neurogénesis en varias especies [Toda et al., 2018], CA3 por recibir información del subículo a través de la vía perforante, así como una conexión directa del GD a través de fibras musgosas de las células granulares [Hainmuller and Bartos, 2020], y la región CA1 por sus proyecciones generalizadas como nodo de salida clave del bucle trisináptico del circuito de memoria del hipocampo [Cenquizca et al., 2007] son determinantes para la función hipocámpal, y por ello se estudiaron en el presente trabajo. La importancia de este circuito es que, si una de estas regiones se ve alterada por el daño celular se interrumpe la plasticidad en la sinapsis, lo que conlleva a una disminución de liberación de neurotransmisores afectando la

generación de receptores NMDA cruciales para la memoria de contexto [Cravens et al 2006].

Las neuronas están continuamente sujetas a estrés metabólico, iónico y oxidativo que surge de su actividad electroquímica normal y de factores extrínsecos que les imponen desafíos bioenergéticos sistémicos, estrés físico y psicológico. Numerosas vías de señalización han evolucionado para responder al estrés celular de forma adaptativa a fin de aliviar la amenaza inmediata, alertar a otras células sobre la situación estresante y reforzar las defensas contra futuros factores estresantes. Los niveles de calcio son una señal importante que median la adaptación celular al estrés celular. La organización general de los circuitos neuronales en todo el cerebro se basa en neuronas glutamatérgicas excitatorias con árboles dendríticos elaborados y axones largos que forman sinapsis con otras neuronas glutamatérgicas y con interneuronas GABAérgicas inhibitorias. La integridad estructural y la integración adecuada de las actividades sinápticas de estos diferentes sistemas de neurotransmisores son necesarias para el funcionamiento normal del cerebro. Durante el envejecimiento de este órgano, la fidelidad de la actividad de la red neuronal dentro y entre las regiones del cerebro se ve perturbada, en algunos individuos de forma relativamente sutil y en otros patológicamente. Los desequilibrios excitatorios ocurren en el cerebro que envejece como resultado de la alteración de la señalización GABAérgica [Porges, et al., 2015]

En este sentido el envejecimiento es un factor importante en la degradación y muerte celular, el resveratrol mostró una neuroprotección al disminuir significativamente el número de neuronas picnóticas en GD, CA3 y CA1, así como una menor fluorescencia roja indicativo de unión del colorante NA en euromatina o degradación de DNA característico de la muerte celular (Fig. 19-22). El ADN en las mitocondrias y el núcleo es dañado regularmente por ROS durante el curso normal de la función celular y el envejecimiento, y en las neuronas, dicho daño en el ADN aumenta después de la actividad sináptica excitatoria [Chow, et al., 2015]. En células sanas y jóvenes, las bases de ADN dañadas se eliminan rápidamente y se reemplazan con bases no dañadas mediante las actividades coordinadas de las

proteínas en las vías de reparación del ADN que incluyen la recombinación homóloga, la reparación de desajustes, la reparación por escisión de nucleótidos y la reparación por escisión de bases, los análisis de muestras de tejido cerebral de humanos y roedores han documentado aumentos en la cantidad de ADN nuclear y mitocondrial dañado, y reducciones en la expresión y/o actividades enzimáticas de algunas proteínas de reparación del ADN, durante el envejecimiento [Lu, T et al.,]. Este mecanismo explica porque no se mostraron diferencias en la muerte neuronal en ratas jóvenes con la tinción de NA, mientras que a edades más avanzadas los animales sufren muerte celular. Además, el tratamiento con resveratrol es capaz de mejorar la capacidad cognitiva en animales tras mantener la integridad celular por un incremento en la expresión de SOD y Bcl-2, y una disminución significativa del contenido de MDA, Bax y caspasa 3 activa en hipocampo [Zhang, et al., 2019], lo que podría explicar la supervivencia celular mostrados en este estudio.

