



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-CLÍNICAS



Efecto de la administración crónica de resveratrol sobre el balance rédox de la corteza prefrontal de la rata macho Wistar durante el proceso de envejecimiento.

TESIS

presentada para obtener el grado de

Licenciada en Nutrición Clínica

PRESENTA

Haisha Cortés Carrasco

Director de Tesis:

D.C Samuel Treviño Mora

Co-director de Tesis:

D.C Guadalupe Soto Rodríguez

Heroica Ciudad de Puebla de Zaragoza, a marzo de 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres, Víctor y Liliana, por su apoyo incondicional, por darme la formación que ha contribuido a forjar lo que soy hoy en día. Si algo tengo presente es que, no importa lo lejos que esté, el mayor impulso para continuar lo recibo al tenerlos a ustedes a mi lado, pase lo que pase.

A mi director, el Dr. Samuel Treviño. Usted y yo sabemos todo lo que costó llegar hasta aquí. Más que una fuente de conocimiento e inspiración, su apoyo moral se convirtió en uno de mis mayores alicientes. Nunca me dejó caer, por más negra que se veía la perspectiva; le doy las gracias infinitas por ello.

A mi co-directora, la Dra. Guadalupe Soto. Siempre dulce y ayudándome a aterrizar. Agradezco su lucha constante, sin descanso, para que el objetivo se lograra. Es usted maravillosa.

A los integrantes de mi comisión revisora, al D.C Alfonso Díaz Fonseca, D.C. Víctor Blanco Álvarez y D.C. Tania Bilbao Reboledo, por su valioso tiempo dedicado a la revisión de mi tesis, por sus contribuciones y comentarios. ¡Muchas gracias!

A mis amigas y queridas nutriólogas, Rebeca, Rocío, Paulina, Karla; siempre estuvieron ahí para escucharme y de ustedes nunca faltó una palabra de aliento para mí.

A mis compañeras de Sweet, Diana, Julieta y Nancy, por ayudarme a sobrellevar los malos momentos con una carcajada más que necesaria.

A Hugo, por creer en mí, en que yo podía hacerlo. Fuiste el primero en apostar a que yo era capaz. No te voy a fallar.

Y finalmente, pero no por ello menos importantes, a mis dos químicos: Ivan y Daniel. Sin ustedes, esto jamás habría sucedido. Les debo tanto que no me alcanzan las palabras: por hacerme sentir una más, por compartir todo su conocimiento y por el espacio que me ofrecieron junto a ustedes en su mesa tras una larga jornada. El 2021 quedará marcado para mí por ser el año en que tuve la fortuna de cruzar mi camino con el suyo. ¡Muchas gracias!

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Envejecimiento.....	13
1.2 Implicaciones del envejecimiento.....	13
1.3 Teorías sobre el origen del envejecimiento.....	14
1.4 Estrés oxidativo.....	16
1.5 Marcadores oxidativos.....	17
1.5.1 Óxido Nítrico.....	17
1.5.2 Productos de lipoperoxidación.....	18
1.5.2.1 Malondialdehído MDA.....	19
1.5.2.2 -Hidroxiálquenal (4-HNE).....	19
1.6 Envejecimiento cerebral.....	22
1.7 Corteza frontal.....	23
1.8 Impacto del envejecimiento en la función de la corteza.....	24
1.9 Estrategias antienvjecimiento.....	25
1.10 Antioxidantes.....	26
1.11 Sistema antioxidante endógeno.....	26
1.11.1 Superóxido dismutasa.....	26
1.11.2 Catalasa.....	27
1.11.3 Glutación Peroxidasa.....	27
1.11.4 Glutación-S-Transferasa.....	27
1.11.5 Glutación reductasa.....	28
1.12 Antioxidantes exógenos.....	28
1.13 Resveratrol.....	30
2. JUSTIFICACIÓN.....	33

3. HIPÓTESIS.....	35
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
5. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	36
6. METODOLOGÍA.....	37
6.1 Administración de los animales.....	37
6.2 Análisis bioquímico.....	37
6.2.1 Cuantificación de proteínas totales.....	38
6.2.2 Cuantificación de nitritos.....	38
6.2.3 Cuantificación de MDA + 4HDA.....	38
6.2.4 Cuantificación de glutatión.....	38
6.3 Análisis enzimático.....	39
6.3.1 Determinación de actividad enzimática de la catalasa.....	39
6.3.2 Determinación de la actividad enzimática de superóxido dismutasa.....	39
6.3.3 Determinación de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa.....	39
6.3.4 Determinación de actividad enzimática de glutatión-S- transferasa.....	39
6.3.5 Determinación de actividad enzimática de glutatión reductasa.....	40
6.3.6 Análisis estadístico.....	40
7. RESULTADOS.....	41
7.1 Evaluación de moléculas pro-oxidantes en corteza prefrontal durante el envejecimiento.....	41
7.2 Evaluación de la actividad de enzimas anti-oxidantes en corteza prefrontal durante el envejecimiento.....	45
7.3 Efecto del resveratrol sobre dinámica del glutatión durante el envejecimiento.....	46

7.4 Efecto del resveratrol sobre la actividad de las enzimas del glutatión durante el envejecimiento.....	51
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	53
9. CONCLUSIONES.....	83
10.PERSPECTIVAS.....	85
11.BIBLIOGRAFÍA.....	86
12.ANEXOS.....	130
I.    Modelo animal y correspondencia de edad.....	130
II.   Descripción de las técnicas de medición de las variables Relevantes.....	132

## ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE COMPLETO
RL	Radical libre
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
•NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ,	Anión superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
NO <sub>3</sub>	Nitrato
HO•	Radical hidroxilo
MDA	Malondialdehído
4-HDA	4-hidroxi-alquenal
4-HNE	4-hidroxinonenal
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
AA	Ácido araquidónico
GSH	Glutación reducido
ADH	Alcohol deshidrogenasa
GSH-HNE	Glutathionil-HNE
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
DHN	1,4-dihidroxi-2-noneno
CPF	Corteza prefrontal
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación-S-transferasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
PPARα	Receptor alfa activado por proliferador de peroxisomas
LDH	Lipoproteína de baja densidad
UGT	UDP-glucuronosiltransferasa
SULT	Sulfotransferasa humana
OMS	Organización Mundial de la Salud

CONAPO	Consejo Nacional de Población
DNTB	Ácido 2-nitrobenzoico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
GSSG	Glutación reducido
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
fMRI	Resonancia magnética funcional
DLPCF	Corteza frontal dorsolateral
COX-2	Ciclooxigenasa-2
AINE	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
HC-TeTx	Cadena pesada de la toxina tetánica
CBL	Cerebrolysin
N-PEP-12	Neuropéptido-12
NMDA	N-metil-D-aspartato
CcO	Citocromo C oxidasa
-NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrógeno
Gpl	Glicerofosfolípidos
EtnGpl	Glicerofosfolípidos de etanolamina
ChoGpl	Glicerofosfolípidos de colina
SerGpl	Glicerofosfolípidos de serina
DHA	Ácido docosahexanoico
InoGpl	Glicerofosfolípidos de inositol
PI	Fosfatidilinositol
PIP3	Trifosfoinositida
PIP2	Difosfoinositida
PA	Ácido fosfatídico
EC	Corteza entorrinal
HP	Hipocampo
SFA	Ácidos grasos saturados
UFA	Ácidos grasos insaturados
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
RCS	Especies reactivas de carbonilo
UNO	4-oxo-2-nonenal
IP	Índice de peroxidabilidad
GSSG	Glutación oxidado
SNC	Sistema nervioso central
mM	Concentración milimolar
LFC	Corteza frontal izquierda
RFC	Corteza frontal derecha
GCS	Sintasa de glutación
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPO	Lipoperoxidación
NAC	N-acetilcisteína
C <sub>max</sub>	Concentración plasmática máxima

$t_{max}$	Tiempo transcurrido hasta el alcance de la $C_{max}$
$t_{1/2}$	Vida media
AUC	Área bajo la curva
ABC	Casete de unión dependiente de ATP
CUMS	Estrés crónico leve impredecible
HO-1	Hemo oxigenasa 1
Er $\beta$	Receptor de estrógeno $\beta$
ChAT	Colina acetiltransferasa



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Teorías del origen del envejecimiento.....	15
<b>Tabla 2.</b> Conformación celular de la corteza.....	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Síntesis de •NO a partir de L-arginina.....	18
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de producción de MDA.....	20
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de producción y metabolismo de 4-HNE.....	21
<b>Figura 4.</b> Capas de la corteza cerebral y distribución neuronal.....	24
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de regulación transcripcional de polifenoles.....	29
<b>Figura 6.</b> Estructura química del trans-resveratrol y el cis-resveratrol.....	30
<b>Figura 7.</b> Evaluación de moléculas pro-oxidantes en corteza prefrontal durante el envejecimiento.....	42
<b>Figura 8.</b> Evaluación de la actividad de enzimas anti-oxidantes en corteza prefrontal durante el envejecimiento.....	44
<b>Figura 9.</b> Evaluación de la dinámica del glutatión en corteza prefrontal durante el envejecimiento.....	47
<b>Figura 10.</b> Evaluación de la actividad de las enzimas del glutatión en corteza prefrontal durante el envejecimiento.....	50
<b>Figura 11.</b> Mecanismo celular de la actividad de glutatión y sus enzimas.....	70
<b>Figura 12.</b> Comportamiento del NO y MDA y 4-HNE a lo largo del tratamiento.....	81
<b>Figura 13.</b> Comportamiento de SOD y GPx a lo largo del tratamiento.....	82
<b>Figura 14.</b> Comportamiento de las fracciones de glutatión (GSH y GSSG) a lo largo del tratamiento.....	83
<b>Figura 15.</b> Correlación del peso corporal con diferentes fases de los días posnatales.....	131

## RESUMEN

El envejecimiento es un proceso dinámico caracterizado por un declive y deterioro progresivo de las funciones fisiológicas producto del daño celular. Es considerado el factor de riesgo más importante para la aparición de enfermedades que afectan la calidad de vida, entre las que destacan trastornos cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes y patologías renales, neoplasias, alteraciones neuronales, entre otros. El estrés oxidativo conforma una de las teorías explicativas más relevantes del envejecimiento, bajo la premisa de las alteraciones generadas por especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) en las biomoléculas. Para la evaluación del estado redox, se han establecido diversos biomarcadores que en su conjunto determinan si existe un desbalance entre el daño producido en un tejido determinado y la neutralización por los sistemas de defensa antioxidante. A este respecto, diversas estrategias han surgido con la intención de reducir el impacto fisiológico negativo del estrés derivado del envejecimiento, entre las que destacan el uso de moléculas antioxidantes. La corteza prefrontal (CPF) es la zona más desarrollada del cerebro humano, sobre la que recaen las funciones cognitivas superiores. El estrés generado en el envejecimiento conduce a alteraciones en la función y morfología de la CPF, conllevando alteraciones de la conducta y la memoria. Investigaciones sugieren que el uso crónico de moléculas antioxidantes como el resveratrol favorece el mantenimiento del balance redox de la CPF. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del resveratrol sobre el balance redox durante el envejecimiento de la CPF en ratas Wistar macho. Se utilizaron 135 ratas macho de la cepa Wistar, que fueron divididas aleatoriamente en 3 grupos: control, vehículo (etanol al 7.5%) y resveratrol (etanol al 7.5% + 10 mg/kg/d de resveratrol). Los periodos de administración evaluados fueron cada 2 meses, por 18 meses. Se realizaron en CPF pruebas bioquímicas y enzimáticas para la evaluación de marcadores de daño oxidativo ( $\bullet$ NO, MDA, 4-HNE), la función antioxidante (SOD, CAT, GPx) y el sistema de glutatión (GT, GSH, GSSG, GST, GR). Los resultados mostraron que el envejecimiento favorece el incremento de  $\bullet$ NO y un pico máximo de acúmulo de MDA y 4-HNE a los 10 meses de tratamiento. Asimismo, se observaron disminuciones en los niveles de actividad de SOD, CAT y

GPx. Los niveles de glutatión total y reducido (GSH) fluctuaron durante todo el periodo de intervención, manteniendo un índice redox prooxidante. El resveratrol administrado con vehículo promovió la disminución de los niveles de •NO y el mantenimiento de los niveles de MDA y 4-HNE con un patrón similar al del grupo control. Los niveles de actividad de SOD y GPx se vieron incrementados hacia el final del tratamiento, así como los niveles de glutatión total y GSH, observándose un índice redox antioxidante hacia los 16 meses de tratamiento. En conclusión, en la CPF, el proceso de envejecimiento registró modificaciones y adecuaciones del sistema redox para prevenir en la medida de lo posible la neurodegeneración. La administración crónica de resveratrol en una dosis de 10mg/kg previno la sobreproducción de •NO y de lipoperoxidación en la CPF, mejorando la actividad de las enzimas detoxificantes SOD, CAT y GPx y conservando el sistema glutatión con un mayor impacto en la etapa de la vejez tardía.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Envejecimiento**

El envejecimiento es un proceso dinámico y cronológico que se caracteriza por un mínimo, pero constante daño celular, un declive funcional gradual y un deterioro progresivo de las funciones fisiológicas, que eventualmente resultan en la disfunción tisular y en el incremento de la susceptibilidad de un organismo a diferentes enfermedades (1,2). La definición del envejecimiento normal, sus características y su trayectoria, son clave para la evaluación de sus causas, para establecer el periodo óptimo de una intervención y contrastar con precisión las distinciones con el envejecimiento acelerado (3).

Aunque las características generales varían en función de la especie, entre los efectos sistémicos más importantes registrados como consecuencia del envejecimiento se citan los cambios en la composición corporal (variaciones en el peso y en el tejido graso y muscular, acumulación de grasa visceral, desmineralización ósea), desbalances en la producción y utilización de energía (reducción del pico de consumo de oxígeno, fatiga, pérdida de autonomía), desregulación homeostática (desbalance hormonal y de mediadores inflamatorios, alteración del balance redox, desregulación del metabolismo de micronutrientes), neurodegeneración y neuroplasticidad (4).

### **1.2 Implicaciones del envejecimiento**

Ante una ola creciente de adultos mayores en todo el mundo que abarca más de una generación y el envejecimiento rápido de algunas naciones, las necesidades de salud pública, servicios en el hogar y entornos comunitarios se han vuelto más demandantes (5). En México, la transición epidemiológica ha visto un incremento marcado de la esperanza de vida, con un promedio de 59.9 años en 1970, y un aumento a 75.2 años registrado en 2020. Asimismo, el porcentaje de la población correspondiente al rango de edad de 60 años o más se incrementó de un 6.2% a un 11.3% (6).

El envejecimiento es el factor de riesgo más importante para la aparición de enfermedades que limitan la vida útil (7). Se han logrado identificar hasta 92 enfermedades relacionadas con el envejecimiento, que corresponden a trastornos cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas, diabetes y patologías renales, lesiones, neoplasias, alteraciones neuronales, entre otros (8). De acuerdo con las estadísticas, la aparición de estos padecimientos es responsable de la pérdida de años de vida reales y efectivos, afectando directamente la prosperidad económica, el tamaño y la mano de obra de los países cuya población ha envejecido abruptamente (9).

Entre las enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson son las más comunes asociadas a la edad, caracterizadas por manifestaciones clínicas tardías: deterioro de la memoria, problemas de orientación y dificultades de desempeño (7). Sin embargo, cabe resaltar que la salud física, y particularmente la salud mental, se encuentran determinadas tanto por factores genéticos como por el estilo de vida adoptado en las primeras décadas de la vida (10).

### **1.3 Teorías sobre el origen del envejecimiento**

La complejidad de los mecanismos biológicos asociados al envejecimiento ha dado lugar al surgimiento de teorías explicativas que intentan dilucidar los cambios progresivos de los sistemas fisiológicos con la edad (11). Varias de estas teorías se han postulado con fundamento en cambios moleculares básicos, conocidos como sellos distintivos del envejecimiento, que pueden ser producidos por el ambiente (externo e interno) y/o por procesos genéticos (12). De acuerdo con el enfoque, se dividen en teorías estocásticas y no estocásticas. La principal diferencia entre ambas radica en que las primeras tienen como eje central la acumulación de lesiones producidas por el ambiente, y las segundas contemplan la interacción conjunta de la genética y el entorno. A continuación, se muestran las diferentes teorías establecidas con su respectivo fundamento (Tabla 1) (13).

Los sellos distintivos del envejecimiento contemplan tres grandes categorías: el conjunto primario (causantes del daño), que incluye la inestabilidad genómica, el

desgaste de los telómeros, alteraciones epigenéticas y pérdida de proteostasis; el conjunto antagonista (responsables del daño), que contempla la detección de nutrientes desregulada, la disfunción mitocondrial y senescencia celular; y el conjunto integrativo (responsables del fenotipo), abarcando el agotamiento de las células madre y la alteración de la comunicación intercelular. De esta manera se determina el fenotipo del envejecimiento (12).

Tabla 1. Teorías del origen del envejecimiento	
<b>ESTOCÁSTICAS</b>	
Teoría de mutaciones somáticas	La exposición a radiación subletal (normal) reduce la esperanza de vida por destrucción de biomoléculas (13).
Teoría del error-catástrofe	La perpetuación de errores en la síntesis proteica desencadena la producción aberrante (13).
Teoría de la reparación del ADN	El número de replicaciones del ADN determina el periodo de vida de una especie y la cantidad de mutaciones en el mismo (13).
Teoría de la rotura de los enlaces químicos	La modificación de biomoléculas proteicas por rotura de enlaces genera cambios en el metabolismo celular, afectando los procesos fisiológicos normales (13).
Teoría de la glicosilación avanzada	Los enlaces cruzados entre glucosa y diversas proteínas (como el colágeno) ocasionan el deterioro funcional (13).
Teoría del estrés oxidativo	Los radicales libres (RL) reaccionan con biomoléculas y ocasionan alteraciones degenerativas (13).
<b>NO ESTOCÁSTICAS</b>	
Teoría de la senescencia programada	La programación genética de las células determina su vida útil y su muerte (13).
Teoría de los telómeros	El acortamiento de los telómeros con el declive de la actividad de la telomerasa resulta en la desaparición de

	los genes encontrados en esa región (asociados al envejecimiento) (13).
Teoría neuroendocrina	La disminución de la producción hormonal del eje hipotalámico-pituitario-adrenal desencadena problemas metabólicos que conducen al envejecimiento (13).
Teoría inmunológica	La disminución de la respuesta inmunológica ocasiona una reducción de la resistencia a procesos patológicos (13).

#### 1.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, que conduce a una disrupción de la señalización redox y favorece el daño molecular (14). De acuerdo con la duración de este, puede clasificarse como agudo o crónico. En relación con sus características, el estrés de origen ambiental y el nutricional se categorizan dentro de los de tipo crónico (15).

Durante las reacciones de óxido-reducción del metabolismo de los organismos aeróbicos, se generan ciertas moléculas conocidas como radicales libres (RL), que poseen un enorme rango de reactividad y de naturaleza química, siendo algunas más estables que otras. Existen dos grupos importantes de RL que se distinguen entre sí por el elemento que se encuentra más reactivo: el oxígeno, que da lugar a las especies reactivas de oxígeno (ROS), y el nitrógeno, que origina las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (14).

La presencia de ROS y RNS en niveles reducidos favorece la realización de procesos fisiológicos vitales. Sin embargo, al existir una sobreproducción de estas especies, se puede dar lugar a interacciones con biomoléculas altamente sensibles que a su vez suelen tener menor capacidad de reparación, como las proteínas, ácidos grasos, ADN, entre otras, activando los procesos asociados al envejecimiento como la senescencia celular (1,16). La senescencia surge como uno de los mecanismos de eliminación de daño cuya finalidad es la regeneración de los tejidos, propósito que se ve interrumpido durante el envejecimiento debido a las



deficiencias en la eliminación de las células senescentes (17). La célula senescente exhibe un comportamiento fenotípico caracterizado por la secreción de interleucinas, quimiocinas y factores de crecimiento, enzimas degradantes (metaloproteinasas), proteínas insolubles y componentes de la matriz extracelular (18).

Por otro lado, las alteraciones mitocondriales son consecuencia del estrés derivado del envejecimiento, debido a que este organelo se encuentra involucrado en procesos de metabolismo, producción de energía, homeostasis intracelular y equilibrio del calcio, así como en procesos de señalización y apoptosis celular, constituyendo el sitio principal de síntesis de ROS en mamíferos (19). La acumulación de daño y la alteración de la integridad del ADN mitocondrial, que se traduce en desacoplamiento de proteínas, fuga de protones, daño a lípidos de la membrana mitocondrial como la cardiolipina, errores de replicación y disminución de factores de transcripción, trae como consecuencia una disminución de la disponibilidad de energía y un incremento de producción de ROS, lo que favorece el envejecimiento temprano y la neurodegeneración (20,21).

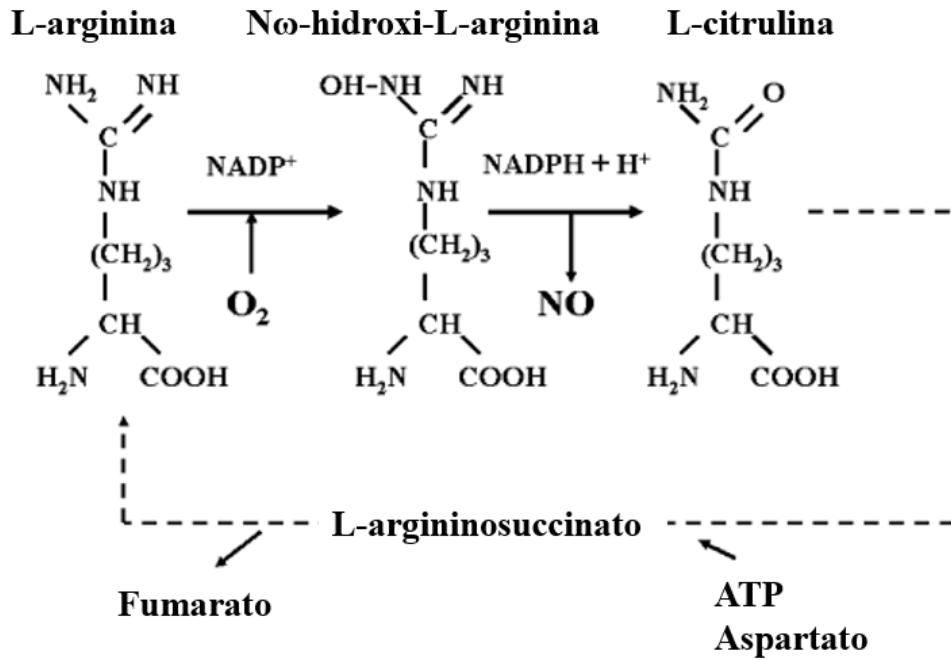
## **1.5 Marcadores oxidativos**

La asociación del estrés oxidativo con el envejecimiento y el estado patológico ha fomentado la búsqueda de marcadores para la evaluación del estado redox biológico (22). Gran parte de los estudios utilizan las modificaciones inducidas por las diferentes especies reactivas y la función antioxidante para establecer su parámetro de evaluación (23).

### **1.5.1 Óxido Nítrico ( $\bullet$ NO)**

El óxido nítrico es un radical libre relativamente estable presente tanto en el espacio intracelular como extracelular, cuya biosíntesis se produce a partir de L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en sus tres isoformas: endotelial (eNOS), inducible (iNOS) y neuronal (nNOS) (Figura 1). En condiciones fisiológicas, el  $\bullet$ NO cumple, además de otras funciones, un papel como mensajero, funcionando como neurotransmisor colinérgico no adrenérgico en el sistema

nervioso. También es encargado de mediar la contractilidad del músculo esquelético, así como del músculo liso en la perfusión cerebral, gastrointestinal, urogenital y respiratoria (24,25).



**Figura 1.** Síntesis de •NO a partir de L-arginina [Tomado y modificado de Bruckdorfer, 2005].

La inactivación oxidativa del •NO, que suprime sus funciones fisiológicas, ocurre con la reacción con el anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), donde se da lugar al peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un isómero estructural inestable del nitrato ( $\text{NO}_3$ ) capaz de inducir muerte celular (26). Su alta reactividad le permite interactuar con moléculas como aminoácidos (cisteína, metionina y triptófano), iones metálicos, proteínas y cofactores, alterando la estructura tridimensional, induciendo pérdida de funciones e inactivación enzimática (27).