Estudios recientes han demostrado que el estrés oxidativo afecta directamente las modificaciones epigenéticas de la cromatina que controlan cómo se expresan los genes. Estos cambios pueden impulsar respuestas fisiológicas al estrés oxidativo y facilitar la progresión de enfermedades, incluida la neurodegeneración [Kreuz & Fischle, 2016]. El estrés oxidativo puede reducir directamente la metilación del ADN al oxidarlo, aumentar la hidroximetilación e interferir con la unión de las metiltransferasas de ADN que producen el donante de metilo S-adenosilmetionina [Chia et al., 2011; Thanan et al., 2014]. Las ROS también pueden formar lesiones de ADN oxidadas al hidroxilar pirimidinas y 5-metilcitosina, que pueden interferir con las señales epigenéticas de 5-hidroximetilcitosina [Guillaumet, et al., 2017]. Además, las ROS altera las modificaciones de histonas postraduccionales, que pueden cambiar la estructura de la cromatina, la expresión génica, la estabilidad génica y la replicación. Estos efectos a menudo son indirectos, ya que las ROS afectan la eficiencia metabólica, reduciendo los niveles de metabolitos como acetil-CoA, Fe, NAD⁺ y cetoglutarato que son esenciales para las enzimas modificadoras de histonas [Guillaumet, et al., 2017].

En nuestro trabajo se hizo uso de la tinción con naranja de acridina, el cual es un colorante catiónico selectivo de ácidos nucleicos, interacciona intercalándose dentro de la de la molécula de ADN o por atracción electrostática en el ARN, cuando está asociado al ADN, el naranja de acridina presenta un máximo de excitación a 502 nm y una emisión a 525 nm (en el verde). Cuando está asociado al ARN, la excitación máxima deriva a 460 nm (en el azul) y la emisión máxima a 650 nm (en el rojo). Por lo tanto, este colorante tiñe de verde a las células con ADN intacto, y de naranja a las que están en proceso de degradación de ADN [Lopes, et al., 2001]. Los resultados de este estudio mostraron que durante el envejecimiento disminuye progresivamente la viabilidad celular de manera significativa a partir de los 10 meses de tratamiento, el naranja de acridina evidencio que la transición a la muerte celular ocurre en los grupos control y vehículo, manteniendo a las células neuronales de los grupos con resveratrol, por lo tanto se sugiere que el resveratrol ayuda a regular los mecanismos de daño oxidativo asociados a la edad en las células hipocampales.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados demostraron que la suplementación crónica en una dosis de 10 mg/kg resveratrol genera un efecto protector de las células hipocampales en ratas macho de la cepa Wistar, ya que:

- Previene el daño fisiológico característico del envejecimiento; por lo que podría mejorar la esperanza de vida, el desempeño cognitivo en la memoria de corto y largo plazo.
- Evita el estrés oxidante hipocampal; al disminuir moléculas oxidantes y mejorar la actividad enzimática antioxidante
- Disminuye el daño celular y muerte celular en las subregiones CA1, CA3 y GD del hipocampo.

Este trabajo nos permite incrementar el conocimiento del papel del resveratrol como una molécula neuroprotectora, la cual previene el proceso de neurodegeneración.

10. REFERENCIAS

HAY DIFERENTES FORMATOS, SUGIERO UNIFICAR.

Apellido, Inicial (año). Título del artículo. Título de la revista (vol), Num, pp.xx-xx.. Casa publicadora

- 1) Farooqui, A. A., Liss, L., & Horrocks, L. A. (1988). Neurochemical aspects of Alzheimer's disease: involvement of membrane phospholipids. *Metabolic brain disease*, 3(1), 19-35.
- 2) Agarwal, B., & Baur, J. A. (2011). Resveratrol and life extension. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 138-143.
- 3) Amador-Alvarado, L., Montiel, T., & Massieu, L. (2014). Differential production of reactive oxygen species in distinct brain regions of hypoglycemic mice. *Metabolic brain disease*, 29(3), 711-719.
- 4) Arús, B. A., Souza, D. G., Bellaver, B., Souza, D. O., Gonçalves, C.-A., Quincozes-Santos, A., & Bobermin, L. D. (2017). Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 428(1-2), 67–77.
- 5) Ates, O., Cayli, S. R., Yucel, N., Altinoz, E., Kocak, A., Durak, M. A., ... & Yologlu, S. (2007). Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Clinical Neuroscience*, 14(3), 256-260.
- 6) Baez, S., Segura-Aguilar, J., Widersten, M., Johansson, A. S., & Mannervik, B. (1997). Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochemical Journal*, 324(1), 25-28.
- 7) Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., ... & Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337-342.
- 8) Bellaver, B., Souza, D. G., Souza, D. O., & Quincozes-Santos, A. (2014). Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. *Toxicology in Vitro*, 28(4), 479–484.
- 9) Benzi, G., Pastoris, O., & Dossena, M. (1982). Relationships between γ -aminobutyrate and succinate cycles during and after cerebral ischemia. *Journal of neuroscience research*, 7(2), 193-201.
- 10) Bigler, E. D. (2012). Symptom validity testing, effort, and neuropsychological assessment. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 18(4), 632-640.
- 11) Bonda, D. J., Wang, X., Lee, H. G., Smith, M. A., Perry, G., & Zhu, X. (2014). Neuronal failure in Alzheimer's disease: a view through the oxidative stress looking-glass. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 243-252.
- 12) Boocock, D. J., Faust, G. E., Patel, K. R., Schinas, A. M., Brown, V. A., Ducharme, M. P., ... & Brenner, D. E. (2007). Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 16(6), 1246-1252.
- 13) Boss, G. R., & Seegmiller, J. E. (1981). Age-related physiological changes and their clinical significance. *Western Journal of Medicine*, 135(6), 434.