### 1.5.2 Productos de lipoperoxidación

Dentro de la categoría de los parámetros que miden la evidencia del impacto directo de las ROS en los sistemas biológicos, los productos finales de la oxidación de lípidos son los más utilizados. El ácido linoleico y araquidónico, dos ácidos grasos en cuya estructura se destaca la presencia de dobles enlaces insaturados, son los objetivos más importantes de la reacción en cadena conocida como

lipoperoxidación lipídica, cuya iniciación se produce cuando un radical principalmente el radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) catalizan la sustracción de un átomo de hidrógeno, dando como resultado la formación de un radical de carbono altamente reactivo con el oxígeno. El producto final de la reacción con el oxígeno es un radical peroxilo lipídico (26,27).

La propagación de la reacción a lo largo de la membrana celular como mecanismo de estabilización conduce a la formación de hidroperóxidos y reactivos intermedios, que incluyen una variedad de diferentes aldehídos, alcanos y alquenos, tales como el malondialdehído (MDA), y 4-hidroxi aldehído (4-HDA), también conocido como trans-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (28).

#### **1.5.2.1 Malondialdehído (MDA)**

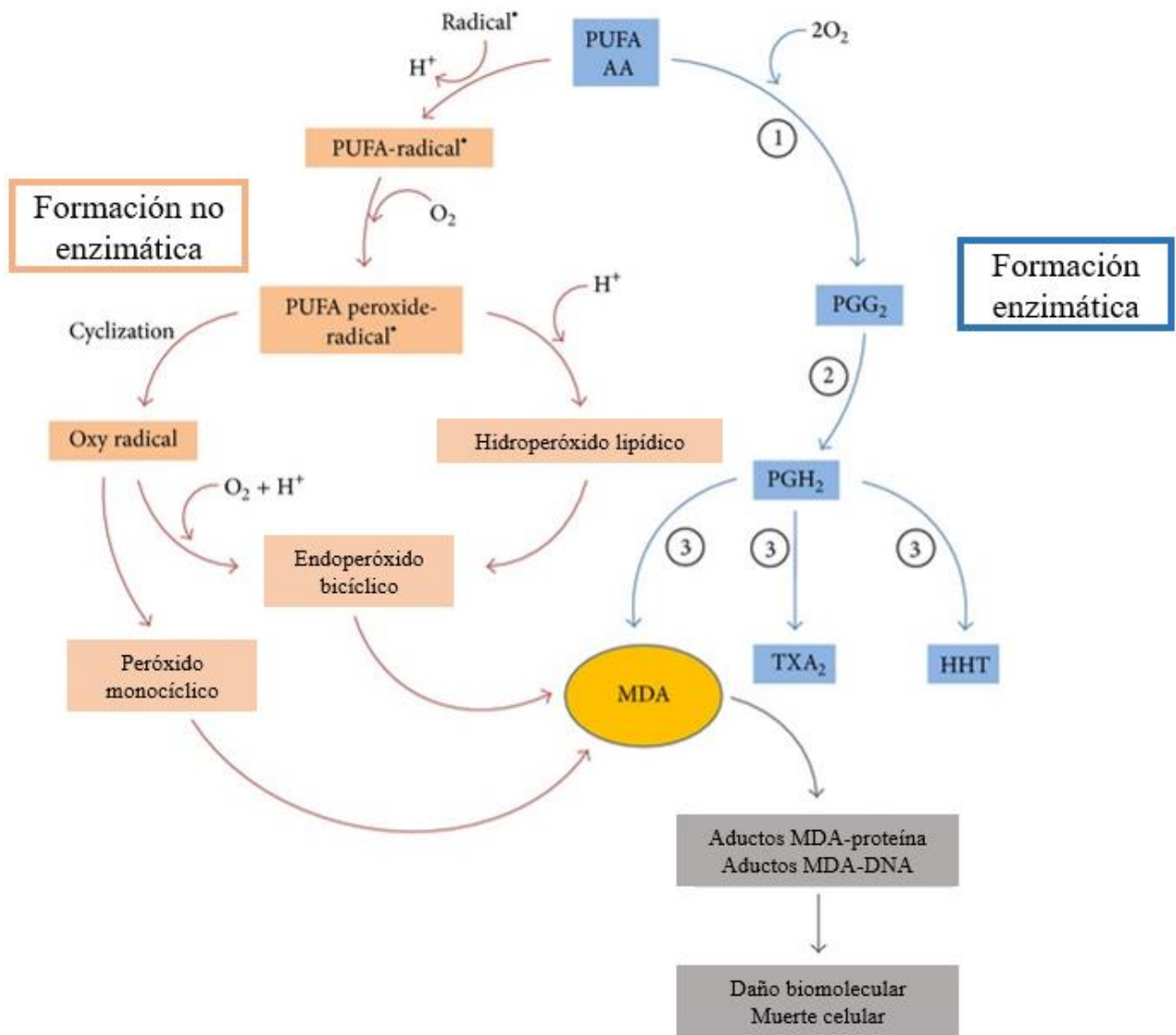
Derivado principalmente del ácido araquidónico y de ácidos grasos de cadena larga (PUFA) más grandes, el MDA es un producto final estable y permeable capaz de regular varias vías de señalización. Su generación puede darse mediante procesos enzimáticos (donde se ven involucradas la ciclooxigenasa y la tromboxano A<sub>2</sub> sintasa para la producción de prostaglandina H<sub>2</sub> y tromboxano A<sub>2</sub>, respectivamente), y no enzimáticos (mediante la formación de endoperóxidos ciclados en la membrana celular, proceso que es dependiente de RL) (Figura 2) (29).

La formación de los principales aductos de MDA, que también tiene lugar bajo condiciones de peroxidación basal, ocurre durante la interacción con proteínas, gracias a su capacidad de reaccionar con los grupos amino de los residuos de lisina, y con el ADN, donde el blanco principal es la desoxiguanosina (28). Por tanto, su detección permite estimar el nivel de peroxidación lipídica producida bajo diversas condiciones.

#### **1.5.2.2 4-Hidroxi alquenal (4-HNE)**

El 4-HNE es un aldehído tóxico derivado específicamente de ácido linoleico, ácido araquidónico y ácido 15-hidroperoxi araquidónico, cuya vida media es larga y

que cuenta con una gran reactividad y capacidad de difusión, estableciendo enlaces covalentes con moléculas de importancia biológica (29).



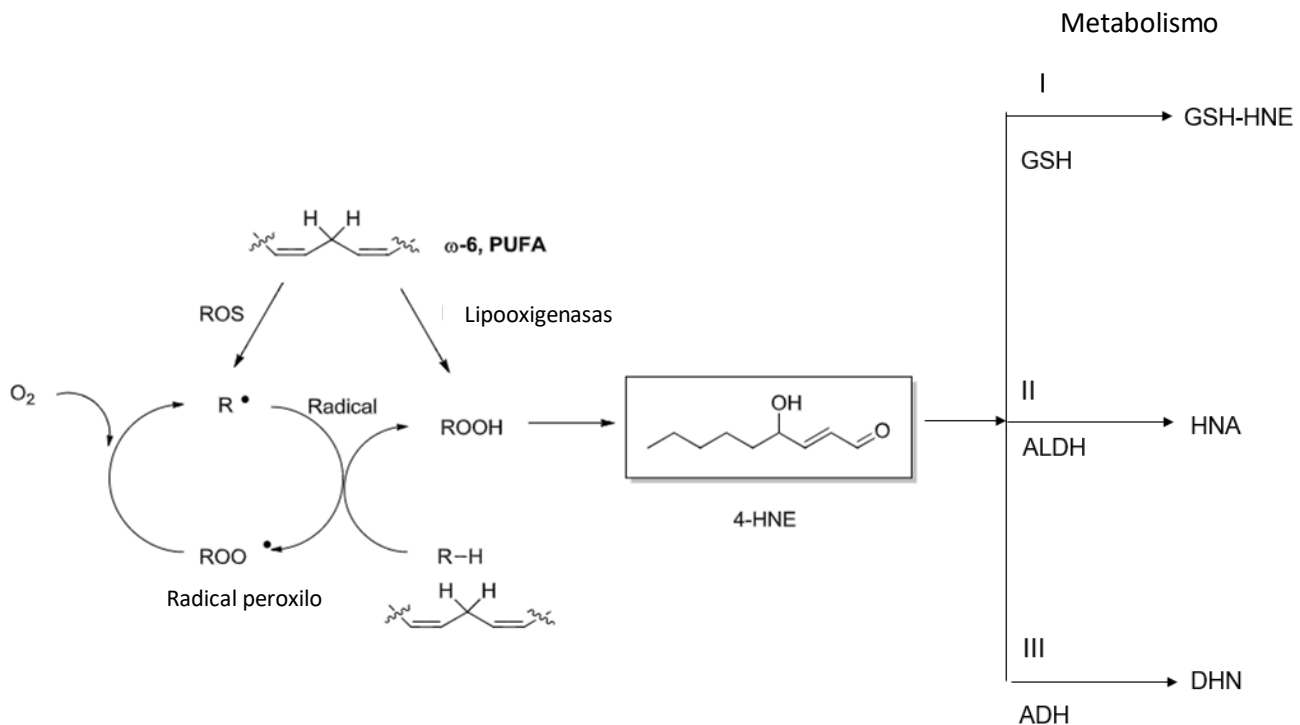
**Figura 2.** Mecanismos de producción de MDA [Tomado y modificado de Ayala, et al., 2014].

Debido a sus funciones sobre la señalización y expresión génica, asume un papel dual con respecto a las concentraciones en las que se encuentra: a bajas concentraciones ejerce un papel fisiológico al inducir acciones antioxidantes, pero a concentraciones altas surge su papel citotóxico al promover la progresión de diversas enfermedades y la muerte celular. En las enfermedades

neurodegenerativas cobra importancia debido a las modificaciones proteicas que se asocian a sus interacciones, como la nitración (29).

Al igual que el MDA, su formación surge a partir de procesos enzimáticos y no enzimáticos, involucrando la oxidación del ácido linoleico y araquidónico por lipooxigenasas, y la generación de hidroperóxidos de membrana dependiente de RL, respectivamente (30).

Su detoxificación utiliza dos rutas, correspondientes a la concentración en la que se encuentra en el tejido: a bajas concentraciones, ocurre la conjugación con glutatión reducido (GSH) y reducción/oxidación por la alcohol deshidrogenasa (ADH) con la producción de glutatiónil-HNE (GSH-HNE); a niveles moderados, ocurre la oxidación por la aldehído deshidrogenasa (ALDH) con producción de metabolitos biotransformables por el citocromo P450 mitocondrial, como el 9-hidroxi-HNA; a niveles altos de estrés, el metabolismo está mediado por ADH con generación del alcohol 1,4-dihidroxi-2-noneno (DHN) (Figura 3) (29, 30).



**Figura 3.** Mecanismos de producción y metabolismo de 4-HNE [Tomado y modificado de Zhong y Yin, 2014].

## 1.6 Envejecimiento cerebral

El envejecimiento cerebral fisiológico comienza a los 40 años, asociado con cambios en los patrones de activación y conectividad neuronal (31,32). El cerebro es especialmente susceptible al estrés oxidativo. De manera fisiológica, se trata de uno de los órganos que reporta el mayor consumo de oxígeno, demandando más de un 20% de la basalidad para el mantenimiento de las neuronas y su red sináptica. Aunado a esto, varios de sus procesos biológicos vitales, como la síntesis de neurotransmisores, el crecimiento de células progenitoras del hipocampo, la generación de rutas axonales y la señalización dependiente de calcio, están íntimamente ligados con la presencia o producción de ROS (33, 34).

Con el aumento de la edad, las neuronas son más sensibles a la acumulación de daños oxidativos y de mitocondrias defectuosas y las capacidades funcionales del cerebro sufren un declive progresivo, con afectaciones en la memoria, el razonamiento conceptual y la velocidad de procesamiento (31, 33). Entre las características específicas de los cuerpos neuronales que contribuyen a su susceptibilidad, es que están enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados fácilmente oxidables, además de contar con la presencia de iones metálicos y una menor actividad antioxidante en comparación con otros tejidos, lo que contribuye a la pérdida del balance redox. De acuerdo con el nivel de sensibilidad, ciertas poblaciones neuronales serán más susceptibles a sufrir daño celular o muerte (35).

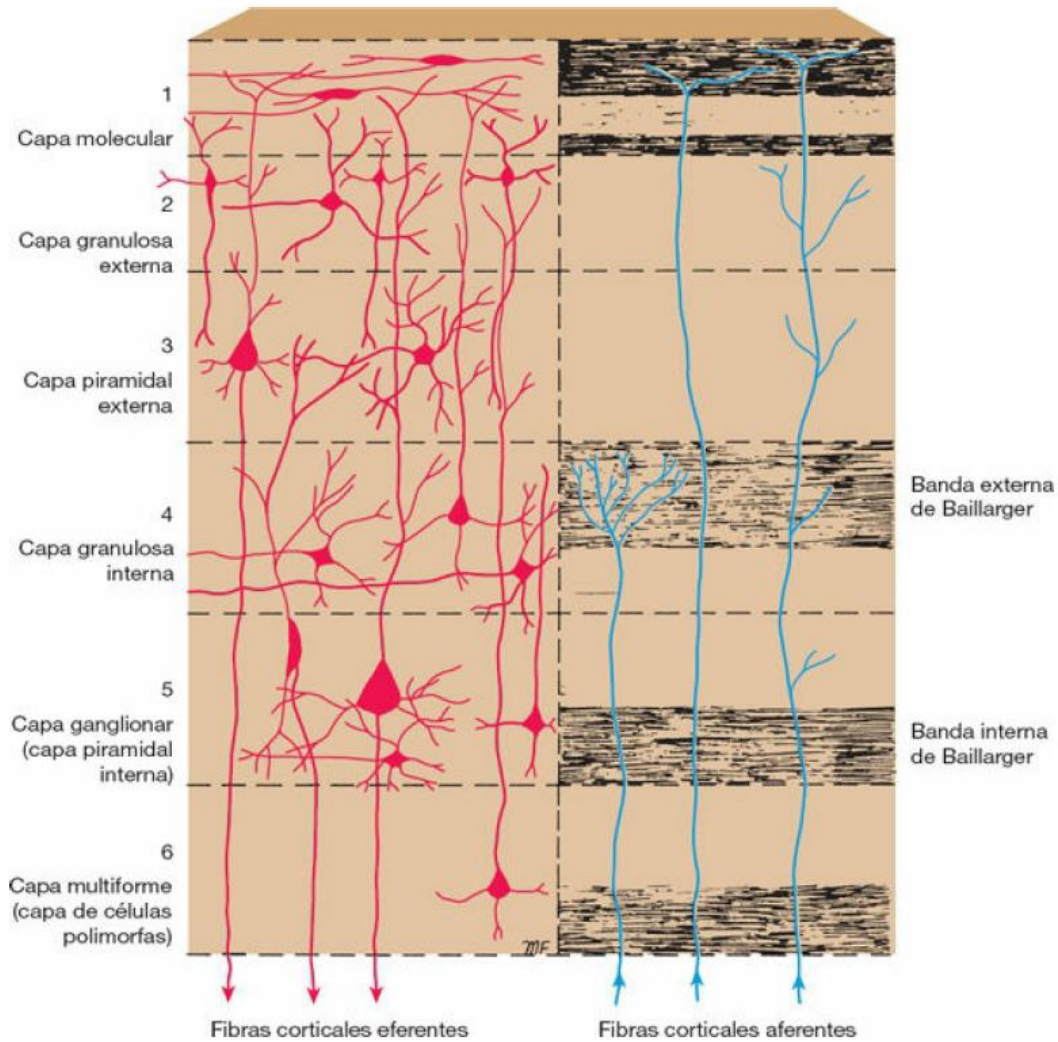
Es así como, ante un proceso de estrés crónico, comienzan a observarse diversas alteraciones en la estructura cerebral (15). Un cerebro envejecido presenta características variables entre individuos, aunque se tienen como factores comunes la acumulación anormal de proteínas, carbohidratos o lípidos entrecruzados, límite de fluidos, distrofia sináptica, pérdida de neuronas, adelgazamiento cortical y pérdida de volumen. Una de las regiones cerebrales más afectadas y sensibles a la neurodegeneración es la corteza prefrontal (35-37).

## 1.7 Corteza prefrontal

La corteza prefrontal es un área del cerebro ubicada en el lóbulo frontal, cuya composición anatómica y funcional es muy heterogénea. Es la estructura más desarrollada del sistema nervioso humano, ya que en ella recae la función cognitiva superior (funciones ejecutivas). Estas funciones están conformadas por habilidades mentales de alta complejidad ligadas a los impulsos, emociones, conducta, flexibilidad cognitiva, planeación y organización, entre otras (38).

Debido a ello, un daño en esta región puede generar una gama muy amplia de síntomas (algunos muy marcados, otros leves o incluso imperceptibles, relacionados a las funciones ejecutivas) como en ninguna otra estructura cerebral (39). Las conexiones de la corteza prefrontal se extienden hasta otras áreas corticales, el tálamo, el hipotálamo y el cuerpo estriado. Las capas que la conforman se distinguen por tipo, densidad y organización de sus células (Tabla 2); de esta manera, se establecen 6 capas (Figura 4) enumeradas en orden ascendente desde la superficie externa hacia el interior (40):

<b>Nombre</b>	<b>Conformación celular</b>
<b>1. Capa molecular o plexiforme</b>	Fibras nerviosas procedentes de células piramidales y fusiformes.
<b>2. Capa granulosa externa</b>	Células piramidales y estrelladas.
<b>3. Capa piramidal externa</b>	Células piramidales.
<b>4. Capa granulosa interna</b>	Células estrelladas.
<b>5. Capa ganglionar o piramidal interna</b>	Células piramidales, células estrelladas, células de Martinotti.
<b>6. Capa multiforme</b>	Células fusiformes, células piramidales modificadas, células de Martinotti.



**Figura 4.** Capas de la corteza cerebral y distribución neuronal (Tomado de Snell, 2014).

### 1.8 Impacto del envejecimiento en la función de la corteza

Durante el envejecimiento, surgen una serie de deficiencias selectivas en la plasticidad morfológica en el área correspondiente a la corteza prefrontal, teniendo como consecuencia que la capacidad para llevar a cabo las funciones cognitivas y la toma de decisiones se vea comprometida (41).

La exposición al estrés crónico altera la función y la morfología neuronal de la corteza prefrontal, produciendo atrofia neuronal selectiva. En modelos animales, se ha sugerido que en un desbalance oxidativo persistente induce un incremento en la oxidación del ADN/ARN de las neuronas de esta región, especialmente las células



piramidales, conllevando a alteraciones de la conducta (42). Se ha observado también un acortamiento de las dendritas apicales en ambos hemisferios ante condiciones de estrés crónico y envejecimiento (41).

Por otro lado, con el aumento de la edad la expresión génica relacionada al funcionamiento sináptico se encuentra regulada de forma negativa, afectando los procesos de neurotransmisión y los elementos que lo modulan. Genes que codifican marcadores de diversas interneuronas como las GABAérgicas, así como otros involucrados en la plasticidad se encuentran regulados a la baja (37). En estudios *postmortem* de la corteza prefrontal se han identificado al menos 540 genes que presentan cambios progresivos en su expresión durante el envejecimiento, sin asociarse a la presencia o ausencia de un diagnóstico psiquiátrico previo, diferencias de género, aspectos demográficos, clínicos o experimentales (43).

### **1.9 Estrategias antienvjecimiento**

En la actualidad, existen diferentes enfoques y estrategias antienvjecimiento con el objetivo de favorecer la salud en la vejez. La variabilidad de estas incluye procedimientos nuevos en etapa de evaluación como el aumento de la autofagia, eliminación de células senescentes mediante el uso de senolíticos, terapia con células madre y transfusión de sangre joven, así como procedimientos menos invasivos como el ayuno intermitente, la restricción calórica, el ejercicio físico y la ingesta de antioxidantes (44).

Con la aceptación de la teoría del envejecimiento por estrés oxidativo, la suplementación de antioxidantes naturales o sintéticos se volvió una terapia prometedora bajo la premisa de reducir los niveles de RL durante la vejez (45). La nutrición y las características de la dieta (calidad, proporción, equilibrio), han recibido especial atención con respecto a su contenido en antioxidantes exógenos que pueden contrarrestar la disminución progresiva de la eficacia de los sistemas antioxidantes endógenos producto del envejecimiento (44, 15).

Un compuesto bioactivo es una molécula esencial o no esencial que forma parte de la naturaleza, que puede adquirirse mediante el consumo de alimentos y

posee una actividad biológica que provee beneficios a la salud (46). La administración farmacéutica de determinados compuestos bioactivos ha mostrado tener potenciales efectos positivos sobre el funcionamiento cognitivo y el mantenimiento cerebral (47). Entre los antioxidantes más utilizados en ensayos clínicos contra destacan la vitamina C, vitamina E, curcumina, hidroxitirosol, coenzima Q10 y resveratrol (45).

### **1.10 Antioxidantes**

Como definición, un antioxidante es una molécula natural o sintética que, cuando se presenta en bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, posee la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación de esa molécula, impedir la formación de RL y detener su propagación mediante diferentes mecanismos (48).

Como ya se ha mencionado, ante un incremento de la producción de ROS que es detectado por tejidos y células, se activan procesos de defensa interna múltiple para eliminarlos y evitar la oxidación de sustratos. Este sistema de protección del organismo comprende de enzimas y captadores de ROS no enzimáticos que mantienen un estado de equilibrio redox saludable (16). Además de los antioxidantes que el cuerpo humano produce de forma fisiológica, estas moléculas también pueden obtenerse de fuentes externas (naturales, mediante los alimentos, o sintéticos) (49).

### **1.11 Sistema antioxidante endógeno**

Los antioxidantes endógenos pueden actuar cediendo sus electrones para lograr la estabilización de los radicales libres, minimizando el daño causado por estos, y contribuyendo a la recreación de otros antioxidantes; se incluyen en este grupo las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión transferasa (GT) (49).

#### **1.11.1 Superóxido dismutasa.**

La superóxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima localizada en diversos compartimentos de células eucariotas y algunas procariontas. Se distinguen tres

isoformas que se diferencian entre sí por su ubicación y por los minerales utilizados como cofactores: SOD1 (Cu-Zn-SOD), localizada en citosol y en la intermembrana mitocondrial; SOD 2 (Mn-SOD), ubicada en la matriz mitocondrial y la membrana interna; y SOD3 (Cu-Zn-SOD), ubicada en el compartimiento extracelular. Su reacción se basa en la catalización de la conversión del radical libre anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y oxígeno molecular  $\text{O}_2$  (50).

### **1.11.2 Catalasa**

La catalasa (CAT) es una enzima presente en organismos aeróbicos y expresada en gran parte de las células y tejidos. Comprende 3 isoformas diferenciadas por su secuencia y estructura: catalasa monofuncional (la más abundante y que contiene un grupo hemo), catalasa-peroxidasa bi-funcional (menos abundante), y catalasa en cuya estructura no existe el grupo hemo. Su reacción constituida por dos pasos se basa en la descomposición de dos moléculas de peróxido de hidrógeno en una molécula de oxígeno y dos moléculas de agua (51, 52).

### **1.11.3 Glutación peroxidasa**

La glutatión peroxidasa (GPx) es una selenoproteína que funciona como agente reductor de peróxidos. Su ciclo catalítico involucra primero la reacción de la molécula de glutatión reducido (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 (53).

### **1.11.4 Glutación-S-Transferasa**

La glutatión-S-transferasa (GST) que cuenta con cuatro isoenzimas y que participa en diversas reacciones de conjugación de fase 2, debido a que gran parte de sus sustratos son xenobióticos o productos del estrés oxidativo. Debido a esto, una de sus funciones principales es la catalización del GSH con una gran variedad de compuestos electrofílicos (54).

### **1.11.5 Glutación reductasa**

La glutación reductasa (GR) es una enzima esencial involucrada en el reciclaje del glutación, transformando la forma oxidada de este compuesto de vuelta a su forma reducida. 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 organelos (mitocondria y núcleo) (55).

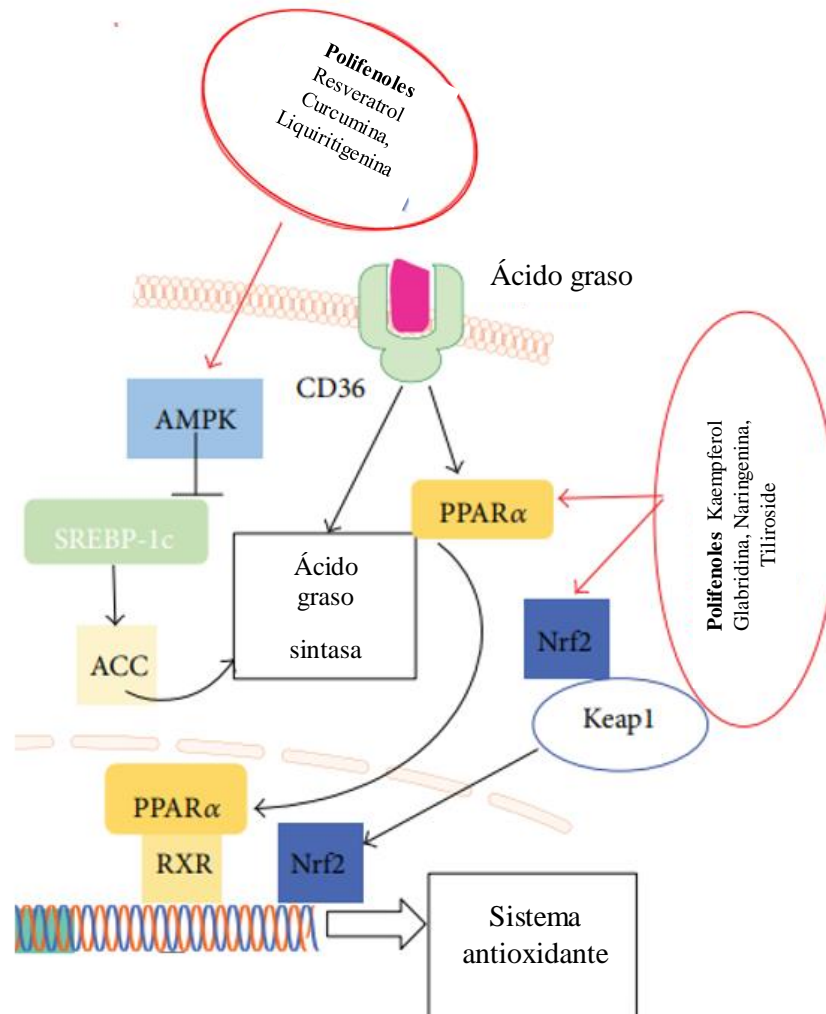
### **1.12 Antioxidantes exógenos**

Ante la gran variedad de antioxidantes exógenos no enzimáticos, los fitoquímicos destacan por ser un grupo de moléculas ligadas al metabolismo secundario de las plantas que han sido probados tanto en animales como en células humanas, mostrando cierta actividad biológica con potencial para su aplicación farmacéutica (56).

De entre todos los grupos de fitoquímicos, los polifenoles se han perfilado como compuestos naturales a los que se les atribuyen una amplia variedad de efectos beneficiosos en el ser humano contra diversas patologías fuertemente asociadas al envejecimiento y al incremento de ROS, como las enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, síndrome metabólico, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, contribuyendo a la mejora de la capacidad cognitiva del cerebro durante el envejecimiento (56, 57).

Entre las generalidades de su mecanismo antioxidante, los polifenoles actúan directamente en el rompimiento de las reacciones de cadena de los RL sobre los lípidos membranales. Esta capacidad de intervención se debe a dos características químicas específicas: a la presencia de grupos OH reductores y a la estabilidad de la molécula conferida por la estructura aromática, que favorece el fenómeno de resonancia de los radicales. La adsorción de los polifenoles en la superficie de membrana implica una mayor cercanía a los RL, permitiendo su eliminación. Con relación a las proteínas, los polifenoles interactúan con los residuos de prolina, y son capaces de provocar la unión de factores de transcripción al ADN, modificaciones enzimáticas y otros efectos biológicos (58).

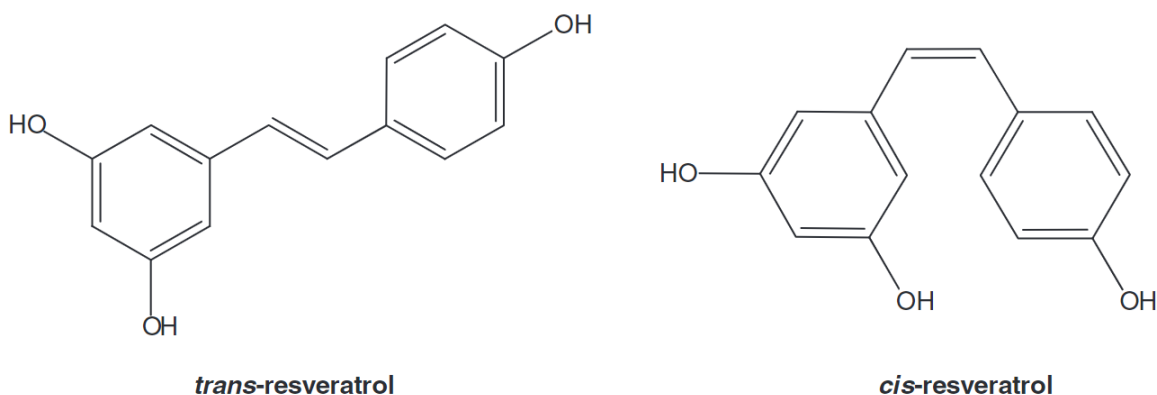
Los mecanismos que involucran la activación de factores de transcripción incluyen la vía mediada por el factor eritroide 2 nuclear (Nrf2), cuya señalización involucra la inactivación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), enzima que participa directamente en las respuestas celulares a estímulos mediante la translocación y transcripción de otros factores al núcleo, como PPAR- $\alpha$  (Figura 5) (59).



**Figura 5.** Mecanismos de regulación transcripcional de polifenoles (Tomado y modificado de Li, et al., 2018).

### 1.13 Resveratrol

El resveratrol, cuyo nombre químico de acuerdo con la nomenclatura orgánica corresponde a *trans*-3,5,4-trihidroxiestilbeno, es una molécula de origen vegetal perteneciente al grupo de los polifenoles (estilbenoide); su estructura posee dos anillos de fenol unidos entre sí por un puente de estileno (Figura 6). También se le puede clasificar dentro de la subclase de las fitoalexinas por su capacidad de inhibir el progreso de ciertas infecciones (60). Es producido y liberado por las plantas como medio de protección y posee actividad antimicrobiana. En vertebrados ha mostrado diversos efectos incluyendo antiinflamatorio, antiapoptótico, antiobesidad, anticanceroso neuroprotector y un potente agente antioxidante. De forma natural, es común encontrarlo formando glucósidos (unido a azúcares simples), en la piel y en las semillas de las uvas rojas, las bayas, los arándanos, la grosella, los cacahuates, el vino, entre otros. Debido al proceso de maceración de la uva donde la piel y semillas liberan su contenido de polifenoles, y al alcohol producido durante la fermentación que al mismo tiempo favorece su solubilidad y extracción, el vino tinto es más rico en resveratrol (61, 62).



**Figura 6.** Estructura química del *trans*-resveratrol y el *cis*-resveratrol

Entre las generalidades químicas del resveratrol se destaca la presencia de sus dos isómeros, uno en forma *cis* y otro en forma *trans*, de los cuales a este último se le atribuye su actividad biológica. Cuenta además con un coeficiente de partición de 3.0, lo que condiciona su baja solubilidad en agua y alta solubilidad en solventes orgánicos como etanol, limitando su uso clínico (63).

Con relación a su farmacocinética, como ya se ha mencionado, la absorción del resveratrol se ve limitada por su poca solubilidad en agua, misma que puede incrementarse con la utilización de vehículos como el etanol (10 mg/mL), solventes orgánicos y vectores (62). Debido a esto, la administración de resveratrol en solución con base hidroalcohólica, como lo es el vino tinto, muestra una biodisponibilidad significativa del compuesto; a mayor contenido de etanol, se ha comprobado una mayor absorción de fenoles (64).

Su absorción intestinal se realiza por difusión pasiva o mediante la formación de complejos con transportadores. La distribución en sangre ocurre por unión a la albúmina y a lipoproteínas (LDL) (62). Este polifenol se biotransforma en el hígado mediante reacciones de conjugación con ácido glucurónico y sulfatación (Fase II). Las reacciones de conjugación son llevadas a cabo por enzimas pertenecientes a la familia de las UDP-glucuronosiltransferasas (UGT); esta reacción altera sus propiedades biológicas y da lugar a dos metabolitos de fácil eliminación: resveratrol-3-O-glucurónido y resveratrol-4-O-glucurónido. Por otro lado, la sulfatación es llevada a cabo por la sulfotransferasa humana (SULT) que da lugar a tres metabolitos: resveratrol-3-O-sulfato, resveratrol-4-O-sulfato y resveratrol-3,4-O-disulfato (65).

Esta molécula ha demostrado ser un excelente modulador del daño oxidativo, la inflamación y la senescencia celular asociados al envejecimiento, además de exhibir actividad neuroprotectora en modelos *in vitro* e *in vivo* a través de mecanismos que involucran la modulación de sirtuinas, la disminución de los depósitos de amiloide cerebral, la reducción de la activación microglial y del deterioro cognitivo, disminución de la hiperfosforilación de la proteína *tau*, entre otros (56).

El resveratrol se perfila como uno de los compuestos que exhibe mayores beneficios con respecto a la longevidad, teniendo efectos favorables ante la presencia de diversas patologías asociadas a la edad. Los resultados observados *in vitro* han intentado ser trasladados a modelos *in vivo*, donde las condiciones de absorción, farmacocinética, distribución y metabolismo son determinantes para

demostrar dichos efectos y que, por consiguiente, establecerán la pauta para proponer su aplicación terapéutica.



## 2 JUSTIFICACIÓN

El envejecimiento demográfico surge a partir de un proceso de transición determinado por la disminución de las tasas de fecundidad y mortalidad, con el incremento progresivo de la esperanza de vida, lo que implica un cambio en la estructura poblacional con una inclinación hacia los adultos mayores (66).

De acuerdo con la OMS, la población envejece en todo el mundo con más rapidez que en épocas pasadas, y las estadísticas reportan que existen más de mil millones de personas que tienen 60 años o más (67). Las proyecciones a futuro pronostican que para el año 2050 habrá 434 millones de personas en todo el mundo con más de 80 años, y el 80% de ellas tendrá su origen en países de ingresos medio y bajo (68). En México, durante el año 2015 se registró que más de la décima parte de la población del país pertenece al grupo de edad correspondiente a 60 años o más, y las proyecciones del Consejo Nacional de Población (CONAPO) pronostican el incremento de esta cifra, alcanzando hasta el 14.81% del total (66).

De esta forma, la carga de enfermedades de mayor prevalencia en la población se ha desplazado hacia las enfermedades no transmisibles, donde el envejecimiento se ha catalogado como el principal factor de riesgo. Este cambio demográfico y epidemiológico se traduce en un incremento de los costos de atención social y de salud que plantean la necesidad de identificar factores que permitan envejecer física y mentalmente de manera saludable (69).

La pérdida de capacidades cognitivas y la susceptibilidad a trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad espinocerebelosa, han convertido en metas urgentes el entendimiento de las causas y el hallazgo de factores que moderen su progresión (33, 70). Particularmente en el cerebro envejecido, la acumulación de daños afecta, entre las diferentes zonas corticales, principalmente a la CPF, interrumpiendo la amplia red de conexiones que establece con otras regiones cerebrales, así como los procesos asociados a la construcción del proceso cognitivo, la toma de decisiones y la modulación del comportamiento.

En la actualidad no existe ningún tratamiento eficaz para combatir los trastornos neurodegenerativos, por lo que se ha buscado desarrollar nuevas estrategias con enfoque neuroprotectoras mediante la implementación de agentes capaces de prevenir o retrasar la aparición de estas patologías. La evidencia sugiere que ciertos polifenoles como el resveratrol juegan un papel potencial para su aplicación terapéutica y preventiva debido a su papel como molécula antioxidante (56).

De esta manera surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de la administración vía oral de resveratrol sobre el balance redox en la corteza prefrontal durante el proceso de envejecimiento?

### **3 HIPÓTESIS**

Hipótesis nula: La administración oral de resveratrol a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal no muestra mejoras en el balance redox en la corteza prefrontal durante el proceso de envejecimiento en ratas Wistar.

Hipótesis alternativa: La administración oral de resveratrol a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal muestra mejoras en el balance redox en la corteza prefrontal durante el proceso de envejecimiento en ratas Wistar.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

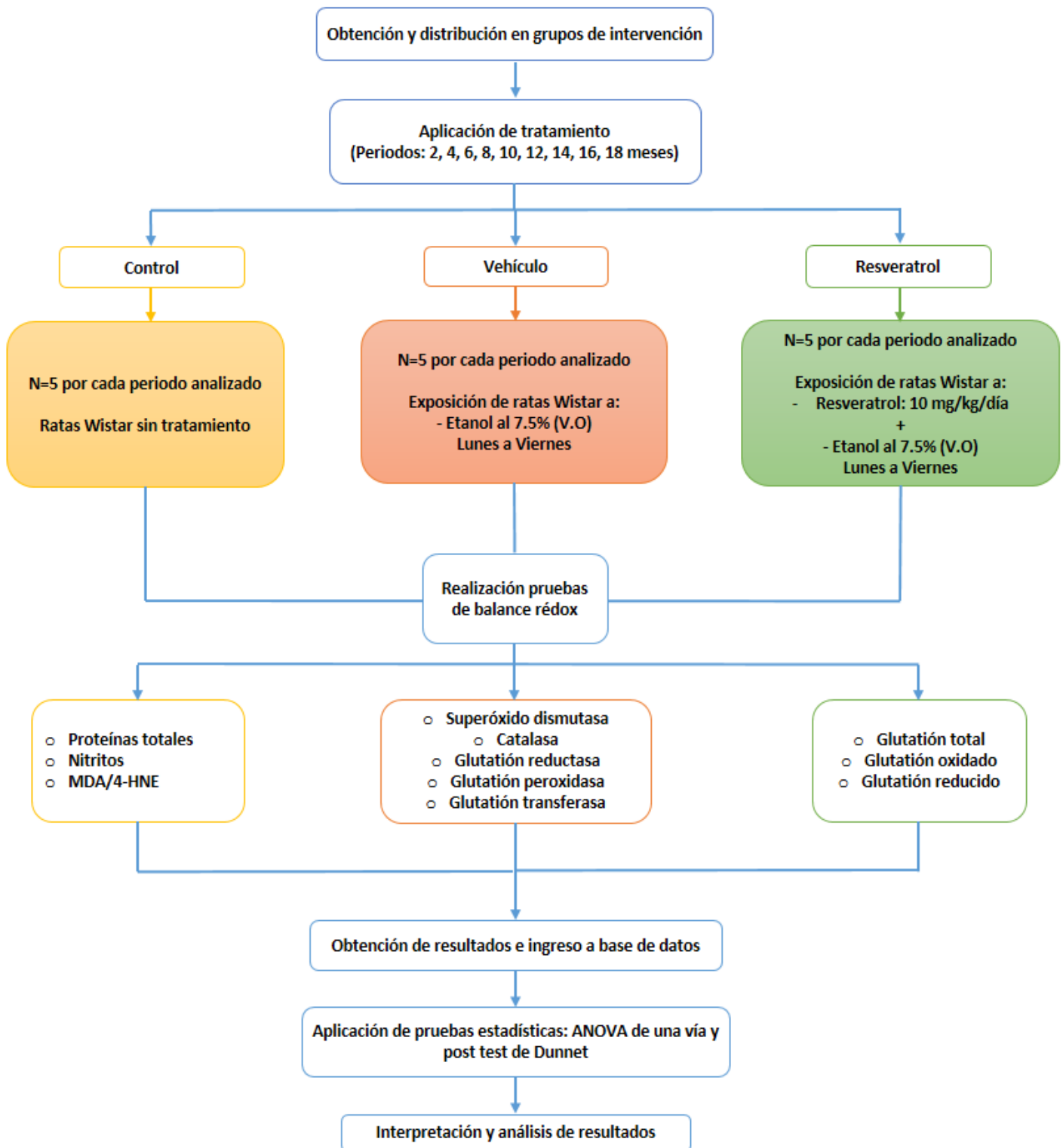
Evaluar el efecto de la administración de resveratrol sobre el balance redox de la corteza prefrontal durante el proceso de envejecimiento en ratas macho de la cepa Wistar.

#### **4.2 Objetivos específicos**

En corteza prefrontal de rata Wistar macho con y sin tratamiento, durante el proceso de envejecimiento:

- 1.- Valorar la actividad de enzimas antioxidantes.
- 2.- Evaluar los componentes del sistema glutatión.
- 3.- Cuantificar las especies prooxidantes y aductos estables derivados del estrés oxidativo.

## 5. DIAGRAMA DE TRABAJO



## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Administración de los animales

Se utilizaron un total de 135 ratas macho de la cepa Wistar con 3 meses de edad, que fueron obtenidos del bioterio Claude Bernard de la BUAP. La descripción del modelo animal elegido y la correspondencia de edad establecida con el humano se muestran en el Anexo 1. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio bajo ciclos de luz/oscuridad de 12-12 horas con acceso de agua y alimento *ad-libitum*. Las ratas se dividieron de forma aleatoria en 3 grupos: **Control** (sin tratamiento), **Vehículo** (al que se le administró 7.5% de etanol) y **Resveratrol + Vehículo** (al que se le administró 10 mg/kg/día + 7.5% de etanol). A su vez, se realizó otra subdivisión en 9 grupos con 5 animales en cada grupo, que corresponden a los meses de tratamiento (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 meses).

El resveratrol administrado correspondió a la marca Resvitalé®, Resveratrol al 45% procedente del laboratorio de GNC. La administración de cada tratamiento se realizó con una cánula esofágica con horario estricto a las 8:00 horas de lunes a viernes.

Las ratas fueron sacrificadas mediante el uso de una mezcla de ketamina-xilacina a una dosis de 0.20 mL/kg de peso del animal. Posteriormente, después de la perfusión de la rata, el cerebro fue extraído y se diseccionó la corteza prefrontal, procediendo a su almacenamiento en condiciones de congelación (-80°C) hasta la finalización del último tratamiento para contar con todas las muestras para llevar a cabo las pruebas correspondientes. Todos los procedimientos se llevaron a cabo minimizando el sufrimiento de los animales, de acuerdo con lo establecido por la Norma Oficial Mexicana, NOM-62-ZOO-1999.

### 6.2 Análisis bioquímico

Las técnicas utilizadas para la determinación de los análisis bioquímicos y enzimáticos realizados en este estudio se encuentran descritas a profundidad en el Anexo 2.

### **6.2.1 Cuantificación de proteínas totales**

Se utilizó el método que contempla la utilización del azul brillante de Coomassie G250 al 0.06%, cuyo color se torna de un azul intenso cuando, en presencia de un ácido (ácido perclórico al 3.0%), se mezcla con las proteínas presentes en la muestra. Se usó albúmina sérica bovina como estándar de comparación. La lectura de la absorbancia producto de la reacción se llevó a cabo en un espectrofotómetro a 595 nm (Anexo 2) (71).

### **6.2.2 Cuantificación de nitritos**

La producción de  $\text{NO}_2^-$  fue cuantificada en placas de ELISA con el método establecido por Griess, basado en la reacción de los nitritos con el reactivo del mismo nombre (reactivo de Griess), donde al contacto con el ácido sulfanílico se produce la formación de un catión de diazonio, que reacciona con la N-1-naftiletilendiamina, generando un colorante rosáceo. Se usó un stock de nitritos como estándar de comparación. La lectura de la absorbancia producto de la reacción se llevó a cabo en un espectrofotómetro a 540 nm (Anexo 2) (72).

### **6.2.3 Cuantificación de MDA + 4-HDA**

Los productos de lipoperoxidación se determinaron mediante dos reacciones. Se utilizó el N-metil-2-fenil-indol como reactivo cromógeno, con adición de ácido clorhídrico para la medición de MDA y ácido metanosulfónico para la lectura de MDA+4HDA. El estándar de MDA se manejó con una solución de tetrametoxipropano 10  $\mu\text{M}$ . La absorbancia de la reacción fue leída en un espectrofotómetro a 586 nm (Anexo 2) (73).

### **6.2.4 Cuantificación de glutatión total, oxidado y reducido**

La técnica se realizó en placas de ELISA, basada en los procesos de oxidación y reducción del DTNB, donde se empleó un buffer de fosfato (KPE) y un buffer de extracción. Se utilizaron como reactivos el NADPH y la glutatión reductasa, además de reactivos específicos para glutatión oxidado (vinilpiridina y trietanolamina). La lectura de absorbancia se realizó a 412 nm (Anexo 2) (74).

## **6.3 Análisis enzimático**

### **6.3.1 Determinación de actividad enzimática de CAT**

Para esta técnica se tomaron en consideración la velocidad de descomposición del  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$ , mediante la adición de un buffer de fosfato de potasio y  $H_2O_2$  30  $\mu M$  a la muestra. La lectura de absorbancia se realizó a 240 nm y se registró una absorbancia inicial y una final (al cabo de 1 minuto) para el cálculo de la diferencia por unidad de tiempo (Anexo 2) (75).

### **6.3.2 Determinación de actividad enzimática de SOD**

Para la actividad de la superóxido dismutasa, la técnica se basó en la oxidación del pirogalol en presencia de EDTA y de un buffer de Tris con HCl. Se realizó un ensayo en blanco para la estandarización de la oxidación del pirogalol con la delta de absorbancia y una vez ajustada se procedió con el ensayo. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro a 420 nm (Anexo 2) (76).

### **6.3.3 Determinación de actividad enzimática de glutatión peroxidasa**

Esta técnica contempló en su fundamento la medición del consumo de  $H_2O_2$  a través del tiempo, distinguiendo dos fases separadas por un periodo de incubación. Durante la primera fase se adicionó un reactivo de acoplamiento a la muestra ajustada a un buffer de sucrosa, que tuvo que ser incubada. Posteriormente se adicionó el sustrato de  $H_2O_2$  para proceder a la lectura de absorbancia a 340 nm, con un monitoreo por minuto durante 5 minutos (Anexo 2) (77).

### **6.3.4 Determinación de actividad enzimática de glutatión transferasa**

La determinación de actividad de glutatión transferasa se realizó con base en la adición de tres reactivos principales (un buffer de fosfatos, GSH y DNTB) para la observación de la conversión de DNTB, que se adicionó a la placa con las muestras. La absorbancia en el lector de placas se midió a 405 nm, con un monitoreo continuo cada minuto (Anexo 2) (78).

### **6.3.5 Determinación de actividad enzimática de glutatión reductasa**

El ensayo tiene como fundamento la reducción del GSSG mediante la utilización del reactivo NADPH. Se realizó en placas de ELISA en dos pasos. Para el paso A, se adicionaron a la muestra el reactivo principal (que incluía NADPH), un buffer regulador a base de EDTA y FAD<sup>+</sup>. Esta primera reacción procedió a leerse con monitoreo a 340 nm. Para el paso B, se adicionó nuevamente el buffer regulador más el GSSG, realizando una nueva lectura de la absorbancia a 340 nm (Anexo 2) (79).

### **6.3.6 Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos se realizó una prueba de ANOVA de una vía y post test de Dunnet, con una significancia estadística de  $p < 0.05$ .



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Evaluación de moléculas pro-oxidantes en corteza prefrontal durante el envejecimiento.