- 14) Brown, V. A., Patel, K. R., Viskaduraki, M., Crowell, J. A., Perloff, M., Booth, T. D., ... & Brenner, D. E. (2010). Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer research*, 70(22), 9003-9011.
- 15) Butterfield, D. A., & Halliwell, B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(3), 148-160.
- 16) Cabré, R., Naudí, A., Dominguez-Gonzalez, M., Ayala, V., Jové, M., Mota-Martorell, N., & Pamplona, R. (2017). Sixty years old is the breakpoint of human frontal cortex aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 103, 14-22.
- 17) Candelario-Jalil, E., Mhadu, N. H., Al-Dalain, S. M., Martínez, G., & León, O. S. (2001). Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neuroscience research*, 41(3), 233-241.
- 18) Cantó, C., Jiang, L. Q., Deshmukh, A. S., Matak, C., Coste, A., Lagouge, M., ... & Auwerx, J. (2010). Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell metabolism*, 11(3), 213-219.
- 19) Carder, P. J., Al-Nafussi, A., Rahilly, M., Lauder, J., & Harrison, D. J. (1990). Glutathione S-transferase detoxication enzymes in cervical neoplasia. *The Journal of Pathology*, 162(4), 303-308.
- 20) Carder, P. J., Al-Nafussi, A., Rahilly, M., Lauder, J., & Harrison, D. J. (1990). Glutathione S-transferase detoxication enzymes in cervical neoplasia. *The Journal of Pathology*, 162(4), 303-308.
- 21) Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y., & Ozer, N. K. (2012). Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in pharmacology*, 3, 141.
- 22) Chance, B., & Hollunger, G. (1961). The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria: I. General properties and nature of the products of succinate-linked reduction of pyridine nucleotide. *Journal of Biological Chemistry*, 236(5), 1534-1543.
- 23) Chance, B., & Hollunger, G. (1961). The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria: IV. The pathway of electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 236(5), 1562-1568.
- 24) Chia, N., Wang, L., Lu, X., Senut, M. C., Brenner, C. A., & Ruden, D. M. (2011). Hypothesis: environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress. *Epigenetics*, 6(7), 853-856.
- 25) Chow, H.-H. S., Garland, L. L., Hsu, C.-H., Vining, D. R., Chew, W. M., Miller, J. A., ... Alberts, D. S. (2010). Resveratrol Modulates Drug- and Carcinogen-Metabolizing Enzymes in a Healthy Volunteer Study. *Cancer Prevention Research*, 3(9), 1168-1175.
- 26) Cianciulli, A., Calvello, R., Ruggiero, M., & Panaro, M. A. (2022). Inflammaging and Brain: Curcumin and Its Beneficial Potential as Regulator of Microglia Activation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(2), 341-348.
- 27) Cui, J., Shao, L., Young, L. T., & Wang, J. F. (2007). Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. *Neuroscience*, 144(4), 1447-1453.
- 28) Piomelli, D., Astarita, G., & Rapaka, R. (2007). A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10), 743-754.
- 29) Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65(1), 1-105.

- 30) Dasgupta, B., & Milbrandt, J. (2007). Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7217-7222.
- 31) De Almeida, L. M. V., Pineiro, C. C., Leite, M. C., Brolese, G., Leal, R. B., Gottfried, C., & Gonçalves, C. A. (2008). Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochemical research*, 33(1), 8-15.
- 32) De Jong, A. P., Kotlyar, A. B., & Albracht, S. P. J. (1994). Energy-induced structural changes in NADH: Q oxidoreductase of the mitochondrial respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1186(3), 163-171.
- 33) Dean, W. (2009). Neuroendocrine Theory of Aging Chapter 6. Restoring Receptor Sensitivity Part III. Vitamin Research News. Available online at www.vrp.com.
- 34) Delpino, F. M., Figueiredo, L. M., Caputo, E. L., Mintem, G. C., & Gigante, D. P. (2021). What is the effect of resveratrol on obesity? A systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition ESPEN*, 41, 59-67.
- 35) Dong, L. F., Jameson, V. J., Tilly, D., Cerny, J., Mahdavian, E., Marín-Hernández, A., & Neuzil, J. (2011). Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3717-3728.
- 36) Dos Santos, A. Q., Nardin, P., Funchal, C., Vieira de Almeida, L. M., Jacques-Silva, M. C., Wofchuk, S. T., ... Gottfried, C. (2006). Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453(2), 161–167.
- 37) Dourado, D. F., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2008). Mammalian cytosolic glutathione transferases. *Current protein & peptide science*, 9(4), 325-337.
- 38) Duchesne, J. (1977). A unifying biochemical theory of cancer, senescence and maximal life span. *Journal of Theoretical Biology*, 66(1), 137-145.
- 39) Eleff, S., Kennaway, N. G., Buist, N. R., Darley-Usmar, V. M., Capaldi, R. A., Bank, W. J., & Chance, B. (1984). ³¹P NMR study of improvement in oxidative phosphorylation by vitamins K3 and C in a patient with a defect in electron transport at complex III in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(11), 3529-3533.
- 40) Everitt, A. V. (1980). The neuroendocrine system and aging. *Gerontology*, 26(2), 108-119.
- 41) Fajemiroye, J. O., Cunha, L. C. D., Saavedra-Rodríguez, R., Rodrigues, K. L., Naves, L. M., Mourão, A. A., & Pedrino, G. R. (2018). Aging-induced biological changes and cardiovascular diseases. *BioMed Research International*, 2018 (1), 1-8.
- 42) Fan J, de Lannoy IA (2018). Pharmacokinetics. *Biochem Pharmacol*, 87(1), 93-120.
- 43) Feng, J., Chen, X., Guan, B., Li, C., Qiu, J., & Shen, J. (2018). Inhibition of peroxynitrite-induced mitophagy activation attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury. *Molecular Neurobiology*, 55(8), 6369-6386.
- 44) Feng, T., Lacrampe, A., & Hu, F. (2021). Physiological and pathological functions of TMEM106B: a gene associated with brain aging and multiple brain disorders. *Acta Neuropathologica*, 141(3), 327-339.
- 45) Forster, M. J., Dubey, A., Dawson, K. M., Stutts, W. A., Lal, H., & Sohal, R. S. (1996). Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are

- associated with oxidative protein damage in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), 4765-4769.
- 46) Frye, R.A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273(1), 793–798.
 - 47) Gavrikova, E. V., & Vinogradov, A. D. (1999). Active/de-active state transition of the mitochondrial complex I as revealed by specific sulfhydryl group labeling. *FEBS letters*, 455(1-2), 36-40.
 - 48) Genova, M. L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Castelli, G. P., & Lenaz, G. (2001). The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS letters*, 505(3), 364-368.
 - 49) Gladyshev, V. N. (2014). The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory!. *Antioxidants & redox signaling*, 20(4), 727-731.
 - 50) Greer, E.L. & A. Brunet. (2009). Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell.* 8, 113–127.
 - 51) Grimm, A., & Eckert, A. (2017). Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *Journal of Neurochemistry*, 143(4), 418-431.
 - 52) Grimm, A., & Eckert, A. (2017). Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *Journal of Neurochemistry*, 143(4), 418-431.
 - 53) Grimm, S. (2013). Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(5), 565-572.
 - 54) Grivennikova, V. G., & Vinogradov, A. D. (2006). Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(5-6), 553-561.
 - 55) Grivennikova, V. G., Kareyeva, A. V., & Vinogradov, A. D. (2010). What are the sources of hydrogen peroxide production by heart mitochondria?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(6-7), 939-944.
 - 56) Gu, X., Sun, J., Li, S., Wu, X., & Li, L. (2013). Oxidative stress induces DNA demethylation and histone acetylation in SH-SY5Y cells: potential epigenetic mechanisms in gene transcription in A β production. *Neurobiology of aging*, 34(4), 1069-1079.
 - 57) Guillaumet-Adkins, A., Yañez, Y., Peris-Diaz, M. D., Calabria, I., Palanca-Ballester, C., & Sandoval, J. (2017). Epigenetics and oxidative stress in aging. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017 (1), 1-6.
 - 58) Braak, H., Thal, D. R., Ghebremedhin, E., & Del Tredici, K. (2011). Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 70(11), 960-969.
 - 59) Haigis, M. C., Mostoslavsky, R., Haigis, K. M., Fahie, K., Christodoulou, D. C., Murphy, A. J., ... & Guarente, L. (2006). SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic β cells. *Cell*, 126(5), 941-954.
 - 60) Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 257-266.
 - 61) Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., & Bolaños, J. P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is

- controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C–Cdh1. *Nature Cell Biology*, 11(6), 747-752.
- 62) Hertz, L. (2006). Glutamate, a neurotransmitter—and so much more. *Neurochemistry International*, 48(6-7), 416–425.
 - 63) Hinkle, P. C., Butow, R. A., Racker, E., & Chance, B. (1967). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *The Journal of biological chemistry*, 242(22), 5169–5173.
 - 64) Homan, T. D., Bordes, S., & Cichowski, E. (2018). Physiology, pulse pressure. 2018 (6), 257-266.
 - 65) Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., & Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191-196.
 - 66) Huang, L. S., Cobessi, D., Tung, E. Y., & Berry, E. A. (2005). Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc1 complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *Journal of molecular biology*, 351(3), 573-597.
 - 67) Huang, M. L. H., Chiang, S., Kalinowski, D. S., Bae, D. H., Sahni, S., & Richardson, D. R. (2019). The role of the antioxidant response in mitochondrial dysfunction in degenerative diseases: cross-talk between antioxidant defense, autophagy, and apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-26
 - 68) Iskusnykh, I. Y., Zakharova, A. A., & Pathak, D. (2022). Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules*, 27(1), 324.
 - 69) Jensen, P. K. (1966). Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 122(2), 157-166.
 - 70) Kanasaki, K., Kitada, M., & Koya, D. (2012). Pathophysiology of the aging kidney and therapeutic interventions. *Hypertension Research*, 35(12), 1121-1128.
 - 71) Keller, J. N., Hanni, K. B., & Markesbery, W. R. (2000). Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development*, 113(1), 61-70.
 - 72) Kenyon, C. (2011). The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1561), 9-16.
 - 73) Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), 504-512.
 - 74) 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.
 - 75) Kirkwood, T. B., & Kowald, A. (2012). The free-radical theory of ageing—older, wiser and still alive: modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support. *Bioessays*, 34(8), 692-700.

- 76) Kotlyar, A. B., Sled, V. D., Burbaev, D. S., Moroz, I. A., & Vinogradov, A. D. (1990). Coupling site I and the rotenone-sensitive ubisemiquinone in tightly coupled submitochondrial particles. *FEBS letters*, 264(1), 17-20.
- 77) Kouda, K., & Iki, M. (2010). Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health. *Journal of physiological anthropology*, 29(4), 127-132.
- 78) Kreuz, S., & Fischle, W. (2016). Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. *Epigenomics*, 8(6), 843-862.
- 79) Krishnamoorthy, G., & Hinkle, P. C. (1988). Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, 263(33), 17566-17575
- 80) Kumar, A., Gibbs, J. R., Beilina, A., Dillman, A., Kumaran, R., Trabzuni, D., Ryten, M., Walker, R., Smith, C., Traynor, B. J., Hardy, J., Singleton, A. B., & Cookson, M. R. (2013). Age-associated changes in gene expression in human brain and isolated neurons. *Neurobiology of Aging*, 34(4), 1199-1209.
- 81) Kussmaul, L., & Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(20), 7607-7612.
- 82) Lamming, D. W., Latorre-Esteves, M., Medvedik, O., Wong, S. N., Tsang, F. A., Wang, C., & Sinclair, D. A. (2005). HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction. *Science*, 309(5742), 1861-1864.
- 83) Larsson, L., Degens, H., Li, M., Salviati, L., Lee, Y. I., Thompson, W., & Sandri, M. (2019). Sarcopenia: aging-related loss of muscle mass and function. *Physiological reviews*, 99(1), 427-511.
- 84) Law, A., O'donnell, J., Gauthier, S., & Quirion, R. (2002). Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats. *Neuroscience*, 112(2), 267-275.
- 85) Lemarie, A., Huc, L., Pazarentzos, E., Mahul-Mellier, A. L., & Grimm, S. (2011). Specific disintegration of complex II succinate: ubiquinone oxidoreductase links pH changes to oxidative stress for apoptosis induction. *Cell Death & Differentiation*, 18(2), 338-349.
- 86) Lewandowska, J., & Bartoszek, A. (2011). DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy—multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators. *Mutagenesis*, 26(4), 475-487.
- 87) Liu, G. S., Zhang, Z. S., Yang, B., & He, W. (2012). Resveratrol attenuates oxidative damage and ameliorates cognitive impairment in the brain of senescence-accelerated mice. *Life sciences*, 91(17-18), 872-877.
- 88) Li, T., Liu, H., Wang, X., Xie, Y., Bai, X., Wu, L., ... & Liu, D. (2016). Resveratrol exerts antidepressant properties in the chronic unpredictable mild stress model through the regulation of oxidative stress and mTOR pathway in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *Behavioural brain research*, 302, 191-199.
- 89) Lopes, E. C., García, M. G., Vellón, L., Alvarez, E., & Hajos, S. E. (2001). Correlation between decreased apoptosis and multidrug resistance (MDR) in murine leukemic T cell lines. *Leukemia & Lymphoma*, 42(4), 775-787.
- 90) Lu, M. C., Ji, J. A., Jiang, Z. Y., & You, Q. D. (2016). The Keap1–Nrf2–ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update. *Medicinal research reviews*, 36(5), 924-963.