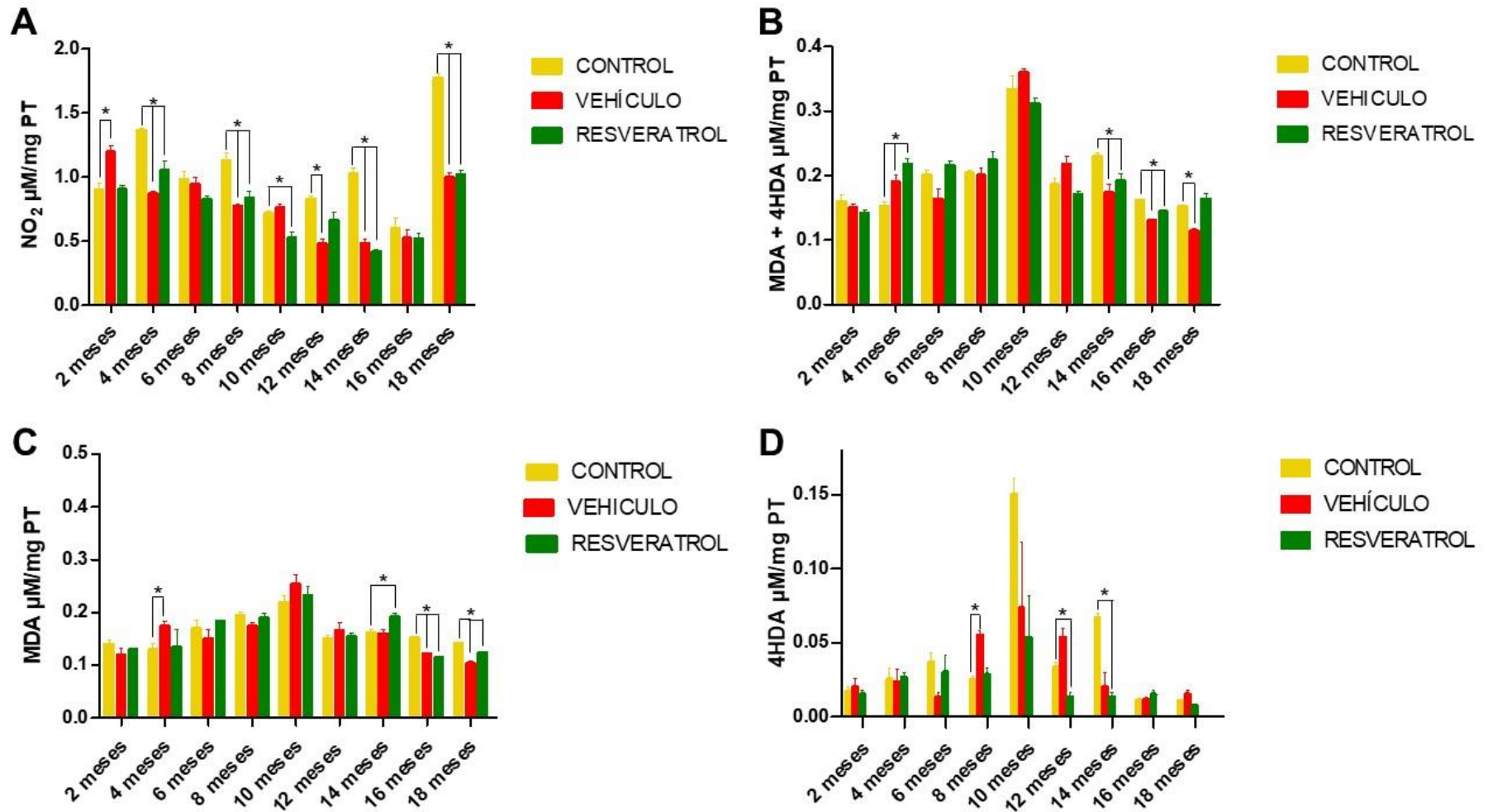
La producción de óxido nítrico se analizó de manera indirecta mediante la cuantificación de los nitritos presentes en el tejido de interés (Figura 7A). En el grupo control, en los primeros 16 meses de tratamiento la concentración de este metabolito varió entre 0.6 y 1.37  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína, consideradas dentro de la normalidad fisiológica en el envejecimiento; sin embargo, a los 18 meses de experimentación se observó un incremento del 295%.

En comparación, el grupo administrado con el vehículo incrementó 33% su concentración de nitritos en el segundo mes de tratamiento, y posteriormente disminuyó significativamente a los 4 (36.3%), 8 (31.5%), 12 (42.5%), 14 (53.1%) y 18 (43.6%) meses de tratamiento respecto del grupo control intacto.

Finalmente, el grupo resveratrol exhibió un comportamiento a la baja desde el cuarto mes de tratamiento hasta el final del estudio, siendo estadísticamente significativo a los 4 (23%), 8 (25.8%), 10 (26.9%), 12 (20%), 14 (59%) y 18 (42.4%) meses de tratamiento respecto del grupo control.

Los niveles de lipoperoxidación total registrados en los tres grupos se muestran en la figura 7B. De los 2 a los 8 meses de experimentación, la concentración de MDA + 4HDA en la CPF del grupo control promedió con un valor de 0.17  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína. Sin embargo, a los 10 meses se observó un pico que alcanzó una concentración máxima de 0.33  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína, misma que, a partir de los 12 meses del experimento y hasta el final de este, mostró un promedio de 0.19  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína.

Manteniendo un patrón de comportamiento similar al grupo control, previo al pico máximo observado a los 10 meses, a los 4 meses de tratamiento el grupo vehículo mostró un incremento del 25% respecto del control, mientras que a los 14, 16 y 18 meses mostró niveles por debajo del control correspondientes al 24.3%, 19.8% y 25%, respectivamente.



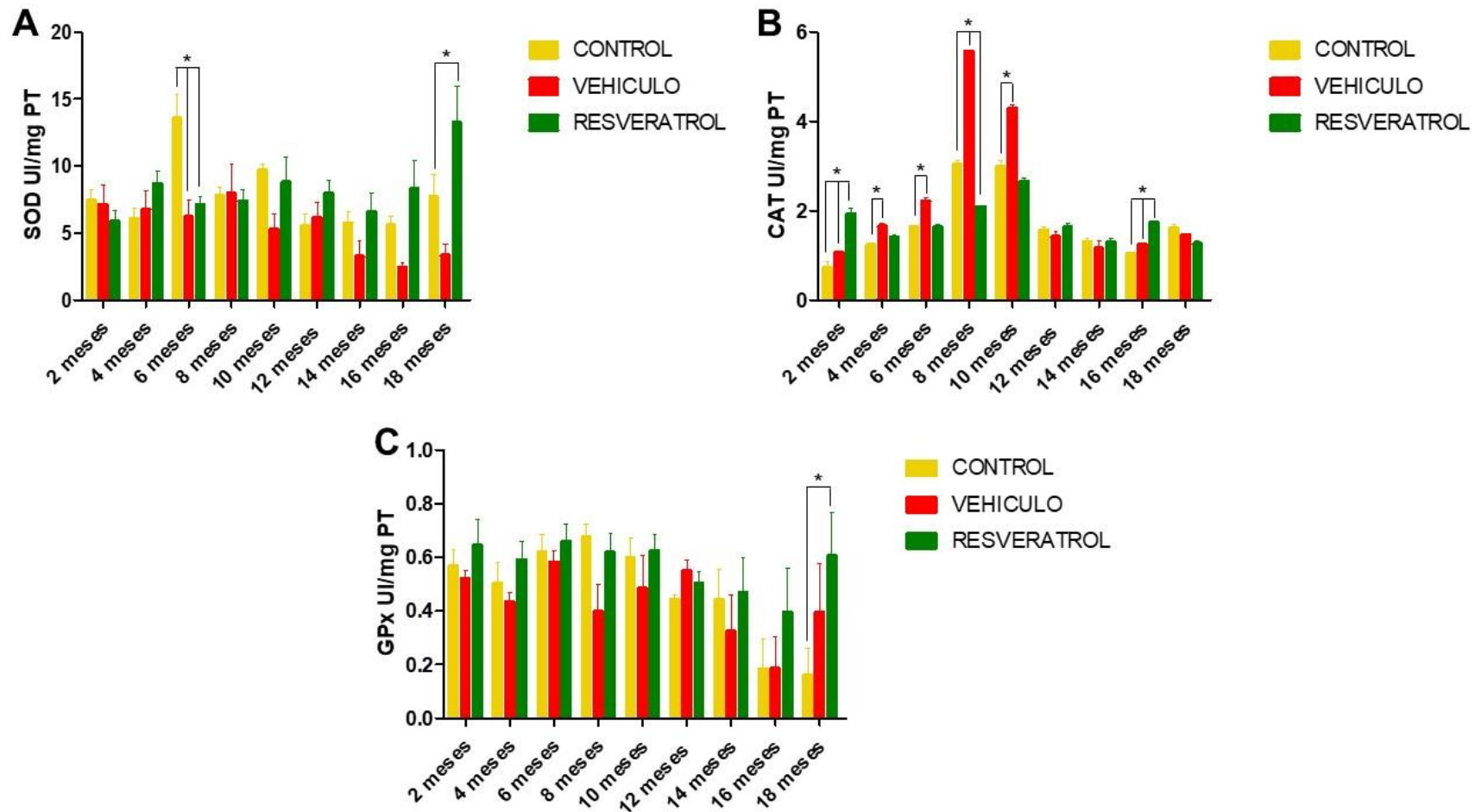
**Figura 7. Evaluación de moléculas pro-oxidantes en corteza prefrontal durante el envejecimiento. A) Cuantificación de nitritos; B) Lipoperoxidación; C) Malondialdehído; D) 4-Hidroxiálquenas. El resultado representa el promedio  $\pm$  EEM analizado por una prueba de ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet y una significancia de  $p < 0.05$  (\*).**

Por su parte, el grupo resveratrol demostró una tendencia inicial a incrementar los niveles de lipoperoxidación, registrando un aumento estadísticamente significativo a los 4 meses de tratamiento (43.4%), inclusive por encima del grupo vehículo. No obstante, posterior al pico observado a los 10 meses, la concentración disminuyó significativamente en los meses 14 y 16 de tratamiento en un 16.5% y 11.1% respectivamente.

Los metabolitos MDA y 4-HDA se cuantificaron y analizaron por separado. Los resultados de la cuantificación del MDA y 4-HDA se muestran en la figura 7C y 7D respectivamente, en las que se observa que, de manera fisiológicamente normal, el MDA se genera en mayor cantidad que el 4-HDA en los sujetos control. La mayor producción de cada metabolito se observó a los 10 meses de experimentación (13 meses de edad) en el grupo control.

El grupo vehículo reportó incrementos significativos de MDA y 4-HDA a los 4 y a los 8 meses de tratamiento, respectivamente; no obstante, las concentraciones de MDA presentaron disminuciones significativas a los 16 y a los 18 meses de tratamiento con respecto al control.

El grupo resveratrol incrementó sus concentraciones de MDA a los 14 meses de tratamiento y las disminuyó significativamente a los 16 y 18 meses. En este grupo, se observó que los niveles de 4-HDA disminuyeron significativamente a los 12 y 14 meses de tratamiento.



**Figura 8. Evaluación de la actividad de enzimas anti-oxidantes en corteza prefrontal durante el envejecimiento. A) Actividad de SOD; B) Actividad de CAT; C) Actividad de GPx. El resultado representa el promedio  $\pm$  EEM analizado por una prueba de ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet y una significancia de  $p < 0.05$  (\*).**

## **7.2 Evaluación de la actividad de enzimas anti-oxidantes en corteza prefrontal durante el envejecimiento.**

La actividad de las enzimas anti-oxidantes SOD, CAT y GPx se muestra en la figura 8. En la determinación de actividad de la enzima SOD (Figura 8A), el grupo control presentó variaciones que oscilaron entre las 5.5 y 13.5 UI/mg de proteína a lo largo del estudio. La menor actividad de esta enzima se observó entre los meses 12 y 16 de tratamiento.

El grupo vehículo, por su parte, presentó una clara disminución en la actividad de SOD a partir de los 8 meses de tratamiento. La actividad máxima de la enzima en este grupo fue de 7.94 UI/mg de proteína (registrada en el mes 8 de tratamiento), la cual disminuyó hasta un 63% al mes 16 de tratamiento; no obstante, al mes 6 de tratamiento se detectó una menor actividad que resultó ser estadísticamente significativa.

Por el contrario, el grupo resveratrol mostró niveles de actividad estables durante los primeros meses del estudio, los cuales incrementaron al final de este. Se observó al mes 6 de tratamiento un punto de menor actividad (47.6% con respecto al control) que resultó ser estadísticamente significativo. Asimismo, la mayor actividad se registró al mes 18 de tratamiento, que correspondió al 72.5%.

La actividad enzimática de catalasa se analizó en los tres grupos de intervención (Figura 8B), encontrándose que, en el grupo control, la actividad de esta enzima se incrementó con respecto al tiempo hasta los 10 meses de tratamiento (13 meses de edad), pasando de 0.74 UI/mg de proteína (2 meses) a 2.99 UI/mg de proteína (10 meses). Posteriormente, registró un decaimiento fisiológico de hasta 1.03 UI/mg de proteína, en el mes 16 de tratamiento.

La administración de alcohol como vehículo propició un incremento significativo de la actividad de la enzima desde el mes 2 hasta el mes 10 de tratamiento, que correspondió a 45.8%, 33.3%, 35.1%, 83.6% y 43.6%. Posterior al mes 10 de tratamiento, la actividad disminuyó drásticamente sin ser diferente al grupo control.

El grupo administrado con resveratrol mostró el mismo comportamiento que el control, observándose que la actividad de la catalasa fue estadísticamente mayor a los 2 y 16 meses de tratamiento en un 165.5% y 67.8%, respectivamente.

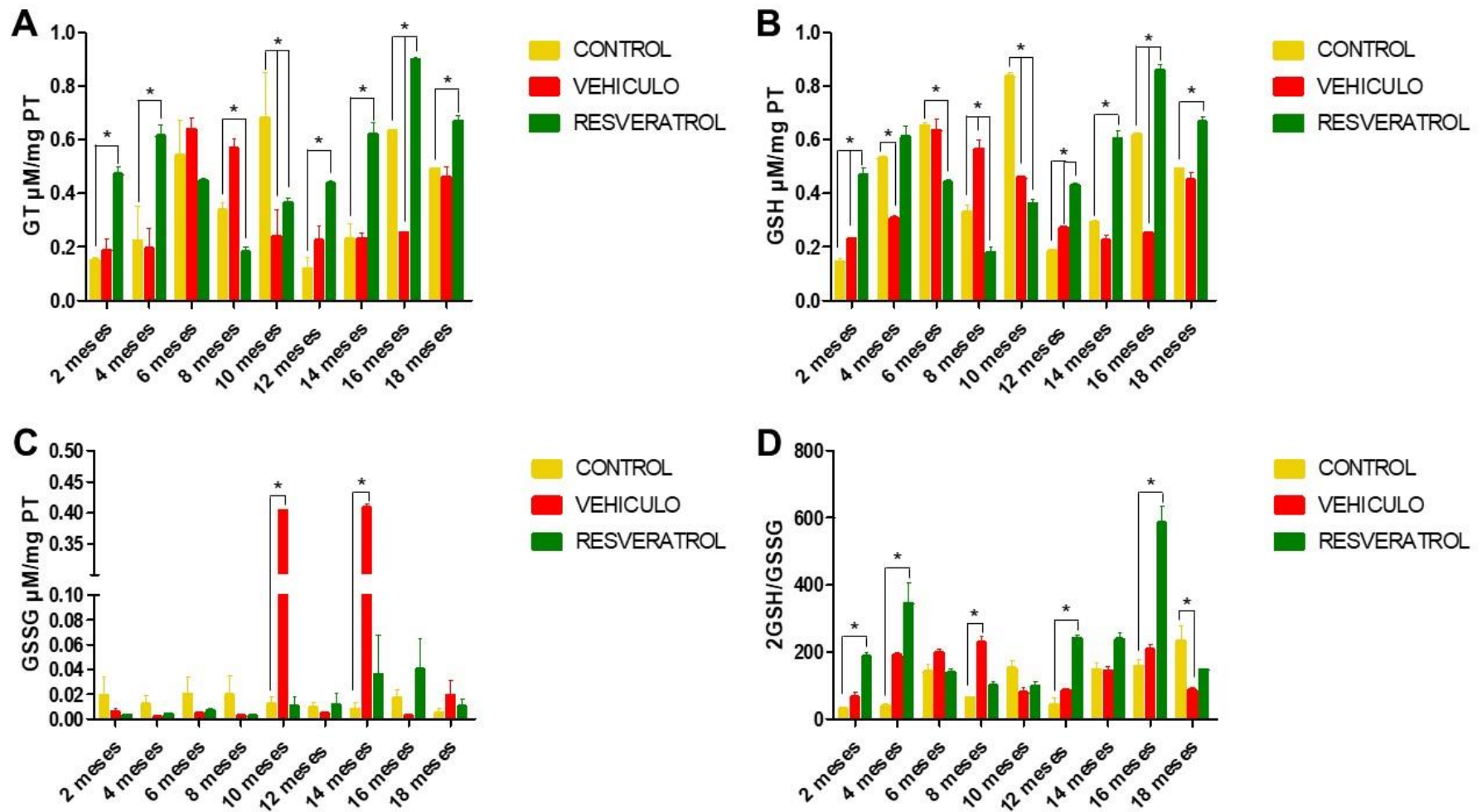
En el grupo control, el análisis de la actividad de la glutatión peroxidasa (Figura 8C) presentó un comportamiento estable (entre 0.5 y 0.67 UI/mg de proteína) hasta los 10 meses de tratamiento. Posteriormente la actividad decayó hasta 0.16 UI/mg de proteína a los 18 meses de tratamiento. Por su parte, el grupo vehículo mostró una menor actividad de la enzima hasta los 16 meses de tratamiento cuando se le comparó con el grupo control. La administración de resveratrol preservó la actividad de la enzima a lo largo del estudio y presentó al mes 18 de tratamiento una actividad significativamente incrementada del 278%.

### **7.3 Efecto del resveratrol sobre dinámica del glutatión durante el envejecimiento**

La cantidad de glutatión total en la corteza prefrontal fue cuantificada en cada tiempo cohorte en los grupos experimentales (Figura 9A). En el grupo control se observó que las concentraciones de glutatión total presentaron una importante variabilidad biológica, en la que la menor concentración se registró a los 2 y los 12 meses de tratamiento (0.15  $\mu\text{M}/\text{mg}$  y 0.11  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína, respectivamente); por otro lado, la concentración máxima se registró a los 10 meses (0.68  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína).

Dada la variabilidad observada en la dinámica de glutatión, el grupo tratado con el vehículo no presentó un comportamiento específico por la administración de alcohol y/o por el tiempo. Sin embargo, el análisis estadístico evidenció disminución significativa en los meses 10 y 16 de tratamiento, que correspondieron a un 65% y 60.4%, respectivamente.

Por su parte, el tratamiento con resveratrol presentó una mayor tendencia a incrementar la concentración total de este péptido antioxidante, en los meses de tratamiento 2 (213%), 4 (178%), 12 (271%), 14 (172%), 16 (42%) y 18 (36%).



**Figura 9. Evaluación de la dinámica del glutatión en corteza prefrontal durante el envejecimiento. A) Glutathión total; B) Glutathión reducido; C) Glutathión oxidado; D) Índice redox. El resultado representa el promedio  $\pm$  EEM analizado por una prueba de ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet y una significancia de  $p < 0.05$  (\*).**

A nivel celular, el glutatión total está comprendido por las fracciones reducidas y oxidadas. El glutatión reducido (GSH) está disponible como defensa celular, y fisiológicamente su contenido debe ser mayor que la especie oxidada (GSSG). En el presente trabajo se cuantificó la fracción de GSH en cada tiempo cohorte en los grupos experimentales (Figura 9B). El grupo control demostró contener fisiológicamente mayor cantidad de GSH en comparación con el GSSG. Los resultados evidenciaron una variabilidad a lo largo del periodo de intervención, observándose la mayor concentración a los 10 meses de tratamiento.

El grupo administrado con el vehículo presentó bajos niveles de GSH en comparación con el control que fueron estadísticamente significativos en los meses 4 (42.5%), 10 (45.3%) y 16 (59.5%) de tratamiento. Asimismo, se observaron incrementos estadísticamente significativos en los meses de tratamiento 2, 8 y 12, que correspondieron a 60%, 71% y 46.7%, respectivamente.

En los animales tratados con resveratrol, se observó una disminución estadísticamente significativa en los meses de tratamiento 6 (32.3%), 8 (46.4%) y 10 (56.8%); por otro lado, los niveles se vieron incrementados en los meses 2 (227%), 12 (132%), 14 (107%), 16 (38.9%) y 18 (35.7%) de tratamiento.

El comportamiento del GSSG se cuantificó en los tres grupos problema (Figura 9C). La concentración de GSSG durante el envejecimiento se mantuvo fisiológicamente cercana a 0.02  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína en el grupo control. El grupo tratado con el vehículo registró concentraciones menores al control durante los periodos analizados con excepción de los meses 10 y 14 de experimentación, en donde los niveles incrementaron súbitamente 35 veces. Por su parte, el grupo tratado con resveratrol presentó hasta los 8 meses concentraciones por debajo del control, a los 10, 12 y 18 meses reportó concentraciones similares al control y a los 16 y 18 meses de tratamiento se obtuvieron valores por encima de lo observado en el grupo control, sin que se presentaran diferencias estadísticamente significativas.

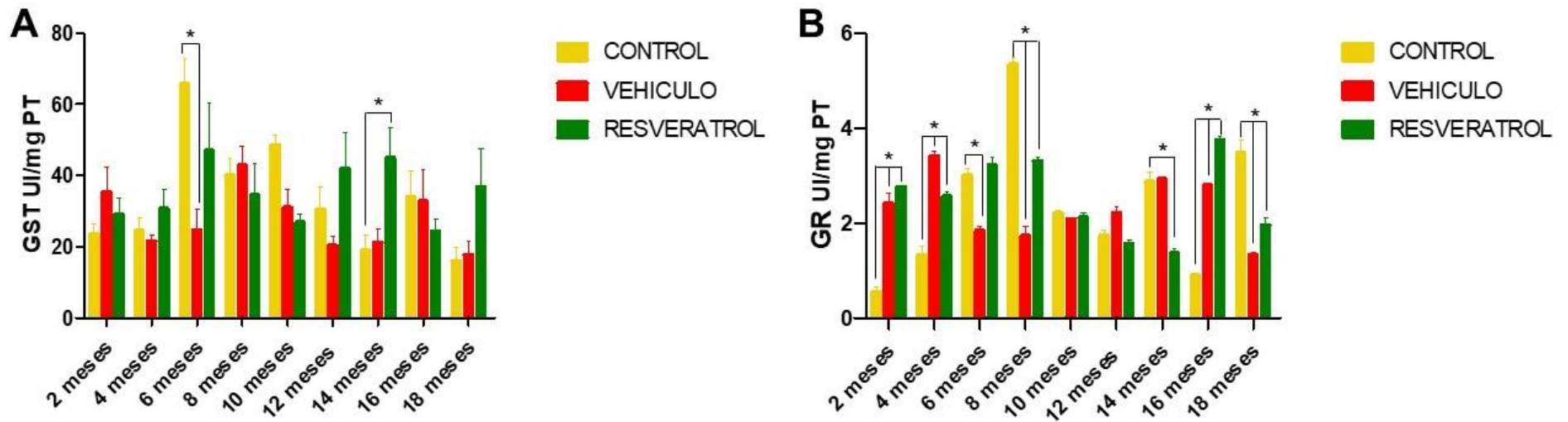
Adicionalmente, se analizó el índice redox (2GSH/GSSG), el cual es indicativo del ambiente celular en condiciones antioxidantes o prooxidantes. Los resultados mostraron que el grupo control, aunque presentó a lo largo del estudio



un ambiente antioxidante, presentó una mayor protección de los 14 a los 18 meses de evaluación.

El grupo vehículo, por el contrario, mostró tener un ambiente redox favorable en los primeros 8 meses de tratamiento, en donde se observó un incremento de hasta 265% respecto del control. Sin embargo, posterior al mes 8 de tratamiento disminuyó escalonadamente hasta que en el mes 18 de experimentación fue significativamente diferente al control (63.5%).

El grupo tratado con resveratrol mostró un ambiente redox favorable durante todo el estudio, presentando incrementos estadísticamente significativos al mes 2 (533%), 4 (818%), 12 (473%) y 16 (274%) de tratamiento (Fig. 9D).



**Figura 10. Evaluación de la actividad de las enzimas del glutatión en corteza prefrontal durante el envejecimiento. A) Glutatión S-transferasa; B) Glutatión reductasa. El resultado representa el promedio  $\pm$  EEM analizado por una prueba de ANOVA de una vía con un post hoc de Dunnet y una significancia de  $p < 0.05$  (\*).**

#### **7.4 Efecto del resveratrol sobre la actividad de las enzimas del glutatión durante el envejecimiento**

La actividad de las enzimas de reciclaje y transferencia asociadas al glutatión se observan en la figura 10. El grupo control mostró una dinámica interesante en la actividad de GST en la corteza prefrontal (Figura 10A), la cual correspondió en su punto más bajo a 16 UI/mg de proteína, registrado al mes 18 de tratamiento; por otro lado, su mayor actividad se observó en el mes 6 de tratamiento (65.7 UI/mg de proteína). La actividad mostró concordancia con la dinámica del ambiente redox de esta región cerebral.

El grupo vehículo también observó dicha variabilidad y correspondencia con relación a la capacidad antioxidante de la región cerebral, aunque el análisis estadístico demostró una disminución significativa al mes 6 de tratamiento que correspondió a 62.5%. El grupo administrado con resveratrol presentó una actividad de GST mayor que el grupo control, con un incremento estadísticamente significativo en el mes 14 de tratamiento, correspondiente al 138.5% (Fig. 10A).

La actividad de la glutatión reductasa se observa en la figura 10B. El grupo control registró una actividad creciente en los primeros 8 meses de experimentación, pasando de una actividad de 0.53 UI/mg de proteína a 5.3 UI/mg de proteína, presentando posteriormente una caída que se estabilizó entre 1.7 y 2.8 UI/mg de proteína hasta los 14 meses; posteriormente, se observó una nueva reducción a los 16 meses (0.9 UI/mg de proteína) y una compensación final que alcanzó los 3.4 UI/mg de proteína.

En comparación, el grupo vehículo mantuvo un comportamiento más estable de la actividad de GR a lo largo del tratamiento. Sin embargo, se observó una mayor actividad estadísticamente significativa en los meses de tratamiento 2 (354%), 4 (157.5%) y 16 (210%); y una disminución significativa en los meses 6 (38.9%), 8 (67.6%) y 18 (61.8%) de análisis.

La actividad de GR en el grupo administrado con resveratrol mostró incrementos estadísticamente significativos en la actividad de la enzima en los

mismos meses de tratamiento que el vehículo, es decir en el mes 2 (420%), 4 (93.5%) y 16 (316%) de administración; y una disminución significativa en los meses 8 (38.2%), 14 (52.5%) y 18 (43.8%) de análisis, este último coincidió con lo mostrado por la administración del vehículo.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la administración de resveratrol sobre el balance redox de la corteza prefrontal durante el proceso de envejecimiento en ratas macho de la cepa Wistar.

De acuerdo con Marsman *et al.*, la manifestación de los cambios moleculares en el envejecimiento (inestabilidad genómica y variaciones epigenéticas), que posteriormente derivan en una disminución de las funciones celulares (como la comunicación intercelular y la actividad de organelos), modifican la actividad fisiológica normal, dando lugar a alteraciones del metabolismo energético, de la composición corporal y, particularmente, de la función neural (80).

*Análisis del balance redox en la corteza prefrontal durante el proceso de envejecimiento.*

Los resultados se discuten a continuación mediante el análisis del envejecimiento observado en el grupo control, el grupo vehículo y resveratrol, respectivamente.

### **a) Envejecimiento fisiológicamente normal.**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el grupo control (Figura 7A), no existen variaciones importantes en los niveles reportados de •NO hasta los 19 meses de edad, donde se presenta una compensación significativa. La evidencia sugiere que los niveles de •NO generados de forma fisiológica por las isoformas constitutivas nNOS y eNOS son considerados “bajos” cuando se ubican en un rango entre 0.2 a 2.0 nM, esto dependiendo del tejido (81).

A pesar de su importante papel en la regulación fisiológica normal del sistema nervioso, el •NO puede ser neurotóxico cuando está presente en cantidades excesivas (82, 83, 84). En este sentido, diversos estudios han propuesto que el •NO aumenta en el cerebro envejecido y que la isoforma iNOS, que es independiente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina y se produce en respuesta a estímulos patológicos, es responsable de este aumento de •NO. Sin embargo, los resultados de otros estudios que investigan los cambios de iNOS en el cerebro envejecido son menos consistentes y han proporcionado evidencia de la contribución de las dos isoformas

constitutivas de NOS dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, nNOS y eNOS, que participan activamente en el proceso de envejecimiento (84, 85, 86).

En concordancia con los hallazgos encontrados en este estudio, existe evidencia de que, particularmente en la CPF de rata, la isoforma iNOS presenta una baja expresión, siendo la nNOS la isoforma encargada de mantener la producción de  $\bullet\text{NO}$ , seguida de la isoforma eNOS (87). De esta forma, los resultados sugieren que los niveles de  $\bullet\text{NO}$  podrían corresponder a las actividades de las isoformas de la nNOS y eNOS, observándose un pico máximo alcanzado a los 21 meses de edad, en la finalización del tratamiento.

El  $\bullet\text{NO}$  se produce normalmente en el soma de las neuronas postsinápticas (10–100  $\mu\text{m}$ ) mediante la activación de los receptores NMDA, y puede modular la actividad de las terminales presinápticas. De esta manera, el campo de acción del  $\bullet\text{NO}$  incluye múltiples objetivos celulares y subcelulares, sin pasar por la conectividad anatómica (88, 89, 90).

Tomando en cuenta la facilidad del  $\bullet\text{NO}$  para difundir y cruzar fácilmente la membrana celular, se asume que este compuesto puede difundirse más allá del confinamiento de una sola sinapsis y actuar como una molécula de señalización por volumen; el  $\bullet\text{NO}$  puede viajar en cualquier dirección de acuerdo con el gradiente de concentración, sin mostrar diferencia entre un cerebro adulto y uno envejecido (91, 92). Por otro lado, estudios reportan que los niveles de  $\bullet\text{NO}$  están determinados tanto por la dinámica de producción como de degradación, siendo que la degradación es inversamente proporcional a la oxigenación tisular (93).

Estas cualidades pueden asociarse a lo observado en los resultados de acuerdo con la edad del biomodelo, donde la difusión y la tasa de degradación se vinculan al mantenimiento de los niveles de  $\bullet\text{NO}$  a lo largo del tiempo.

El  $\bullet\text{NO}$  está involucrado en la regulación de múltiples aspectos de la respiración mitocondrial/fosforilación oxidativa, como ha sido recientemente reportado (94). En este organelo, el  $\bullet\text{NO}$  interactúa de manera irreversible con la citocromo c oxidasa (CcO), el complejo terminal de la cadena respiratoria

mitocondrial responsable de aproximadamente el 90 % del consumo de  $O_2$  en células de mamíferos, al catalizar la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$  (95). Los efectos pueden extenderse no solo a otros complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, sino también a la modulación de la captación de glucosa por neuronas y astrocitos, y de la tasa de glucólisis en estos últimos (96).

Por otro lado, en estas condiciones experimentales no se puede excluir la producción de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). La regulación de su producción recae sobre el balance en la actividad de las isoformas de NOS y de la actividad de las isoformas de SOD, mientras que la susceptibilidad de las células cerebrales a la exposición al  $ONOO^-$  está en relación directa con la respuesta antioxidante dependiente de los niveles de GSH (97) (presente en concentraciones mM en las células neurales) y que es eliminado rápidamente por las peroxirredoxinas, lo que disminuye la probabilidad de inhibición del  $ONOO^-$  de los complejos mitocondriales. El  $ONOO^-$  reacciona con tioles proteicos y no proteicos, residuos de tirosina, ácidos grasos y ácidos nucleicos; particularmente con ácidos grasos estabiliza reacciones de lipoperoxidación (98).

Los resultados registrados en el grupo control (Figura 7B-D) sobre los niveles de lipoperoxidación generados mostraron un incremento progresivo hasta los 13 meses de edad, donde se alcanzó el pico máximo y posteriormente registró un descenso constante hacia el final del tratamiento.

A este respecto, dos características de los lípidos de la membrana determinan su vulnerabilidad al daño lipooxidativo: las propiedades físico-químicas de la bicapa de la membrana y la reactividad química de los ácidos grasos que la componen (99, 100). La primera propiedad se basa en la solubilidad preferencial de las especies reactivas (por ejemplo, los RL) en la bicapa lipídica fluida en lugar de en la solución acuosa (101, 102). La segunda y más relevante propiedad está relacionada con el hecho de que los residuos de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) de los lípidos, y particularmente del los glicerofosfolípidos (Gpl), son muy sensibles a la oxidación, y esta sensibilidad aumenta en función del número de dobles enlaces por molécula de ácido graso (103, 104, 105).

Bajo ese concepto, las cadenas laterales de PUFA (con dos o más dobles enlaces) se dañan mucho más fácilmente por las especies reactivas que las de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), que poseen un doble enlace; por su parte, los ácidos grasos saturados (SFA) cuya estructura no contiene dobles enlaces son resistentes a la peroxidación.

El cerebro humano adulto contiene una gran cantidad y diversidad de clases especies moleculares de lípidos. Por lo tanto posee, además de la presencia de diversas clases de fosfolípidos, algunos esfingolípidos y una gran reserva de colesterol y metabolitos de colesterol (106). En concreto, los Gpl representan alrededor del 4.5 – 5.4 % del peso húmedo (4.2 % en la sustancia gris y 7 % en la blanca).

Estudios recientes han utilizado un enfoque lipidómico para analizar el perfil de lípidos de la materia gris del cerebro humano a nivel mitocondrial y microsomal en tres regiones diferentes de la corteza cerebral humana: corteza entorrinal (EC), hipocampo (HP) y corteza prefrontal (CPF), a lo que se le ha denominado lipidoma cerebral (107, 108, 109). Los resultados muestran que, independientemente de la fracción subcelular y la región del cerebro, las tres clases principales de fosfolípidos son, en este orden: ChoGpl (glicerofosfolípidos de colina), EtnGpl (glicerofosfolípidos de etanolamina) y SerGpl (glicerofosfolípidos de serina). Los principales ácidos grasos de los ChoGpl son los SFA y los MUFA.

Es de destacar que el MUFA 18:1n-9 (ácido oleico) es el más abundante en el cerebro, mientras que 22:6n-3 (ácido docosahexaenoico o DHA) y 20:4n-6 (ácido araquidónico o AA) son los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) más abundantes en todas las regiones. El hallazgo de que el DHA (22:6n-3) es el principal PUFA presente en las regiones del cerebro está en consonancia con los hallazgos que señalan el nivel muy alto de DHA en todo el cerebro (106, 110).

A este respecto, se ha descrito que cuanto mayor es la presencia de MUFA en una región determinada, menor es el contenido de PUFA. Para las diferencias interregionales específicas en el cerebro del contenido de DHA (22:6n-3), es relevante mencionar que estas diferencias se deben a variaciones en la actividad



de desaturasa y  $\beta$ -oxidación peroxisomal, enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de PUFA. Esta actividad se puede atribuir específicamente a las neuronas (110). En consecuencia, la expresión de proteínas vinculada a la biosíntesis de PUFA respalda las diferencias interregionales en los perfiles de ácidos grasos y sugiere la posibilidad de que las neuronas puedan mantener activamente su propio perfil de composición.

De lo anterior se puede establecer que cada región cerebral sería capaz de determinar su susceptibilidad relativa al daño peroxidativo en base al grado de insaturación de los ácidos grasos, estableciendo así el concepto de índice de peroxidabilidad (IP). En algunos estudios, al realizar una comparación de los datos de IP disponibles de 12 regiones cerebrales diferentes, se observó que mientras más craneal es la región, mayores son los valores de IP, por lo que el mayor puntaje fue obtenido por la corteza prefrontal; no obstante, se presume que el valor de IP es inversamente proporcional al grado de daño molecular registrado, esto debido a una mejor respuesta adaptativa mediada por la vía Nrf2 (111).

Las variaciones de los productos de lipoperoxidación de la CPF observadas en los resultados pueden asociarse a las diferencias de susceptibilidad de esta zona cortical en comparación con otras regiones cerebrales, sugiriendo una mayor estabilidad de la CPF ante el daño membranal.

Siguiendo la misma premisa, durante el proceso de envejecimiento fisiológico cerebral, así como en ciertas enfermedades neurodegenerativas, se ha observado que existen una serie de cambios sobre la composición de los lípidos membrana de las células nerviosas. Los esteroides, los Gpl y los gangliósidos han sido los lípidos más estudiados con respecto a sus variaciones en el tejido cerebral (112).

Pese a los mecanismos adaptativos que se ponen en marcha para su conservación óptima, los cambios en la composición de la membrana celular de las neuronas pueden tener un impacto directo sobre las funciones cognitivas (113). Los resultados encontrados al respecto son diversos. En la corteza frontal, el lipidoma completo de ratas envejecidas ha mostrado ciertas diferencias con respecto a grupos de ratas más jóvenes. Sin embargo, los cambios en el perfil de ácidos grasos

son limitados. Se observó en el grupo envejecido, además, una disminución del marcador de lipoperoxidación MDA, de glucooxidación (carboximetil-lisina) y de estrés mitocondrial (2-S-(2-succino) cisteína), en comparación con las ratas adultas (112).

En la corteza dorsolateral humana envejecida se ha visto un incremento de fosfolípidos con DHA y un descenso de aquellos que contenían AA o ácido aráquico (107). De igual manera, durante la examinación de las balsas lipídicas neuronales, el envejecimiento afecta principalmente, además de otros lípidos neutros y polares, a los ácidos DHA y AA. Estas premisas sugieren que el pico máximo de lipoperoxidación (MDA y 4-HDA) alcanzado a los 13 meses de edad, así como su posterior descenso, responde a una posible reestructuración del perfil de ácidos grasos de membrana en la corteza prefrontal, como consecuencia del envejecimiento.

Varios mecanismos de defensa antioxidantes han evolucionado para proteger los componentes celulares del ataque del estrés y el daño oxidativo asociado. La hipótesis de que la esperanza de vida se puede mejorar aumentando las defensas antioxidantes ha sido controvertida debido a los resultados contradictorios en varios modelos de envejecimiento. Muchos estudios han demostrado que los niveles endógenos de enzimas antioxidantes en el cerebro y otros tejidos no disminuyen durante el envejecimiento (114, 115). Además, los estudios en mamíferos en los que se aumentan experimentalmente los niveles de antioxidantes han demostrado que la longevidad máxima no se ve afectada (116, 117).

Los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antioxidante (Figura 8) muestran que, en el grupo control, la actividad de SOD es constante en la rata adulta macho que sufre la transición al envejecimiento, sin que existan cambios drásticos en este parámetro; no obstante, se destaca que los mayores niveles registrados de actividad fueron a los 9 meses de edad de los animales.

Por otro lado, el comportamiento observado de la actividad de CAT en la CPF en relación con el envejecimiento fue creciente desde la edad de 5 meses. Las ratas

adultas alcanzaron un máximo de actividad entre los 11 y los 13 meses de edad, y posterior a esta edad se observó un decremento tiempo-dependiente de la actividad de esta enzima.

El mismo comportamiento fue observado en la actividad de la GPx, en la que fisiológicamente se registró un decremento tiempo-dependiente. En este sentido, los resultados indican que en la CPF es un sitio potencial para la acumulación de  $H_2O_2$  al envejecer y, por ende, de la generación de estrés oxidante que podría asociarse al daño celular y la decaída del funcionamiento de esta región cerebral (118).

Al respecto se ha descrito que la actividad de enzimas antioxidantes es variable con relación a la zona cerebral en estudio (119). Tras la reacción de neutralización del anión superóxido llevada a cabo por la SOD, que resulta en la generación de  $H_2O_2$  (especie reactiva estable), estudios realizados por Nisticó et al., en los que se evaluó la actividad de SOD, CAT y GPx en rata macho de 3, 12 y 24 meses de edad, se pudo observar un comportamiento muy similar a los obtenidos en este estudio, en los que la actividad de SOD presenta ligeras variaciones a través del tiempo pero con un mantenimiento de la misma, mientras que la actividad de CAT y GPx disminuyen de manera tiempo-dependiente, observándose en la CPF la actividad más baja a los 24 meses (120).

Por lo tanto, los autores sugieren que este comportamiento enzimático es responsable al menos en parte a la vulnerabilidad de esta región cerebral. En este mismo sentido, Semsei et al., reportaron en rata Fisher F344 un decremento gradual de la actividad de SOD y CAT, que en paralelo correspondió a los niveles de RNAm de ambas enzimas, indicando que existe una relación inversa entre la edad y la expresión de los genes que codifican para estas enzimas (121).

En conjunto, los datos obtenidos en este estudio sugieren que los procesos neurodegenerativos relacionados con la edad podrían deberse a la acumulación de  $H_2O_2$  en algunas áreas del cerebro, como lo indican los niveles normales de SOD y la disminución significativa concomitante en la actividad de CAT y GPx. Sin embargo, considerando otros datos presentes en el análisis del biomodelo y en la

literatura, existe evidencia de que, además del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, otros RL podrían desempeñar un papel en la fisiopatología de la neurodegeneración (122).

En humanos también se ha investigado la actividad de estas enzimas a nivel cerebral en dependencia de la edad, encontrándose que, aunque SOD presenta variación en su actividad en la CPF desde estados neonatales hasta la senectud, esta se mantiene de manera lineal a lo largo de la vida. Sin embargo, la actividad de la CAT aumenta de manera dependiente de la edad en esta misma región (123).

Por su parte, Lovell et al., demostraron actividades elevadas de SOD, CAT y GPx en CPF de pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con los controles (124). Las actividades antioxidantes fueron significativamente más altas en aquellas regiones que mostraron una mayor peroxidación de lípidos, lo que indica un aumento compensatorio en la actividad antioxidante en respuesta al aumento del estrés oxidativo (125). Por el contrario, Padurariu et al., informaron una disminución significativa en las actividades de SOD y GPx en el suero de pacientes con enfermedad de Alzheimer (126).

Además de la defensa enzimática, el mantenimiento del equilibrio redox del cerebro se asocia también a la actividad antioxidante del glutati6n (127). Los niveles descritos de esta molécula (Figura 9) presentaron fluctuaciones a lo largo de todo el periodo de tratamiento para el grupo control.

Se han informado niveles de GSH por debajo de lo normal en autopsias cerebrales de pacientes con algunos trastornos neurodegenerativos y se ha sugerido que una disminución de GSH relacionada con la edad en el humano podría contribuir a muchas de las enfermedades relacionadas con la edad, tales como disminución de la función celular, así como una mayor susceptibilidad a diversas agresiones (128, 129, 130, 131, 132).

No obstante, la piedra angular de la hipótesis de la "deficiencia de GSH" del envejecimiento cerebral son las observaciones preclínicas de niveles reducidos de GSH en los 6rganos perif6ricos y el cerebro de animales senescentes en comparación con animales maduros (133, 134, 135, 136). Sin embargo, en la

literatura preclínica se enfatiza la falta de consenso en los informes sobre los cambios relacionados con el envejecimiento y el desarrollo en los niveles cerebrales de GSH, a veces incluso en la misma cepa, sexo y las regiones cerebrales examinadas. También hay poca información sobre los cambios en los niveles de GSH en el envejecimiento del cerebro humano, de sujetos ancianos versus sujetos jóvenes (137, 123).

De lo descrito en la literatura, se conoce que el contenido cerebral de GSH total oscila entre los 0.5 a 3.4  $\mu\text{mol/g}$  de tejido (138). En el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, la concentración más alta de GSH se encuentra en las células gliales de la corteza cerebral (139). La mayor parte del glutati6n (97%) en el cerebro est1 en su forma reducida.

La interacci6n metab6lica entre las neuronas y los astrocitos es fundamental para la sntesis de glutati6n. Un experimento *in vitro* realizado en neuronas y astrocitos cocultivados mostr6 que los niveles de GSH en las neuronas aumentan en presencia de astrocitos, muy probablemente debido a la transferencia de un precursor de cisteína de los astrocitos a las neuronas, lo que regula al alza la sntesis de GSH en las neuronas receptoras (140).

Varios trastornos neurodegenerativos se caracterizan por el agotamiento del GSH celular, probablemente debido a que contrarresta el estr6s oxidativo y el desequilibrio de los iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (141). Existe una marcada heterogeneidad en la distribuci6n celular de GSH en las neuronas del SNC, debido muy probablemente a su actividad específica y su bioenergética dada por contenido mitocondrial. De esta manera, aproximadamente del 10 al 20 % del GSH est1 contenido en las mitocondrias de las células neurales debido a su predisponente generaci6n de ROS y RNS(142), estableciendo que este organelo contiene m1s GSH que cualquier otro compartimento celular, pese no contener las enzimas necesarias para su biosntesis (143), recurriendo a la importaci6n del GSH del citosol utilizando sistemas específicos de transporte (144).

En concentraciones bajas, el GSH es neuroprotector, pero en concentraciones altas (milimolares; mM), el GSH puede afectar el estado redox de

los receptores de glutamato a través de su grupo tiol libre. Al igual que la glicina libre, el residuo de glicina en GSH sirve como coagonista del receptor de NMDA (145, 146). Las alteraciones en la función del receptor NMDA pueden alterar la cascada de señalización del calcio y afectar la plasticidad sináptica, lo que lleva a cambios fisiopatológicos en el SNC (147, 148, 149, 150).

Los resultados de este estudio mostraron que la concentración de glutatión total (Figura 9) en el grupo control fluctuó entre 0.11 – 0.68  $\mu\text{M/g}$  de proteína, correspondiendo a los niveles más bajos la edad de 5 y 15 meses, mientras que la mayor concentración se registró a la edad de 13 y 19 meses. De los niveles registrados, y en concordancia con lo reportado bibliográficamente, la especie GSH fue la de mayor concentración en la CPF, siendo del 90 al 98% de la cuantificación total respecto de la especie oxidada (GSSG), la cual registró máximos de 0.02  $\mu\text{M/g}$  de proteína en edades adultas. Adicionalmente, el análisis del índice redox demostró que, a mayor edad, el ambiente de la CPF se encuentra antioxidado de manera fisiológicamente normal, evidenciando una posible prevención del deterioro acelerado neuronal asociado a la edad.

Se ha reportado en diversos estudios que, en ratas, los niveles de GSH en el cerebro aumentan aproximadamente un 20% durante el primer año de vida, y luego disminuyen (151), resultados que difieren a los encontrados en este estudio. Aunque muchas condiciones están asociadas con niveles bajos de GSH (enfermedad de Alzheimer, autismo, Parkinson, esclerosis múltiple y esquizofrenia, entre otros), durante el envejecimiento de la CPF parece no ser el caso. El estudio en cerebro de humanos llevado a cabo por Venkateshappa et al., demuestra que en la CPF los niveles de glutatión total, a pesar de presentar una tendencia a disminuir desde edades pediátricas a geriátricas, esta no es significativa estadísticamente, dato evidenciado cuando se analizaron las proporciones de GSH y GSSG, las cuales se mantienen a lo largo de la vida en esta región cerebral (123).

Tong et al. observó también en necropsias cerebrales de humanos que tanto en la corteza frontal, occipital y cerebelar existen conductas similares (152). Se ha discutido que la diferente tasa de cambios regionales de GSH desde la infancia

hasta la adolescencia y la edad adulta posiblemente podría implicar muchos procesos de desarrollo y maduración cerebral, incluidos la neurogénesis, la gliogénesis, la apoptosis, la mielinización, la sinaptogénesis y la poda sináptica (153). Esto se pone en evidencia durante la observación de la disminución de los niveles de GSH en el prosencéfalo durante el desarrollo cerebral posnatal, que podría estar asociada con un papel importante de la señalización antioxidante y redox en el cambio de la proliferación celular a la diferenciación (154).

Bajo la misma línea de discusión, dado que el GSH parece ser ligeramente predominante en la glía frente a las neuronas, los niveles crecientes de GSH con el envejecimiento adulto en algunas regiones del cerebro podrían estar asociados con un aumento de la gliosis con el envejecimiento del cerebro humano (155, 156).

No obstante, existen estudios en los que se presentan enfermedades neurodegenerativas se ha demostrado tanto en humanos como en modelos animales el decaimiento de la concentración de GSH. Bermejo et al., demostraron una disminución de los niveles de GSH y de la relación GSH/GSSG en pacientes con enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo leve en comparación con los controles (157). En otro estudio relacionado, Mandal et al., informaron sobre la detección *in vivo* de GSH mediante imágenes no invasivas en diferentes regiones neuroanatómicas del cerebro de sujetos sanos y pacientes con deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer (158). Los hallazgos anteriores indican que, los cerebros jóvenes sanos presentan un mayor contenido de GSH y un patrón de distribución de GSH específico.

A este respecto se observó que el contenido medio y la distribución de GSH variaron entre sujetos sanos masculinos y femeninos al comparar la corteza frontal izquierda (LFC) y la corteza frontal derecha (RFC). En el caso de un alto contenido de GSH en la corteza parietal izquierda de un hombre joven, la región LFC también mostró un alto contenido de GSH y viceversa. La diferencia en el contenido total de GSH entre el control femenino joven sano y los pacientes femeninos con enfermedad de Alzheimer en la RFC y la diferencia en el contenido de GSH entre el control masculino joven sano y los pacientes masculinos con enfermedad de

Alzheimer en la región LFC fue estadísticamente significativa. Estos datos indican que la distribución de antioxidantes en el cerebro humano está asociada con el género, la edad, la condición de la enfermedad y el área anatómica (123).