- 91) Lu, T., Pan, Y., Kao, S. Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., & Yankner, B. A. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429(6994), 883-891.
- 92) M. Burger, K. Seidel, [Chemical biomorphosis of the human brain and sciatic nerve; a survey], *Z. Alternsforsch.* 12 (1958) 52–79.
- 93) Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., & Dallner, G. (1990). Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *Journal of neurochemistry*, 54(2), 415-423.
- 94) Maklashina, E., Sher, Y., Zhou, H. Z., Gray, M. O., Karlner, J. S., & Cecchini, G. (2002). Effect of anoxia/reperfusion on the reversible active/de-active transition of NADH–ubiquinone oxidoreductase (complex I) in rat heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1556(1), 6-12.
- 95) Matés, J. (2002). Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(5), 439–458.
- 96) Mattson, M. P. (2009). Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Experimental Gerontology*, 44(10), 625-633.
- 97) McKenna, M. C. (2007). The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: Fates of glutamate in brain. *Journal of Neuroscience Research*, 85(15), 3347–3358.
- 98) Mecocci, P., Boccardi, V., Cecchetti, R., Bastiani, P., Scamosci, M., Ruggiero, C., & Baroni, M. (2018). A long journey into aging, brain aging, and Alzheimer's disease following the oxidative stress tracks. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(3), 1319-1335.
- 99) Miksits, M., Maier-Salamon, A., Aust, S., Thalhammer, T., Reznicek, G., Kunert, O., ... & Jaeger, W. (2005). Sulfation of resveratrol in human liver: evidence of a major role for the sulfotransferases SULT1A1 and SULT1E1. *Xenobiotica*, 35(12), 1101-1119.
- 100) Miller, R. A., Harrison, D. E., Astle, C. M., Baur, J. A., Boyd, A. R., De Cabo, R., ... & Strong, R. (2011). Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *The Journals of Gerontology: Series A*, 66(2), 191-201.
- 101) Murman, D. (2015). The Impact of Age on Cognition. *Seminars in Hearing*, 36(03), 111–121.
- 102) Murphy, M. P. (2012). Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxidants & redox signaling*, 16(6), 476-495.
- 103) Narasimhan M, Rajasekaran NS. Exercise, Nrf2 and Antioxidant Signaling in Cardiac Aging. *Front Physiol.* 2016;7:241
- 104) Naudí, A., Cabré, R., Dominguez-Gonzalez, M., Ayala, V., Jové, M., Mota-Martorell, N., & Pamplona, R. (2017). Region-specific vulnerability to lipid peroxidation and evidence of neuronal mechanisms for polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the healthy adult human central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(5), 485-495.
- 105) Navarro, A., López-Cepero, J. M., Bández, M. J., Sánchez-Pino, M. J., Gómez, C., Cadenas, E., & Boveris, A. (2008). Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(2), R501-R509.