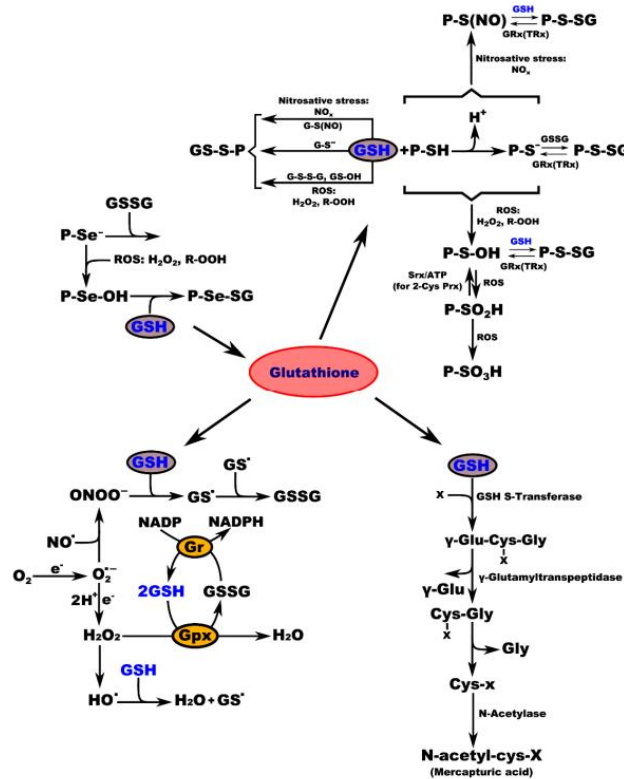
Asimismo, la hipótesis de la "deficiencia de GSH" del envejecimiento del cerebro ha sido respaldada por diversos informes experimentales que muestran niveles reducidos de GSH en el cerebro de animales viejos en comparación con animales jóvenes o maduros, incluidos ratones y ratas (159-165). Se sugirió que los hallazgos negativos posiblemente estén relacionados con que los ancianos no se examinaron en la verdadera etapa de senescencia (166), a pesar de que muchos de los informes contradictorios utilizaron la misma variedad de animales en el mismo rango de edad (p. ej., en ratas Wistar macho) (163, 165).

Estudios recientes sugieren que los cambios en los niveles de GSH cerebral durante el envejecimiento pueden ser específicos de la especie, raza y género y la región. Sin embargo, en las ratas LOU resistentes a la senescencia, la pérdida de GSH cerebral por envejecimiento se encontró solo en ratas hembra pero no en ratas macho, con el cuerpo estriado y el hipocampo más vulnerables (167). Aunque estudios previos en otras cepas de ratas (por ejemplo, Sprague-Dawley) no reportó diferencias de género (168), un estudio de ratones C57BL/6 mostró que los machos eran más susceptibles a la disminución del contenido de GSH cerebral asociado con el envejecimiento que las hembras (169). Por su parte, Benuck et al., mostró que en rata macho Sprague-Dawley se presenta una disminución relacionada con la edad en los niveles de GSH, limitada a la corteza cerebral (170).

La defensa de la CPF contra las ROS y RNS se basa en gran parte en la oxidación enzimática de GSH a GSSG, donde participan activamente tanto la GPx como la GST, con relación a ROS/RNS y moléculas/metales tóxicos, respectivamente (144, 162). Los resultados de este estudio mostraron que la actividad de la GST (Figura 10) en el control fue creciente desde la edad de 5 meses hasta los 9 meses, manteniéndose en un nivel constante hasta los 13 meses de edad de los animales, y posteriormente muestra una tendencia decreciente en su actividad. Por su parte, la actividad de la GR fue creciente desde el quinto mes de



edad hasta los 13 meses y posteriormente, registrando altas y bajas durante este último periodo.



**Figura 11.** Mecanismo celular de la actividad de glutatión y sus enzimas. [Tomada y modificada de Iskusnykh et al., 2022] (171).

La familia de GST consta de al menos ocho isoformas y 16 subunidades que se encuentran en el citosol, las mitocondrias o los microsomas. Las GST citosólicas se han asignado a siete clases principales: Alfa, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta y Zeta (172, 173). En el cerebro, las isoenzimas Alfa, Mu y Pi muestran altos niveles de expresión. 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 (174, 175).

Al respecto de la desintoxicación de lípidos peroxidados y proteínas oxidadas por parte de la GST (176), Kim et al., reportó que la actividad de esta enzima aumentó 1.7 veces en los cerebros de ratas adultas de 9 meses en comparación con los de ratas jóvenes de 5 semanas (177). Asimismo, Zhu et al., reportó que la

actividad de GST aumentó significativamente en todas las regiones del cerebro examinadas en ratas macho o hembra de edad avanzada (168). Al igual que la elevación de la actividad de GPx, se supone que GST responde al envejecimiento como un mecanismo de adaptación secundario al aumento del estrés oxidativo.

El análisis de micromatrices de ADN de la CPF post mortem en humanos de pacientes con desorden bipolar reveló que la expresión de ARNm que codifica para las isoformas de la enzima GST disminuye con relación a la edad, particularmente del ARNm de GST Pi en la corteza prefrontal (178). Por otro lado, otros datos sugieren que GST Mu puede ser otra isoforma de mayor alteración en la CPF, ya que sus niveles se han visto reducidos en distintos trastornos neurodegenerativos (desorden depresivo mayor, esquizofrenia, desorden bipolar), con recuperación observada al administrar un tratamiento (179). En estudios asociados al envejecimiento en humanos no se han observado cambios en la actividad de GST en la CPF en edades pediátricas, juveniles, adultas o en senectud (123).

Finalmente, la GR se encuentra en citoplasma en mayor concentración, y en la mayoría de los organelos celulares en bajas concentraciones e incluso en fluidos extracelulares, y debe trasladarse a través de las membranas de los orgánulos desde el citosol (180, 181, 144). La actividad de GR en cerebro de rata es alta, particularmente en el cerebro de animales mayores, en regiones que contienen un alto nivel de dopamina que no está secuestrada en las vesículas sinápticas, lo que promueve una mayor rotación de dopamina que produce radicales HO• y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Durante el envejecimiento, este recambio se vuelve más prominente, lo que agota más GSH para provocar un mayor aumento de GSSG, estimulando así un aumento de la actividad de GR para eliminar el exceso de GSSG (182).

No está claro si el aumento en la actividad de GR recíprocamente regula a la baja la actividad de la sintasa de glutatión (GCS) en la síntesis de GSH *de novo*. Al ser el GSH un producto tanto de la síntesis *de novo* como del ciclo redox del glutatión, funge como 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 (183). 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. Sin embargo, en animales grupo de edad avanzada, este no parece ser el caso ya que GSH, como inhibidor de la actividad de GCS, se reduce significativamente independientemente de un aumento en la actividad de GR. Esto parece respaldar la opinión de que la actividad de GCS se ve afectada de forma independiente por el proceso de envejecimiento.

En estudios en los que se evalúan mecanismos metabólicos que subyacen a la formación de recuerdos episódicos de la vida temprana, se revela que el aprendizaje infantil provoca un aumento rápido y persistente de la actividad de la GR neuronal. La inhibición de la GR deterioró selectivamente la formación de la memoria a largo plazo en ratas lactantes, pero no en ratas jóvenes y adultas, lo que confirma su papel específico de la edad (184, 185).

Por otro lado, existen pocos reportes de la actividad de la GR en CPF de humanos durante el envejecimiento, la cual se presume con tendencia a la reducción conforme avanza la edad, especialmente en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (123). Además, también se ha reportado que en CPF post mortem de pacientes con desorden bipolar, desorden depresivo mayor y esquizofrenia (186), la actividad de GR no presenta cambios.

#### **b) Envejecimiento en el grupo vehículo (etanol al 7.5%).**

El etanol, también referido en la bibliografía como alcohol etílico, es una sustancia producida y utilizada como bebida, droga y medicina. Existe cierta arbitrariedad sobre la clasificación de los niveles seguros de consumo de alcohol en el humano, aunque se considera que una dosis máxima de 0.8 g/kg de peso corporal al día corresponde a una ingesta moderada (187).

En humanos, la tasa de catabolismo-eliminación oscila entre 0.016-0.018 g/dl/h; sin embargo, su variabilidad está en función del contenido local de enzimas detoxificantes. La exposición de los tejidos a este compuesto suele ser equitativa y

con pocas diferencias debido a la facilidad en su distribución (188). No obstante, es de esperar que el envejecimiento, así como todas aquellas alteraciones de composición corporal que conlleva, determinen cambios en el patrón farmacocinético del etanol, esto debido a la disminución observada del volumen de agua corporal y de masa magra tanto en animales como en sujetos envejecidos (189).

Una ingesta moderada baja en dosis pequeñas puede resultar en un beneficio de la salud, contrario a una ingesta en grandes cantidades (190-192). Este fenómeno, denominado como hormesis, nos ayuda a entender la dualidad fisiológica del etanol (193). Los estudios epidemiológicos a menudo informan una mejor salud en los bebedores moderados en comparación con los abstemios. Observada por primera vez en estudios de incidencia de infarto de miocardio, la "curva en forma de J" (que describe la apariencia gráfica de las medidas de salud trazadas contra el consumo) reaparece en estudios de diabetes, accidente cerebrovascular e incluso dolor crónico generalizado (194, 195).

Los métodos para investigar la asociación entre el alcohol y la salud se han ido refinando; sin embargo, el tamaño de los beneficios aparentes se ha reducido sustancialmente (196). Con respecto al tejido de interés, una ingesta crónica de una dosis baja de alcohol (<0.5 g/kg) puede incluso favorecer la depuración de los desechos cerebrales entre el sistema linfático y el líquido cefalorraquídeo (LCR) (191), así como la angiogénesis en eventos cerebrovasculares isquémicos (197).

Dado que los polifenoles se absorben en intestino delgado principalmente por difusión pasiva, es necesario, en dependencia del tipo de polifenol que se combinen con un vehículo que los mantenga en un estado soluble en un medio acuoso, lo cual se expone en la "Paradoja Francesa" (198). El etanol se ha utilizado frecuentemente como vehículo de polifenoles para favorecer su absorción intestinal.

Previamente, se ha concluido en estudios del grupo de trabajo que la administración de resveratrol disuelto en una solución al 7.5% favorece la absorción de este polifenol, observando un efecto biológico positivo, sin generar efectos deletéreos en cerebro. Esta observación fue corroborada en el presente trabajo

(Figura 7), dado que en general los niveles de •NO y lipoperoxidación (LPO) no se vieron modificados en la CPF de los grupos experimentales con excepción de las etapas tempranas de 2 y 4 meses en donde se pudo observar un ligero incremento de •NO y de LPO, respectivamente.

La biotransformación del etanol ocurre principalmente en el hígado y está mediada por las múltiples isoenzimas de alcohol deshidrogenasa (ADH) y el sistema microsomal de oxidación de etanol (donde se considera la actividad del citocromo P450), así como por otras enzimas como la catalasa. La CAT de localización peroxisomal, es capaz de oxidar el alcohol usando una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con producción de agua y acetaldehído. En condiciones fisiológicas, la oxidación del etanol por CAT no tiene un papel relevante en su eliminación; sin embargo, en el alcoholismo crónico parece tener un papel más destacado, principalmente en órganos extrahepáticos, como el sistema nervioso (199), donde alcanza a metabolizar hasta un 60% del etanol (200).

Las concentraciones totales de la ADH (y sus isoformas) en el cerebro son bajas, siendo expresadas principalmente en células piramidales en la corteza (188). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que, ante condiciones de exposición a una dosis crónica de etanol como las planteadas en el grupo vehículo del biomodelo, puede existir una inducción significativa de la actividad de catalasa con valores superiores a los observados de forma fisiológica, de forma progresiva desde el mes 2 hasta el 10 de tratamiento; sin embargo, los mecanismos no se encuentran descritos, y posterior a este periodo, no existen cambios estadísticamente significativos en la actividad de esta enzima.

Los cambios en el estado redox derivados del incremento en la producción de acetaldehído, metabolito del alcohol, son capaces de inducir una disminución de la actividad de SOD en tejido hepático (201). A este respecto, Legid et al, en 1981, describieron al alcohol como un inhibidor de la actividad de SOD en el tejido cerebral. Durante un periodo de intoxicación agudo y otro crónico sobre ratas Wistar con etanol al 20% inyectado por vía intraperitoneal, se han encontrado inhibiciones del 25% (para dosis aguda) y del 35% (exposición crónica de 6 semanas) (202).

Los resultados encontrados en este estudio muestran un comportamiento inhibitorio semejante al observado en el control, en donde se observa una disminución progresiva en la actividad de SOD desde el mes 14 de tratamiento, sin diferencia estadísticamente significativa.

La exposición al alcohol induce daños en la membrana de neuronas y astrocitos, por lo que impacta en el nivel de GSH, en animales adultos (203). Además, la evidencia del estrés oxidativo como mediador de la pro-inflamación que conduce a la neurodegeneración durante la intoxicación está bien documentada (204). En modelos de consumo crónico de alcohol, se ha descrito el incremento de estrés oxidativo asociado a un estímulo en la expresión génica proinflamatoria concomitante con gliosis, neurodegeneración y deterioro de la memoria (205). Sin embargo, las dosis administradas en estos modelos superan la administración ejercida en el biomodelo manejado en este estudio, por lo que la cantidad consumida se supone como el inductor de estas especies dañinas.

Respecto del sistema glutatión (Figura 9), la evaluación en este biomodelo administrado diariamente con etanol al 7.5% registró un decremento del glutatión total a los 10 y 16 meses de tratamiento. Sin embargo, la forma reducida que ejerce la función protectora en las células de la región de la CPF presentó altibajos a lo largo del estudio, incrementando a los 2 meses de tratamiento y del mes 8 al 12 y disminuyendo a los 4 y 16 meses de tratamiento. Por otro lado, los niveles de la forma oxidada (GSSG) incrementaron súbitamente a 10 y 14 meses de tratamiento. Aunque en general el ambiente redox fue favorable de manera antioxidante de los 2 a los 8 meses de tratamiento, se observó una regulación pro-oxidante en los meses 10, 12 y 18 de administración.

Poco se conoce acerca de las exposiciones crónicas de bajo porcentaje alcohólico en la CPF sobre los niveles de GSH. Sin embargo, se observaron niveles aumentados de GSH en el biomodelo, lo que sugiere que los niveles elevados de antioxidantes amortiguan con éxito el posible daño en la CPF contra la exposición repetida a la administración. Dado que la GPx mostró un comportamiento en su

actividad semejante a la SOD, esto podría ser el resultado de la activación del ciclo redox del glutatión.

Se ha visto que la exposición a porcentajes mayores de consumo crónico de alcohol en rata de ambos sexos desarrolla una respuesta antioxidante significativa en la CPF después de la exposición repetida, y en ambos sexos se han descrito cambios de comportamiento consistentes que se asemejan a la depresión y la ansiedad (206).

Adicionalmente, se sabe que, el acetaldehído impacta sobre la relación 2GSH/GSSG, disminuyendo el parámetro hasta en un 36% con posibilidad de recuperación (207). En este sentido, las mayores disminuciones observadas de la relación 2GSH/GSSG coinciden con el incremento de la concentración de GSSG en nuestro biomodelo, así como con los principales decrementos de la actividad de SOD a los 10 y 14 meses de tratamiento.

A este respecto, cabe destacar también que el primer punto crítico de decaimiento de actividad de SOD registrado a los 10 meses, así como de la relación 2GSH/GSSG guarda una correlación con el incremento de los niveles de lipoperóxidos, mostrando las compensaciones generadas para mantener el balance redox. No obstante, la actividad de la GST de la CPF no mostró variaciones significativas ante la administración de etanol. Sin embargo, la actividad de GR fue mayor a los 4 – 8 meses de tratamiento y 14 a 16 meses de tratamiento. Hasta el momento, no se ha abordado el estudio de estas enzimas en condiciones de envejecimiento y bajo consumo de una dosis baja crónica de etanol, por lo que los datos encontrados pueden brindar una pauta para la comprensión del comportamiento de la CPF.

**c) Envejecimiento en el grupo resveratrol (etanol al 7.5% + 10 mg/kg/d de resveratrol).**

Burr, en 1995, estableció una discusión acerca de la baja tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica registrada en Francia aun cuando sus factores de riesgo eran similares en comparación con otros países occidentales, fenómeno al que se

le denominó la "Paradoja Francesa". Bajo la premisa de que una característica sobre el estilo de vida de los franceses debía conferirles protección, la imagen del vino como agente protector surgió iniciando los análisis sobre los componentes responsables de este efecto, donde figuraron primero el alcohol y posteriormente la presencia de compuestos fenólicos capaces de contrarrestar la oxidación (208).

En los últimos años, el resveratrol ha ganado notoriedad como favorito en el campo del antienviejamiento (209), lo cual es un título peligroso cuando el mecanismo del envejecimiento en sí está mal definido (210-213). Discutido en los medios como "La molécula del vino tinto" a partir de 2003, el resveratrol demostró que mejora la longevidad en ratones machos obesos pertenecientes a la cepa C57BL/6Nia (214, 215). Después de más de una década de investigación *in vivo* de alto impacto y muy publicitada (216-218), esta molécula y la investigación que la rodea mantienen un estado enigmático controvertido, ya que su utilidad clínica potencial sigue siendo incierta (219).

El resveratrol, uno de los fenoles de mayor importancia presente en el vino tinto, se ha mostrado afectado por la matriz alimentaria. Su administración como compuesto puro 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  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ), la vida media ( $t_{1/2}$ ) y la exposición medida por el área bajo la curva (AUC). Existe evidencia sólida de que la respuesta *in vitro* e *in vivo* al resveratrol depende de la dosis y posiblemente de la exposición (220-224).

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. Las administraciones se han establecido a través de varios regímenes de dosis, tamaños y formulaciones fisiológicas (225-228). 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, registre efectos positivos a largo plazo.

Los efectos benéficos de este polifenol descritos en la paradoja francesa se encuentran enfocados hacia las enfermedades cardiovasculares y en parte hacia la regulación al alza del  $\bullet\text{NO}$  y la eNOS (229). No obstante, lo reportado en diversos estudios sobre la regulación de la producción y los niveles de  $\bullet\text{NO}$  es variable, esto en función de sus concentraciones. Mientras que el resveratrol del vino tinto ha exhibido una actividad antioxidante suficiente para proteger contra la toxicidad del NO a las células, disminuyendo sus niveles especialmente en el hipocampo, en otros tejidos favorece la generación de  $\bullet\text{NO}$ .

En primera instancia, los resultados de este trabajo correspondientes al grupo resveratrol sugieren que este compuesto regula a la baja la concentración de  $\bullet\text{NO}$ , en función de lo requerido en la CPF. La poca diferencia estadística encontrada entre el grupo resveratrol y vehículo, así como el mismo patrón de comportamiento, podría indicar que gran parte de este efecto también obedece al mantenimiento observado en el grupo vehículo.

Los posibles mecanismos por los cuales los compuestos fenólicos como el resveratrol 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 (230-232). Los estudios en animales *in vivo* han demostrado los efectos protectores del resveratrol en varios modelos de neurotoxicidad (233). 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.

Teniendo en cuenta que el estrés oxidativo es un proceso relacionado con la edad implicado en diversos trastornos neurodegenerativos, varios estudios han demostrado que la toxicidad inducida por  $\bullet\text{NO}$  se genera por su reacción con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para producir el peroxinitrito, el cual es altamente citotóxico (234). Es probable que

tanto la actividad antioxidante propuesta, así como las propiedades de eliminación de ROS del resveratrol, expliquen al menos en parte sus capacidades protectoras y de rescate en la CPF, como se observa en los resultados obtenidos.

Por otro lado, dado que el incremento de  $\text{ONOO}^-$  induce a una mayor peroxidación lipídica, la administración crónica de resveratrol registró que puede evitarse una sobre-acumulación de MDA+4-HDA, e inclusive puede favorecerse una reducción los niveles de MDA en CPF a lo largo de 18 meses de tratamiento, lo cual sugiere que el resveratrol es capaz de actuar como una molécula para capturar radicales libres como los aniones superóxido y peroxinitrito, evitando así, la acumulación de LPO en CPF (231, 235-237).

A este respecto 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 peróxido de lípidos y aumentó las actividades antioxidantes en el cerebro de ratones obesos, mostrando un efecto neuroprotector al prevenir el daño oxidativo en el tejido cerebral de ratones obesos (238).

Por otro lado, en ratas Wistar macho adultas en las 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, se observó que que el tratamiento con resveratrol redujo significativamente la producción de MDA y  $\bullet\text{NO}$  en el hipocampo, la corteza, el cerebelo, el tronco encefálico y la médula espinal, al mismo tiempo que aumentaron los niveles de glutatión. Este estudio demuestra que el resveratrol es un potente agente neuroprotector contra el daño oxidativo diabético (239).

Asimismo, en un estudio que exploró los mecanismos subyacentes a la acción antidepresiva del resveratrol en ratas expuestas al estrés crónico leve impredecible (CUMS), 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 inducidas por CUMS (reducción de la preferencia por la sacarosa, mayor tiempo de

inmovilidad y disminución de la actividad locomotora) y los cambios bioquímicos (aumento de la LPO y disminución de la actividad de SOD) (240).

Por otro lado, diversas intervenciones dietéticas son capaces de modular la vía de transcripción de 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 (241). La regulación al alza de los genes diana de Nrf2 confiere una mayor protección a las neuronas ante el daño oxidativo (242).

El resveratrol es un activador directo del factor Nrf2, incrementando su translocación y la expresión de las enzimas antes mencionadas, en particular de SOD. La fracción de esta enzima cuya traducción se ve más favorecida es la isoforma Mn-SOD (241). El mantenimiento de la actividad promedio de SOD sin decaimientos significativos se ilustra en los resultados de este estudio, y el incremento de su actividad a los 18 meses de tratamiento sugiere una activación de Nrf2 probablemente inducida por la dosis administrada de resveratrol por vía oral.

El funcionamiento adecuado de la vía Nrf2 es indispensable para contrarrestar el estrés oxidativo y proteger múltiples órganos y células (243, 244). 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 (245).

Una deficiencia en la actividad de Nrf2 puede agravar el daño oxidativo y la lesión inflamatoria, que está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo y las enfermedades relacionadas con la inflamación, como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el asma, la aterosclerosis, la diabetes, la esclerosis múltiple y la osteoartritis y artritis reumatoide (246, 247).

En un modelo de lesión por isquemia-reperfusión en ratones knockout para Nrf2, las lesiones observadas fueron significativamente peores que las generadas

en los ratones con actividad de Nrf2 (248). Kong et al., estudiaron el impacto del tratamiento con resveratrol en un modelo de ratones con enfermedad de Alzheimer y demostraron que tanto el contenido de Nrf2 nuclear como la translocación estaban elevados, al mismo tiempo que aumentaba la expresión de hemo oxigenasa 1 (HO-1) (249).

De esta manera, el tratamiento con resveratrol podría mejorar la memoria espacial en los animales de experimentación aumentando la expresión y actividad de SOD, GPx y CAT. Además, del tratamiento con resveratrol disminuyó los niveles cerebrales de MDA en estos ratones activando el Nrf2/HO-1, lo que da más indicios de su potencial para disminuir el daño oxidativo celular.

En el presente estudio únicamente se observó incremento en la actividad de CAT y GPx hacia el final del tratamiento; sin embargo, a lo largo de este, la actividad fue mantenida en el grupo administrado con resveratrol. A este respecto, el tratamiento con resveratrol, además de mejorar el incremento de iNOS y la COX-2 (enzimas proinflamatorias) inducido por el acúmulo de proteína A $\beta$ , también revirtió y disminuyó los niveles de expresión de ARNm de genes antioxidantes (GPx1, SOD-1, Nrf2, CAT, glutatión y HO-1) (250). Hui et al., observaron el efecto neuroprotector del tratamiento con resveratrol sobre la toxicidad de PC12 inducida por A $\beta$ 1-42 a través de la activación de PI3K/Akt, demostrando un efecto neuroprotector asociado a resveratrol que resulta en la activación de la vía de señalización Nrf2 (251).

Con respecto a los resultados obtenidos sobre los niveles de glutatión (Figura 9), en los últimos 25 años han visto un aumento exponencial en el conocimiento de la plasticidad neuroglial (252). Las células astrogliales se han implicado de numerosas maneras en el metabolismo cerebral, especialmente por el hecho de que influyen en la función neuronal, particularmente a nivel de las sinapsis (253, 254, 255, 256). Numerosos estudios demostraron que los astrocitos juegan un papel importante en los trastornos neurodegenerativos y ejercen una función protectora fundamental frente al estrés oxidativo por sus efectos sobre el metabolismo del antioxidante glutatión y la defensa frente a ROS (257-259). Los astrocitos primarios y los cultivos de células astrogliales C6 han servido para generar evidencias

importantes sobre la función glial, las vías de señalización y los mecanismos de eliminación de peróxido por parte de las células cerebrales (260-263).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, y en particular de CPF, en donde juega un papel importante en la plasticidad neuronal y la neurotoxicidad (264). 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 (252).

En los astrocitos, el glutamato se convierte en glutamina mediante la enzima glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) (265). La glutamina es liberada por los astrocitos y absorbida por las neuronas para convertirse nuevamente en glutamato; este sistema se denomina ciclo glutamato-glutamina (266). La interacción entre las neuronas presinápticas y postsinápticas junto con los astrocitos caracteriza la sinapsis tripartita (267).

La captación de glutamato también es importante para mantener los niveles de GSH. El GSH secretado por los astrocitos sirve como base para la síntesis de GSH neuronal (265, 268). 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 (269-271).

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 CPF. Se ha demostrado en células astrogliales C6 que el resveratrol aumentó de la captación de glutamato con dosis que oscilaron entre 0,1 y 250  $\mu\text{M}$  (269).

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 de CPF. 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  $\mu$ M), que disminuyó la captación de glutamato en el cultivo celular primario, lo que indica un fenómeno hormético (272, 273).

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 GS; y (2) la regulación de los niveles de GSH (274).

El resveratrol aumenta la actividad de la enzima GS tanto en células astrogiales C638, como en cultivos primarios de astrocitos, lo que indica un papel importante en el ciclo glutamato-glutamina (269, 270). Los niveles de glutamina están relacionados con las variaciones redox celulares y se han reducido bajo estrés catabólico (266). 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 (275). La actividad de la enzima GS se vio afectada por el estrés oxidativo, y el resveratrol pudo 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 (276, 277).

En modelos de administración de estreptozotocina intracerebroventricular se presentó 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 (278). El tratamiento con resveratrol también aumentó el GSH intracelular en cultivos de células astrogiales y cortes de CPF (262, 270). 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  $H_2O_2$ ) y aguda (30 min), el

resveratrol evitó la disminución de GSH inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero después de 6 h de agresión oxidativa, el resveratrol mostró un efecto prooxidante, potenciando la disminución de GSH (262).

Los resultados del presente estudio también reportaron un comportamiento hormético en los niveles de glutatión total, dado que la administración de resveratrol por 2 y 4 meses incrementó la concentración de glutatión total, también observada del mes 12 al 18 del tratamiento, al mismo tiempo se observaron bajas concentraciones de glutatión total a los 8 meses de tratamiento, lo cual supone adecuaciones en el sistema redox de la CPF durante el proceso de envejecimiento.

De igual manera, mientras que la administración de resveratrol por 2 y 4 meses incrementó la concentración de GSH, también observada del mes 12 al 18 del tratamiento, se observó que disminuyó las concentraciones de glutatión total a los 6 y 8 meses de tratamiento. Cabe resaltar que el tratamiento con resveratrol previno el incremento de la forma oxidada de glutatión, por lo que mantuvo un estatus antioxidante en la CPF durante todo el estudio.

Como se ha comentado, las isoenzimas GST ejercen su actividad de neutralización de compuestos reactivos mediante la conjugación con el GSH. Destaca 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 ante una exposición del ser humano sano a 1 g/d de resveratrol durante un periodo de 4 semanas, si bien el efecto global fue mínimo, los individuos que mostraron niveles menores de GST-Mu en linfocitos antes de la intervención, registraron un incremento de esta proteína. (279).

Por otro lado, la administración de 20 mg/kg de resveratrol durante cuatro semanas determinó una regulación positiva de la actividad total de GST en la corteza cerebral 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 también positiva, pero acercándose más al requerimiento fisiológico. No obstante, cabe destacar que la expresión génica sólo sugiere los niveles esperados de proteína, mas no siempre los niveles de ARNm y la cantidad de proteína correlacionan bien debido a diversos factores posteriores a la traducción (280).

El biomodelo abordado con resveratrol en este estudio presentó una actividad de GST mayor que el grupo control (Figura 10), con incrementos significativos en el mes 14 de tratamiento. Esto concuerda también con los hallazgos en la literatura, donde la actividad de GST en el grupo control de este estudio 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 visto reportados en la literatura, por lo que este estudio arroja nuevos datos sobre una regulación al alza cuando el resveratrol es administrado de manera prolongada.

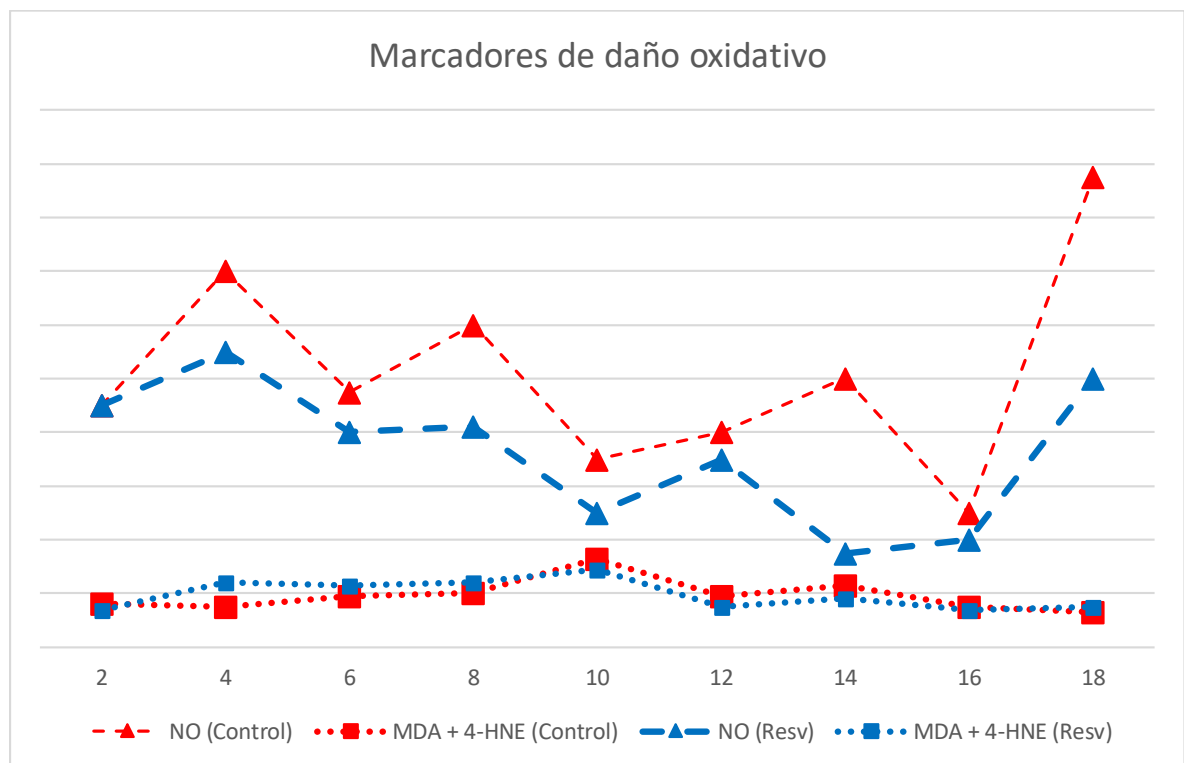
La actividad de GR (Figura 10) durante el envejecimiento puede estar disminuida o no presentar cambios. No obstante, las alteraciones en el estado redox pueden inducir modificaciones en la actividad de la enzima. El bloqueo de la actividad de GR en modelos de estrés inducido por D,Lbutionina-S,R-sulfoximina (BSO) en células astrogiales 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, ya que la inhibición de este bloqueó los efectos del resveratrol (281).

Específicamente para la CPF, 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 (282). En el presente estudio, el grupo administrado con resveratrol mostró incrementos estadísticamente significativos en la actividad de la enzima; estos incrementos coinciden con los mayores niveles registrados de GSSG en este grupo.



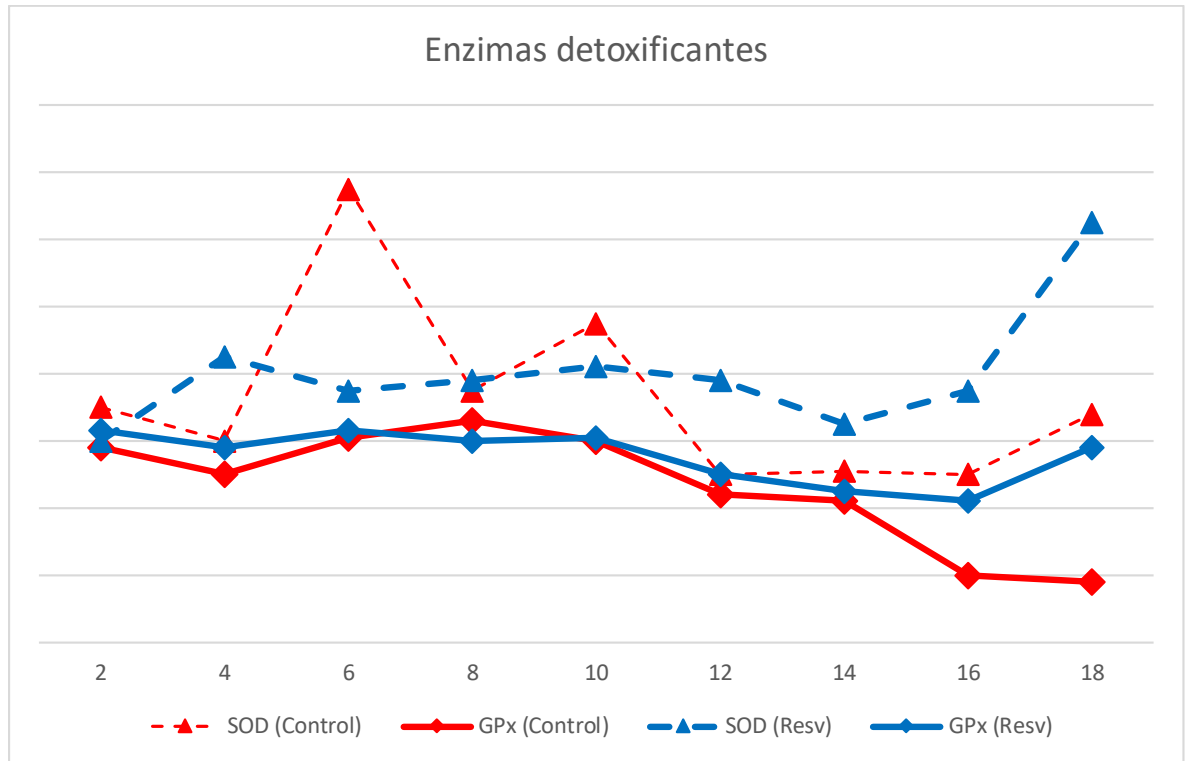
Finalmente, se presentan a continuación, a modo de resumen, la contrapolación entre el grupo control y el grupo tratado con resveratrol de los comportamientos observados más destacados durante la aplicación del tratamiento.

Entre los marcadores de daño oxidativo, debido a la asociación establecida entre la generación de su derivado radical y la lipoperoxidación lipídica, se muestran los comportamientos equivalentes del NO así como el resultado conjunto de MDA y 4-HNE (lipoperoxidación total) (Figura 12).



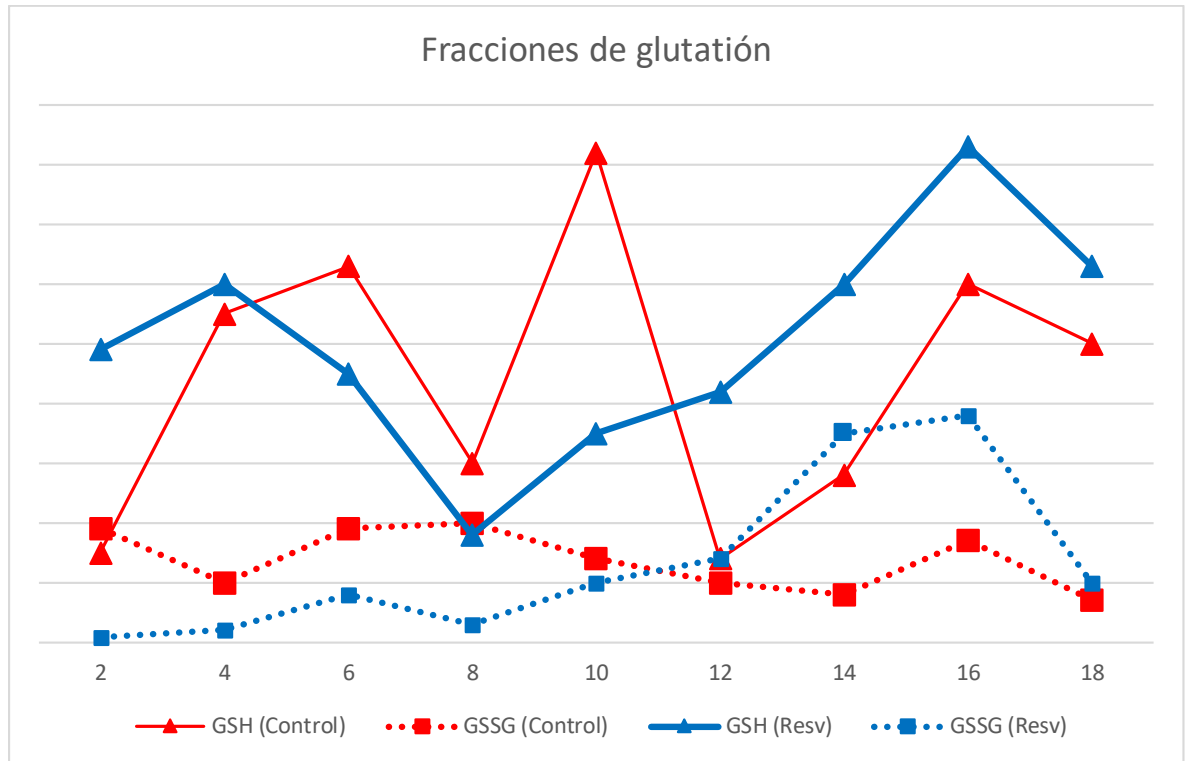
**Figura 12.** Comportamiento del NO y MDA y 4-HNE a lo largo del tratamiento.

Debido a la detoxificación conjunta realizada de los productos que neutralizan en sus respectivas reacciones, los comportamientos equivalentes de la actividad de SOD y GPx se muestran en la figura 13.



**Figura 13.** Comportamiento de SOD y GPx a lo largo del tratamiento.

Con respecto al comportamiento observado de las fracciones reducidas y oxidadas de glutatión, indicativo del balance redox de la CPF, se ilustran las variaciones de ambos parámetros a lo largo del tratamiento en la figura 14.



**Figura 13.** Comportamiento de las fracciones de glutatión (GSH y GSSG) a lo largo del tratamiento.

## 9. CONCLUSIONES

En la corteza prefrontal, el proceso de envejecimiento mostró modificaciones y adecuaciones del sistema redox para prevenir en la medida de lo posible la neurodegeneración y la pérdida de la función.

1. La administración crónica de una solución de etanol al 7.5% en ratas no alteró el balance redox de la CPF más allá de las condiciones fisiológicas de envejecimiento.
2. La administración crónica de resveratrol en una dosis de 10mg/kg previno la sobreproducción de  $\bullet\text{NO}$  y de lipoperoxidación en la CPF durante el envejecimiento.
3. El tratamiento con resveratrol mejoró la actividad de las enzimas detoxificantes SOD, CAT y GPx y conservó el sistema glutatión con un mayor impacto en la etapa de la vejez tardía, regulando a su vez la actividad de GST y GR en la CPF de animales envejecidos.

En conjunto, los resultados sugieren que la suplementación con resveratrol puede ser una estrategia preventiva en los trastornos neurodegenerativos del envejecimiento.

## **10.PERSPECTIVAS**

- Analizar las vías de señalización asociadas a los mecanismos de adaptación celular durante el envejecimiento, como sirtuinas, Forkhead-box-O1, Hemo Oxygenasa-1, etc.
- Estudiar el comportamiento génico asociado al envejecimiento.
- Evaluar dichas vías de señalización y respuesta génica tras una administración con resveratrol.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Luo J, Mills K, le Cessie S, Noordam R, van Heemst D. Ageing, Age-related Diseases and Oxidative Stress: What to Do Next? Ageing Research Reviews [Internet]. 2019 [citado 27 ago 2021]; 57 Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733333/#:~:text=Oxidative%20damage%20contributes%20to%20the,and%20diseases%20showed%20controversial%20results.>
2. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. J. Cell Biol. [Internet]. 2018 [citado 27 ago 2021]; 217 (1): 65-77. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748990/>
3. Salthouse TA. Trajectories of normal cognitive aging. Psychol Aging [Internet]. 2019 [citado 20 sep 2021];34(1):17-24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6367038/>
4. Bektas A, Schurman SH, Sen R, Ferrucci L. Aging, inflammation and the environment. Experimental Gerontology [Internet]. 2017 [citado 27 ago 2021]; 105: 10-18. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29275161/>
5. Jaul E, Barron J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. Front Public Health [Internet]. 2017 [citado 10 sep 2021];5:335. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5732407/>
6. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial de la población (11 de julio) datos nacionales. Comunicado de prensa No. 302. 9 de Julio de 2020. Disponible en: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/Poblacion2020\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/Poblacion2020_Nal.pdf)
7. Franceschi C, Garagnani P, Morsiani C, Conte M, Santoro A, Grignolio A, Monti D, Capri M, Salvioli S. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. Front Med (Lausanne) [Internet]. 2018 [citado 10 sep 2021];5:61. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5890129/>

8. Chang AY, Skirbekk VF, Tyrovolas S, Kassebaum NL, Dieleman JL. Measuring population ageing: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Public Health* [Internet]. 2019 [citado 29 ago 2021]; 4: 159-67. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lanpub/article/PIIS2468-2667\(19\)30019-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanpub/article/PIIS2468-2667(19)30019-2/fulltext)
9. Marešová P, Mohelská H, Kuča K. Economics Aspects of Ageing Population. *Procedia Economics and Finance* [Internet]. 2015 [citado 2 ene 2022]; 23, 534–538. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0047637401004183>
10. Zhang X, Meng X, Chen Y, Leng SX, Zhang H. (2017). The Biology of Aging and Cancer. *The Cancer Journal* [Internet]. 2017 [citado 27 sep 2021]; 23(4), 201–205. Disponible en: [https://journals.lww.com/journalppo/Abstract/2017/07000/The\\_Biology\\_of\\_Aging\\_and\\_Cancer\\_Frailty..2.aspx](https://journals.lww.com/journalppo/Abstract/2017/07000/The_Biology_of_Aging_and_Cancer_Frailty..2.aspx)
11. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* [Internet]. 2013 [citado 29 ago 2021]; 153 (6):1194–1217. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3836174/pdf/emss-55354.pdf>
12. Trevisan K, Cristina-Pereira R, Silva-Amaral D, Aversi-Ferreira TA. Theories of Aging and the Prevalence of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* [Internet]. 2019 [citado 30 sep 2021]; 1-9. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/9171424/>
13. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem* [Internet]. 2017 [citado 29 ago 2021]; 86: 715-48. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28441057/>
14. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International* [Internet]. 2014 [citado 2 oct 2021]; 1-19. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/761264/>

15. Warraich U-e-A, Hussain F, Kayani HUR. Aging – Oxidative stress. Antioxidants and computational modeling. *Heliyon* [Internet]. 2020 [citado 30 ago 2021]; 6: 1-11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844020309518>
16. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [Internet]. 2014 [citado 3 nov 2021]; 15(7), 482–496. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrm3823#article-info>
17. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargulio G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* [Internet]. 2018 [citado 30 ago 2021]; 13: 757-772. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5927356/>
18. Haas RH. Mitochondrial Dysfunction in Aging and Diseases of Aging. *Biology (Basel)* [Internet]. 2019 [citado 2 sep 2021];8(2):48. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627182/>
19. Ferrucci L, Gonzalez-Freire M, Fabbri E, Simonsick E, Tanaka T, Moore Z, Salimi S, Sierra F, de Cabo R. Measuring biological aging in humans: A quest. *Aging Cell* [Internet]. 2020 [citado 3 de sep 2021];19(2):e13080. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31833194/>
20. Nicolson GL. Mitochondrial Dysfunction and Chronic Disease: Treatment With Natural Supplements. *Integr Med (Encinitas)* [Internet]. 2014 [citado 8 sep 2021];13(4):35-43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566449/>
21. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [Internet]. 2017 [citado 11 oct 2021]; 1–32. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/6501046/>
22. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight AR, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, Gasparovic AC, Cuadrado A, Weber D, Poulsen HE, Grune T, Schmidt HH, Ghezzi P. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2015 [citado



- 10 nov 2021]; 10;23(14):1144-70. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657513/>
23. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Molecular Aspects of Medicine* [Internet]. 2005 [citado 21 feb 2022]; 26(1-2), 3–31. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098299704000743>
24. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research* [Internet]. 1999 [citado 12 ene 2022]; 31(6), 577–596. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10715769900301161>
25. Pierini D, Bryan NS. Nitric Oxide Availability as a Marker of Oxidative Stress. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2014 [citado 22 feb 2022]; 63–71. Disponible en: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-1441-8\\_5](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-1441-8_5)
26. Chirino Yolanda I, Orozco-Ibarra Marisol, Pedraza-Chaverrí José. Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev. invest. clín.* [Internet]. 2006 [citado 2 Mar 2022]; 58(4): 350-358. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-83762006000400010&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762006000400010&lng=es).
27. Gaggini M, Sabatino L, Vassalle C. Conventional and innovative methods to assess oxidative stress biomarkers in the clinical cardiovascular setting. *BioTechniques* [Internet]. 2020 [citado 17 ene 2022]; 68 (4). Disponible en: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/btn-2019-0138>
28. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2014 [citado 15 feb 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066722/>
29. Roede JR, Fritz KS. Hepatotoxicity of Reactive Aldehydes. Reference Module in Biomedical Sciences [Internet]. 2015 [citado 11 mar 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383021139>
30. Zhong H, Yin H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology* [Internet]. 2015 [citado

- 12 mar 2022]; 4, 193–199. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231714001359>
31. Lee JS, Park YH, Park S, Yoon U, Choe Y, Cheon BK, Hahn A, Cho SH, Kim SJ, Kim JP, Jung YH, Park KC, Kim HJ, Jang H, Na DL, Seo SW. Distinct Brain Regions in Physiological and Pathological Brain Aging. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2019 [citado 3 sep 2021]; 11:147. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31275140/>
32. Yeung MK, Chan AS. A Systematic Review of the Application of Functional Near-Infrared Spectroscopy to the Study of Cerebral Hemodynamics in Healthy Aging. *Neuropsychol Rev* [Internet]. 2021 [citado 5 sep 2021]; 31, 139–166. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11065-020-09455-3#citeas>
33. Cenini G, Lloret A, Cascella R. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2019 [citado 5 sep 2021]; 2019:2105607. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31210837/>
34. Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol* [Internet]. 2018 [citado 3 sep 2021]; 15:490-503. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29413961/>
35. Chen X, Guo C, Kong J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* [Internet]. 2012 [citado 6 de oct 2021]; 7(5):376-385. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4350122/pdf/NRR-7-376.pdf>
36. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature* [Internet]. 2016 [citado 17 nov 2021]; 539(7628):180-186. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27830812/>
37. Mohan A, Thalamuthu A, Mather KA, Zhang Y, Catts VS, Weickert CS, Sachdev PS. Differential expression of synaptic and interneuron genes in the aging human prefrontal cortex. *Neurobiology of Aging* [Internet] 2018 [citado 20 oct 2021]; 70, 194–202. Disponible

en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S019745801830215X>

38. Ramos-Galarza C, Villegas C, Ortiz D, García A, Bolaños M, Acosta P, Lepe N, Del Valle M, Ramos V. Evaluación de las Habilidades de la Corteza Prefrontal: La Escala Efeco II-VC y II-VR. Revista Ecuatoriana de Neurología [Internet]. 2018 [citado 6 sep 2021]; 27(3): 36-43. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/332569795\\_Evaluation\\_of\\_the\\_skills\\_of\\_the\\_prefrontal\\_cortex\\_The\\_EFECO\\_II-VC\\_and\\_II-VR](https://www.researchgate.net/publication/332569795_Evaluation_of_the_skills_of_the_prefrontal_cortex_The_EFECO_II-VC_and_II-VR)
39. García-Molina A. Phineas Gage y el enigma del córtex prefrontal. Neurología [Internet]. 2012 [citado 6 sep 2021]; 27(6): 370-75. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-articulo-phineas-gage-el-enigma-del-S0213485310001581>
40. Snell RS. Neuroanatomía clínica. 7th. ed. España: Wolters Kluwer Health; 2014.
41. Bloss EB, Janssen WG, McEwen BS, Morrison JH. Interactive Effects of Stress and Aging on Structural Plasticity in the Prefrontal Cortex. J Neurosci [Internet]. 2010 [citado 20 oct 2021]; 30(19):6726 – 6731. Disponible en: <https://www.jneurosci.org/content/30/19/6726/tab-article-info>
42. Maluach AM, Misquitta KA, Prevot TD, Fee C, Sibille E, Banasr M, Andrezza AC. Increased Neuronal DNA/RNA Oxidation in the Frontal Cortex of Mice Subjected to Unpredictable Chronic Mild Stress. Chronic Stress (Thousand Oaks) [Internet]. 2017 [citado 7 sep 2021]; 1:2470547017724744. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29250610/>
43. Erraji-Benchekroun L, Underwood MD, Arango V, Galfalvy H, Pavlidis P, Smyrniotopoulos P, Mann JJ, Sibille, E. Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life. Biological Psychiatry [Internet]. 2005 [citado 21 oct 2021]; 57(5), 549–558. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006322304011187>
44. Shetty AK, Kodali M, Upadhyaya R, Madhu LN. Emerging Anti-Aging Strategies – Scientific Basis and Efficacy. Aging and Disease [Internet]. 2018 [citado 1