- 106) Nosoh, Y., Kajioka, J., & Itoh, M. (1968). Effect of menadione on the electron transport pathway of yeast mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 127, 1-6.
- 107) Obisesan, T. O., Hirsch, R., Kosoko, O., Carlson, L., & Parrott, M. (1998). Moderate wine consumption is associated with decreased odds of developing age-related macular degeneration in NHANES-1. *Journal of the American Geriatrics Society*, 46(1), 1-7.
- 108) Orgogozo, J. M., Dartigues, J. F., Lafont, S., Letenneur, L., Commenges, D., Salamon, R., ... & Breteler, M. B. (1997). Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Revue neurologique*, 153(3), 185-192.
- 109) Parada, E., Buendia, I., Navarro, E., Avendaño, C., Egea, J., & López, M. G. (2015). Microglial HO-1 induction by curcumin provides antioxidant, antineuroinflammatory, and glioprotective effects. *Molecular nutrition & food research*, 59(9), 1690-1700.
- 110) Pearson, K. J., Baur, J. A., Lewis, K. N., Peshkin, L., Price, N. L., Labinsky, N., ... & de Cabo, R. (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell metabolism*, 8(2), 157-168.
- 111) Peltz, L., Gomez, J., Marquez, M., Alencastro, F., Atashpanjeh, N., Quang, T., ... & Zhao, Y. (2012). Resveratrol exerts dosage and duration dependent effect on human mesenchymal stem cell development. *PLoS One*, 7(5), e37162.
- 112) Picón-Pagès, P., Garcia-Buendía, J., & Muñoz, F. J. (2019). Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1865(8), 1949-1967.
- 113) Pinton, P., & Rizzuto, R. (2008). p66Shc, oxidative stress and aging: importing a lifespan determinant into mitochondria. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(3), 304–308.
- 114) Planas, J. M., Alfaras, I., Colom, H., & Juan, M. E. (2012). The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527(2), 67-73.
- 115) Pryde, K. R., & Hirst, J. (2011). Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 18056-18065.
- 116) Quincozes-Santos, A., Nardin, P., de Souza, D. F., Gelain, D. P., Moreira, J. C., Latini, A., ... Gottfried, C. (2009). The Janus Face of Resveratrol in Astroglial Cells. *Neurotoxicity Research*, 16(1), 30–41.
- 117) Cabré, R., Naudí, A., Dominguez-Gonzalez, M., Jové, M., Ayala, V., Mota-Martorell, N., ... & Pamplona, R. (2018). Lipid profile in human frontal cortex is sustained throughout healthy adult life span to decay at advanced ages. *The Journals of Gerontology: Series A*, 73(6), 703-710.
- 118) Hagen, R. M., Rodriguez-Cuenca, S., & Vidal-Puig, A. (2010). An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP1. *FEBS letters*, 584(12), 2689-2698.
- 119) Rebrin, I., Kamzalov, S., & Sohal, R. S. (2003). Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(6), 626-635.
- 120) Rege, S. D., Kumar, S., Wilson, D. N., Tamura, L., Geetha, T., Mathews, S. T., & Babu, J. R. (2013). Resveratrol protects the brain of obese mice from oxidative damage. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- 121) Richman, P. G., & Meister, A. (1975). Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 250(4), 1422-1426.

- 122) Rieske, J. S., Baum, H., Stoner, C. T., & Lipton, S. H. (1967). On the antimycin-sensitive cleavage of complex III of the mitochondrial respiratory chain. *Journal of Biological Chemistry*, 242(21), 4854-4866.
- 123) Rose, G., Passarino, G., Franceschi, C., & De Benedictis, G. (2002). The variability of the mitochondrial genome in human aging: a key for life and death?. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(11), 1449-1460.
- 124) Rouser, A. Yamamoto, Curvilinear regression course of human brain lipid composition changes with age, *Lipids* 3 (1968) 284–287
- 125) Sadi, G., & Konat, D. (2015). Resveratrol regulates oxidative biomarkers and antioxidant enzymes in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 1–8.
- 126) Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91(4), 443-446
- 127) Sato, K., Kashiwaya, Y., Keon, C. A., Tsuchiya, N., King, M. T., Radda, G. K., & Veech, R. L. (1995). Insulin, ketone bodies, and mitochondrial energy transduction. *The FASEB Journal*, 9(8), 651-658.
- 128) Shahbaz, H., & Gupta, M. (2020). Creatinine clearance. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
- 129) Sharma, G., & Goodwin, J. (2006). Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. *Clinical Interventions in Aging*, 1(3), 253
- 130) Sharma, M., & Gupta, Y. (2002). Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life Sciences*, 71(21), 2489–2498.
- 131) Skulachev, V. P. (2001). Phenomena of programmed death. Mitochondria, cells and organs: the role of reactive oxygen species. *Soros Educational Journal*, 7(6), 4-10.
- 132) Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074), 1220-1224.
- 133) Starkov, A. A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), 37-52.
- 134) Starkov, A. A., & Fiskum, G. (2001). Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(3), 645-650.
- 135) Stocco, B., Toledo, K., Salvador, M., Paulo, M., Koyama, N., & Tolo, M. R. T. (2012). Dose-dependent effect of resveratrol on bladder cancer cells: chemoprevention and oxidative stress. *Maturitas*, 72(1), 72-78.
- 136) Tabrizi, R., Tamtaji, O. R., Lankarani, K. B., Akbari, M., Dadgostar, E., Dabbaghmanesh, M. H., ... & Asemi, Z. (2020). The effects of resveratrol intake on weight loss: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(3), 375-390.
- 137) Taguchi, A., Wartschow, L. M., & White, M. F. (2007). Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science*, 317(5836), 369-372.
- 138) Tewari, D., Sah, A. N., Bawari, S., Nabavi, S. F., Dehpour, A. R., Shirooie, S., Braidy, N., Fiebich, B. L., Vacca, R. A., & Nabavi, S. M. (2021). Role of Nitric Oxide in Neurodegeneration: Function, Regulation, and Inhibition. *Current Neuropharmacology*, 19(2), 114-126.

- 139) Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., & Murata, M. (2014). Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 193-217.
- 140) Theodore, C., Singh, S. V., Hong, T. D., & Awasthi, Y. C. (1985). Glutathione S-transferases of human brain. Evidence for two immunologically distinct types of 26500-M r subunits. *Biochemical Journal*, 225(2), 375-382.
- 141) Thompson, A. M., Martin, K. A., & Rzczidlo, E. M. (2014). Resveratrol induces vascular smooth muscle cell differentiation through stimulation of SirT1 and AMPK. *PloS one*, 9(1), e85495.
- 142) Trumpower, B. L. (1990). The protonmotive Q cycle. *J. Biol. Chem.*, 265, 11409-11412.
- 143) Tsay, H. J., Wang, P., Wang, S. L., & Ku, H. H. (2000). Age-associated changes of superoxide dismutase and catalase activities in the rat brain. *Journal of Biomedical Science*, 7(6), 466-474.
- 144) Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335-344.
- 145) Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellierino, A. (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current biology*, 16(3), 296-300.
- 146) Vaziri, H., Dessain, S. K., Eaton, E. N., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., ... & Weinberg, R. A. (2001). hSIR2/SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 107(2), 149-159.
- 147) Vinogradov, A. D. (1998). Catalytic properties of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) and the pseudo-reversible active/inactive enzyme transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1364(2), 169-185.
- 148) Vinogradov, A. D., & Grivennikova, V. G. (2005). Generation of superoxide-radical by the NADH: ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 120-127.
- 149) Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, Fogliano V, Marchelli R. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food*. 2005 ; 49(5):495-504
- 150) Votyakova, T. V., & Reynolds, I. J. (2001). $\Delta\Psi_m$ -Dependent and-independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *Journal of Neurochemistry*, 79(2), 266-277.
- 151) Wahlländer, A., Soboll, S., Sies, H., Ingrid, L., & Monika, M. (1979). Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS letters*, 97(1), 138-140.
- 152) Walle, T., Walle, U. K., Sedmera, D., & Klausner, M. (2006). Benzo [A] pyrene-induced oral carcinogenesis and chemoprevention: studies in bioengineered human tissue. *Drug metabolism and disposition*, 34(3), 346-350.
- 153) Wang, C., & Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Annual Review of Genetics*, 43, 95-118.
- 154) Wang, X., & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2, 1-12.
- 155) Wang, X., & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2, 12.

- 156) Westergaard, N., Sonnewald, U., & Schousboe, A. (1995). Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Developmental neuroscience*, 17(4), 203-211.
- 157) Wickens, A. P. (2001). Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*, 128(3), 379-391.
- 158) Wood, J.G. et al. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430: 686– 689.
- 159) Yu, Y., Shen, Q., Lai, Y., Park, S. Y., Ou, X., Lin, D., & Zhang, W. (2018). Anti-inflammatory effects of curcumin in microglial cells. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 386.
- 160) Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, 75(4), 641-652.
- 161) Zagrebelsky, M., Tacke, C., & Korte, M. (2020). BDNF signaling during the lifetime of dendritic spines. *Cell and Tissue Research*, 382(1), 185-199.
- 162) Zhang, J. C., Yao, W., & Hashimoto, K. (2016). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-TrkB signaling in inflammation-related depression and potential therapeutic targets. *Current Neuropharmacology*, 14(7), 721-731.
- 163) Zhang, S., Eitan, E., & Mattson, M. P. (2017). Early involvement of lysosome dysfunction in the degeneration of cerebral cortical neurons caused by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Journal of Neurochemistry*, 140(6), 941-954.