- sep 2021]; 9 (6): 1165-1184. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30574426/>
45. Conti V, Izzo V, Corbi G, Russomanno G, Manzo V, De Lise F, Di Donato A, Filippelli A. Antioxidant Supplementation in the Treatment of Aging-Associated Diseases. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2016 [citado 24 oct 2021]; 7: 1-11. Disponible en: <https://internal-journal.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2016.00024/full>
46. Biesalski HK, Dragsted LO, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, Schrenk D, Walter P, Weber P. Bioactive compounds: definition and assessment of activity. *Nutrition* [Internet]. 2009 [citado 20 dic 2021];25(11-12):1202-5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19695833/>
47. Schättin A, Baur K, Stutz J, Wolf P, de Bruin ED. Effects of Physical Exercise Combined with Nutritional Supplements on Aging Brain Related Structures and Functions: A Systematic Review. *Frontiers in Aging Neuroscience* [Internet]. 2016 [citado 24 oct 2021]; 8: 1-20. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2016.00161/full>
48. Gulcin I. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol* [Internet]. 2020 [citado 1 de sep 2021]; 94(3): 651-715. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32180036/>
49. Atta EM, Mohamed NH, Abdelgawad AAM. Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *Eur. Chem. Bull* [Internet]. 2017 [citado 1 sep 2021]; 6 (8): 365-75. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/321844679\\_Antioxidants\\_An\\_Overview\\_on\\_the\\_Natural\\_and\\_Synthetic\\_Types](https://www.researchgate.net/publication/321844679_Antioxidants_An_Overview_on_the_Natural_and_Synthetic_Types)
50. Rosa AC, Corsi D, Cavi N, Bruni N, Dosio F. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules* [Internet]. 2021 [citado 15 mar 2022];26(7):1844. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33805942/>
51. Nandi A, Yan L-J, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular*

- Longevity [Internet]. 2019 [citado 27 nov 2021]; 1–19. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/9613090/>
52. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2015 [citado 18 sep 2021]; 97, 55–74. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523415300039>
53. Battin EE, Brumaghim, JL. Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics* [Internet]. 2009 [citado 20 feb 2022]; 55(1), 1–23. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12013-009-9054-7>
54. Cotton SC, Sharp L, Little J, Brockton N. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Colorectal Cancer: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology* [Internet]. 2000 [citado 5 ene 2022]; 151(1), 7–32. Disponible en: <https://academic.oup.com/aje/article/151/1/7/89029?login=true>
55. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2016 [citado 30 oct 2021]; 95:27-42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26923386/>
56. Forni C, Facchiano F, Bartoli M, Pieretti S, Facchiano A, D'Arcangelo D, Norelli S, Valle G, Nisini R, Beninati S, Tabolacci C, Jadeja RN. Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019 [citado 2 sep 2021]; 2019:8748253. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31080832/>
57. Ma G, Chen Y. Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis. *Journal of Functional Foods* [Internet]. 2020 [citado 7 sep 2021]; 66: 1-11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464620300530>
58. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med*

- [Internet]. 2010 [citado 8 feb 2022]; 31(6):435-45. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20854840/>
59. Li S, Tan HY, Wang N, Cheung F, Hong M, Feng Y. The Potential and Action Mechanism of Polyphenols in the Treatment of Liver Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [Internet]. 2018 [citado 2 dic 2021]; 1–25. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Potential-and-Action-Mechanism-of-Polyphenols-Li-Tan/11eeb463344a7a21100fc85d8154cb70e7d307cb>
60. Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, Fokou PVT, Martins N, Sharifi-Rad J. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines* [Internet]. 2018 [citado 2 sep 2021]; 6(3):91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30205595/>
61. Silva Moraes D, Cristina Moreira D, Oliveira Andrade JM, Sousa Santos SH. Sirtuins, brain and cognition: A review of resveratrol effects. *IBRO* [Internet]. 2020 [citado 7 sep 2021]; 9:46-51. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451830120300194#:~:text=Resveratrol%20improves%20cognition%20through%20an,mechanism%20by%20SIRT1%2Dmediated%20deacetylation.&text=The%20authors%20showed%20that%20SIRT1,by%20the%20brain%20streptozotocin%20injection.>
62. Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazida K, El Alami M, Bonet-Costa V, Borrás C, Viña J. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriátría y Gerontología* [Internet]. 2013 [citado 25 oct 2021]; 48(2): 79-88. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-geriatria-gerontologia-124-articulo-resveratrol-distribucion-propiedades-perspectivas-S0211139X12001023>
63. Fonseca-Santos B, Chorilli M. The uses of resveratrol for neurological diseases treatment and insights for nanotechnology based-drug delivery systems. *Int J Pharm* [Internet]. 2020 [citado 8 sep 2021]; 589:119832. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32877730/>

64. Rodrigo E, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clínica Chimica Acta* [Internet]. 2011 [citado 8 sep 2021]; 412(6): 410-24. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898110007199?via%3Dihub>
65. Wang P, Sang S. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *BioFactors* [Internet]. 2018 [citado 25 oct 2021]; 44(1), 16–25. Disponible en: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biof.1410>
66. Soria Romer Z, Montoya Arce BJ. Envejecimiento y factores asociados a la calidad de vida de los adultos mayores en el Estado de México. *Pap. poblac* [Internet]. 2017 [citado 9 sep 2021]; 23(93):59-93. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-74252017000300059](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-74252017000300059)
67. Organización Mundial de la Salud. Década del envejecimiento saludable. OMS; 2020 [citado 10 sep 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/initiatives/decade-of-healthy-ageing>
68. Organización Mundial de la Salud. Envejecimiento y salud. OMS; 2018 [citado 10 sep 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/envejecimiento-y-salud>
69. Daskalopoulou C, Stubbs B, Kralj C, Koukounari A, Prince M, Prina AM. Physical activity and healthy ageing: A systematic review and meta-analysis of longitudinal cohort studies. *Ageing Research Reviews* [Internet]. 2017 [citado 20 sep 2021]; 38:6-17. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163717300302>
70. Koen JD, Rugg MD. Neural Dedifferentiation in the Aging Brain. *Trends Cogn Sci* [Internet]. 2019 [citado 10 sep 2021];23(7):547-559. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31174975/>
71. Sedmak JJ, Grossberg SE. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* [Internet]. 1977 [citado

- 11 sep 2021];79(1-2):544-52. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/68686/>
72. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2007 [citado 11 sep 2021];851(1-2):51-70. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16950667/>
73. Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 1998 [citado 11 sep 2021];11(10):1176-83. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9778314/>
74. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* [Internet]. 2007 [citado 11 sep 2021]; 1: 3159-65. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.378>
75. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* [Internet]. 1984 [citado 11 sep 2021];105:121-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6727660/>
76. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* [Internet]. 1974 [citado 11 sep 2021];47(3):469-74. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4215654/>
77. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* [Internet]. 1984 [citado 11 sep 2021];105:114-21. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6727659/>
78. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* [Internet]. 1974 [citado 11 sep 2021];249(22):7130-9. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4436300/>



79. Bompard GJ, Prévot DS, Bascands JL. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. *Clin Biochem* [Internet]. 1990 [citado 11 sep 2021];23(6):501-4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2289307/>
80. Marsman D, Belsky DW, Gregori D, Johnson MA, Low Dog T, Meydani S, Pigat S, Sadana R, Shao A, Griffiths JC. Healthy ageing: the natural consequences of good nutrition—a conference report. *European Journal of Nutrition* [Internet]. 2018 [citado 10 feb 2022]; 57(S2), 15–34. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-018-1723-0>
81. Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* [Internet]. 2010 [citado 13 mar 2022]; 23(3), 153–165. Disponible en: <http://www.guybrown.net/resources/NOneuroDeath.NOJ.2010.pdf>
82. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* [Internet]. 1991 [citado 12 feb 2022];14(2):60-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1708538/>
83. Holscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* [Internet]. 1997 [citado 1 feb 2022];20:298–303. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9223222/>
84. Prast H, Phillippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2001 [citado 20 feb 2022];64:51–68. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11250062/#:~:text=The%20gas%20NO%20is%20a,well%20as%20in%20memory%20processes.>
85. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2001 [citado 1 feb 2022];64:365–91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11275358/>
86. Necchi D, Virgili M, Monti B, Contestabile A, Scherini E. Regional alteration of the NO/NOS system in the aging brain: a biochemical, histochemical and immunochemical study in the rat. *Brain Res* [Internet]. 2002 [citado 1 feb 2022];933:31–41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11929633/>
87. P Liu, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK. Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex. *Neurobiology*

- of Aging [Internet]. 2004 [citado 2 feb 2022]; 25 (4): 547-552. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15013576/>
88. Zoli M, Torri C, Ferrari R, Jansson A, Zini I, Fuxe K, Agnati LF. The emergence of the volume transmission concept. *Brain Res Brain Res Rev* [Internet]. 1998 [citado 9 feb 2022];26(2-3):136-47. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9651506/>
89. Agnati LF, Guidolin D, Guescini M, Genedani S, Fuxe K. Understanding wiring and volume transmission. *Brain Res Rev* [Internet]. 2010 [citado 8 feb 2022];64(1):137-59. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20347870/>
90. Steinert JR, Kopp-Scheinflug C, Baker C, Challiss RA, Mistry R, Haustein MD, Griffin SJ, Tong H, Graham BP, Forsythe ID. Nitric oxide is a volume transmitter regulating postsynaptic excitability at a glutamatergic synapse. *Neuron* [Internet]. 2008 [citado 10 feb 2022];60(4):642-56. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19038221/>
91. Lancaster JR Jr. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* [Internet]. 1997 [citado 8 feb 2022];1(1):18-30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9701041/>
92. Lancaster JR Jr. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 [citado 9 feb 2022];91(17):8137-41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8058769/>
93. Haselden WD, Kedarasetti RT, Drew PJ. Spatial and temporal patterns of nitric oxide diffusion and degradation drive emergent cerebrovascular dynamics. *PLOS Computational Biology* [Internet]. 2020 [citado 30 mar 2022]; 16(7). Disponible en: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1008069>
94. Poderoso JJ, Helfenberger K, Poderoso C. The effect of nitric oxide on mitochondrial respiration. *Nitric Oxide* [Internet]. 2019 [citado 20 feb 2022];

- 88, 61–72. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S108986031830315X>
95. Rich PR. Mitochondrial cytochrome c oxidase: catalysis, coupling and controversies. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2017 [citado 20 feb 2022];45(3):813-829. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28620043/>
96. Lourenço CF, Ledo A, Barbosa RM, Laranjinha J. Neurovascular-neuroenergetic coupling axis in the brain: master regulation by nitric oxide and consequences in aging and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2017 [citado 21 feb 2022];108:668-682. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28435052/>
97. Zlatković J, Todorović N, Bošković M, Pajović SB, Demajo M, Filipović D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Molecular and Cellular Biochemistry* [Internet]. 2014 [citado 20 ene 2022]; 393(1-2), 43–57. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-014-2045-z>
98. Carballal S, Bartesaghi S, Radi R. Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2014 [citado 27 feb 2022]; 1840(2):768-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23872352/>
99. Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiological Reviews* [Internet]. 2007 [citado 12 ene 2022], 87(4), 1175–1213. Disponible en: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00047.2006>
100. Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta* [Internet]. 2008 [citado 12 ene 2022]; 1777(10):1249–1262. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18721793/>
101. Möller M, Botti H, Batthyany C, Rubbo H, Radi R, Denicola A. Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low

- density lipoprotein. J Biol Chem [Internet]. 2005 [citado 11 ene 2022];280(10):8850-4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15632138/>
102. Gamliel A, Afri M, Frimer AA. Determining radical penetration of lipid bilayers with new lipophilic spin traps. Free Radic Biol Med [Internet]. 2008 [citado 13 ene 2022];44(7):1394-405. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18226602/>
103. Holman RT. Autoxidation of fats and related substances. Prog. Chem. Fats Other Lipids [Internet]. 1954 [citado 13 ene 2022];2:51–98. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/007968325490004X>
104. Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW. A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>- with unsaturated fatty acids. J. Biol. Chem [Internet]. 1983 [citado 14 ene 2022];258:4759–4761. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6833274/>
105. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. Chem. Rev. [Internet] 2011 [citado 14 ene 2022];111:5944–5972. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr200084z>
106. Sastry P.S. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. Prog. Lipid Res [Internet]. 1985 [citado 7 ene 2022];24:69–176. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3916238/>
107. Norris SE, Friedrich MG, Mitchell TW, Truscott RJW, Else PL. Human prefrontal cortex phospholipids containing docosahexaenoic acid increase during normal adult aging, whereas those containing arachidonic acid decrease. Neurobiol. Aging [Internet]. 2015 [citado 28 ene 2022];36:1659–1669. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197458015000056>
108. Hancock SE, Friedrich MG, Mitchell TW, Truscott RJ, Else PL. Decreases in Phospholipids Containing Adrenic and Arachidonic Acids Occur in the Human Hippocampus over the Adult Lifespan. Lipids [Internet]. 2015

- [citado 21 ene 2022];50(9):861-72. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26001986/>
109. Hancock SE, Friedrich MG, Mitchell TW, Truscott RJ, Else PL. The phospholipid composition of the human entorhinal cortex remains relatively stable over 80 years of adult aging. *Geroscience* [Internet]. 2017 [citado 11 ene 2022];39(1):73-82. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28299641/>
110. Naudí A, Cabré R, Dominguez-Gonzalez M, Ayala V, Jové M, Mota-Martorell N, Piñol-Ripoll G, Gil-Villar MP, Rué M, Portero-Otín M, Ferrer I, Pamplona R. Region-specific vulnerability to lipid peroxidation and evidence of neuronal mechanisms for polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the healthy adult human central nervous system. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2017 [citado 11 ene 2022];1862(5):485-495. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28185952/>
111. Jové M, Pradas I, Dominguez-Gonzalez M, Ferrer I, Pamplona R. Lipids and lipoxidation in human brain aging. Mitochondrial ATP-synthase as a key lipoxidation target. *Redox Biology* [Internet]. 2019 [citado 22 ene 2022]; 23. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231718309613>
112. Jové M, Cabré R, Mota-Martorell N, Martin-Garí M, Obis È, Ramos P, Canales I, Galo-Licona JD, Sol J, Nogueras L, Torres P, Portero-Otín M, Ayala V, Ferrer I, Pamplona R. Age-Related Changes in Lipidome of Rat Frontal Cortex and Cerebellum Are Partially Reversed by Methionine Restriction Applied in Old Age. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [citado 21 ene 2022];22(22):12517. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34830402/>
113. Jové M, Mota-Martorell N, Torres P, Portero-Otin M, Ferrer I, Pamplona R. New insights into human prefrontal cortex aging with a lipidomics approach. *Expert Review of Proteomics* [Internet]. 2021 [citado 24 ene 2022]; 18(5), 333–344. Disponible en:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14789450.2021.1940142>

114. Benzi G, Moretti A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 1995 [citado 24 ene 2022];19:77. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7635361/>
115. Barja G. Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Rev Camb Philos Soc* [Internet]. 2004 [citado 12 feb 2022];79:235. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15191224/>
116. Harris SB, Weindrucj R, Smith GS, Mickey MR, Walford RL. Dietary restriction alone and in combination with oral ethoxyquin/2-mercaptoethylamine in mice. *J. Gerontol* [Internet]. 1990 [citado 24 ene 2022];45:B141. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/20761003\\_Dietary\\_Restriction\\_Alone\\_and\\_in\\_Combination\\_With\\_Oral\\_Ethoxyquin2-Mercaptoethylamine\\_in\\_Mice](https://www.researchgate.net/publication/20761003_Dietary_Restriction_Alone_and_in_Combination_With_Oral_Ethoxyquin2-Mercaptoethylamine_in_Mice)
117. Orr WC, Mockett RJ, Benes JJ, Sohal RS. Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem* [Internet]. 2003 [citado 30 ene 2022];278:26418. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12743125/>
118. Tsay HJ, Wang P, Wang SL, Ku HH. Age-associated changes of superoxide dismutase and catalase activities in the rat brain. *J Biomed Sci* [Internet]. 2000 [citado 11 ene 2022];7(6):466-74. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11060495/>
119. Ciriolo M, Fiskin K., demartino A, Corasaniti M, Nistico G, Rotilio G. Age-related changes in Cu,Zn superoxide dismutase, Se-dependent and -independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mechanisms of Ageing and Development* [Internet]. 1991 [citado 28 ene 2022]; 61(3), 287–297. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0047637491900614?via%3Dihub>

120. Nisticò G, Ciriolo MR, Fiskin K, Iannone M, de Martino A, Rotilio G. NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rats. *Free Radical Biology and Medicine* [Internet]. 1992 [citado 5 ene 2022]; 12(3). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/089158499290024B?via%3Dihub>
121. Semsei I, Rao G, Richardson A. Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech. Ageing Dev* [Internet]. 1991 [citado 17 ene 2022]. 58:13-19. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2038211/>
122. Mizuno Y, Ohta K. Regional distribution of thiobarbituric acid-reactive products, activity of enzymes regulating the metabolism of oxygen free radicals, and some of the related enzymes in adult and aged rat brain. *J. Neurochem* [Internet]. 1986 [citado 11 ene 2022]; 46:1344- 1346. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2937881/>
123. Venkateshappa C, Harish G, Mahadevan A, Srinivas Bharath MM, Shankar SK. Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* [Internet]. 2012 [citado 30 ene 2022];37(8):1601-14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22461064/>
124. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* [Internet]. 1995 [citado 24 ene 2022]; 45(8):1594-601. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7644059/>
125. Sultana R, Piroddi M, Galli F, Butterfield DA. Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochem Res* [Internet]. 2008 [citado 11 mar 2022];33(12):2540-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18320305/>

126. Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W, Stefanescu C. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* [Internet]. 2010 [citado 30 ene 2022];469(1):6-10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19914330/>
127. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain, *Prog. Neurobiol* [Internet]. 2000 [citado 30 ene 2022]; 62: 649–671. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10880854/#:~:text=Glutathione%20is%20involved%20in%20the,the%20toxicity%20of%20various%20compounds.>
128. Perry TL, Godin DV, Hansen S. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett* [Internet]. 1982 [citado 31 ene 2022];33(3):305-10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7162692/>
129. Perry TL, Yong VW. Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci Lett* [Internet]. 1986 [citado 29 ene 2022];67(3):269-74. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3737015/>
130. Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* [Internet]. 1992 [citado 31 ene 2022];142(2):128-30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1454205/#:~:text=Reduced%20glutathione%20concentrations%20were%20decreased,between%20parkinsonian%20and%20control%20subjects.>
131. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* [Internet]. 1994 [citado 30 ene 2022];36(3):348-55. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8080242/>
132. Fitzmaurice PS, Ang L, Guttman M, Rajput AH, Furukawa Y, Kish SJ. Nigral glutathione deficiency is not specific for idiopathic Parkinson's disease.



- Mov Disord [Internet]. 2003 [citado 30 ene 2022];18(9):969-76. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14502663/>
133. Hazelton GA, Lang CA. Glutathione contents of tissues in the aging mouse. Biochem J [Internet]. 1980 [citado 2 feb 2022];188(1):25-30. Disponible en: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7406884/#:~:text=At%20all%20ages%20the%20total,17%2D%2D23%20months\)%20animals.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7406884/#:~:text=At%20all%20ages%20the%20total,17%2D%2D23%20months)%20animals.)
134. Farooqui MY, Day WW, Zamorano DM. Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat. Comp Biochem Physiol B [Internet]. 1987 [citado 2 feb 2022];88(1):177-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3677596/>
135. Benzi G, Pastoris O, Marzatico F, Villa RF. Influence of aging and drug treatment on the cerebral glutathione system. Neurobiol Aging [Internet]. 1988 [citado 4 feb 2022];9(4):371-5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3141824/>
136. Chen TS, Richie JP Jr, Lang CA. The effect of aging on glutathione and cysteine levels in different regions of the mouse brain. Proc Soc Exp Biol Med [Internet]. 1989 [citado 4 feb 2022];190(4):399-402. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2928355/>
137. Emir UE, Deelchand D, Henry PG, Terpstra M. Noninvasive quantification of T2 and concentrations of ascorbate and glutathione in the human brain from the same double-edited spectra. NMR Biomed [Internet]. 2011 [citado 5 feb 2022];24(3):263-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20925125/>
138. Guo N, McIntosh C, Shaw C. Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. Neuroscience [Internet]. 1992 [citado 7 feb 2022];51(4):835-42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1336827/>
139. Ogita K, Yoneda Y. Temperature-dependent and -independent apparent binding activities of [3H]glutathione in brain synaptic membranes. Brain Res [Internet]. 1988 [citado 7 feb 2022], 463, 37–46.

140. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* [Internet]. 2000 [citado 8 feb 2022];267(16):4912-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10931173/#:~:text=Glutathione%20is%20involved%20in%20the,of%20glutathione%20precursors%20to%20neurons>.
141. Belrose JC, Xie YF, Gierszewski LJ, MacDonald JF, Jackson MF. Loss of glutathione homeostasis associated with neuronal senescence facilitates TRPM2 channel activation in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Mol Brain* [Internet]. 2012 [citado 10 feb 2022];5:11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22487454/>
142. Huang J, Philbert MA. Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. *Brain Res* [Internet]. 1995 [citado 12 feb 2022];680(1-2):16-22. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7663973/>
143. Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1985 [citado 16 feb 2022];82(14):4668-72. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3860816/>
144. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol* [Internet]. 2014 [citado 23 feb 2022];5:151. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4079069/>
145. Oja SS, Janáky R, Varga V, Saransaari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem Int* [Internet]. 2000 [citado 23 feb 2022]; 37(2-3):299-306. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10812215/#:~:text=A%20number%20of%20Recent%20neurochemical,other%20excitatory%20amino%20acid%20receptors>.

146. Shen XM, Dryhurst G. Oxidation chemistry of (-)-norepinephrine in the presence of L-cysteine. *J Med Chem* [Internet]. 1996 [citado 23 feb 2022];39(10):2018-29. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8642560/>
147. Aizenman E, Lipton SA, Loring RH. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* [Internet]. 1989 [citado 24 feb 2022];2(3):1257-63. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2696504/>
148. Choi YB, Lipton SA. Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2000 [citado 24 feb 2022];57(11):1535-41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11092448/#:~:text=Redox%20modulation%20has%20been%20recognized,decrease%2C%20NMDA%20Devoked%20currrents.>
149. Gozlan H, Ben-Ari Y. NMDA receptor redox sites: Are they targets for selective neuronal protection? *Trends Pharmacol. Sci* [Internet]. 1995 [citado 27 feb 2022]; 16, 368–374. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016561470089077X>
150. Sullivan JM, Traynelis SF, Chen HS, Escobar W, Heinemann SF, Lipton SA. Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron* [Internet]. 1994 [citado 27 feb 2022];13(4):929-36. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7524561/>
151. Beiswanger CM, Diegmann MH, Novak RF, Philbert MA, Graessle TL, Reuhl KR, Lowndes HE. Developmental changes in the cellular distribution of glutathione and glutathione S-transferases in the murine nervous system. *Neurotoxicology* [Internet]. 1995 [citado 27 feb 2022];16(3):425-40. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8584275/>
152. Tong J, Fitzmaurice PS, Moszczynska A, Mattina K, Ang LC, Boileau I, Furukawa Y, Sailasuta N, Kish SJ. Do glutathione levels decline in aging human brain? *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2016 [citado 2 mar 2022];93:110-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26845616/>

153. Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol* [Internet]. 1997 [citado 2 mar 2022];387(2):167-78. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9336221/>
154. Ostrakhovitch EA, Semenikhin OA. The role of redox environment in neurogenic development. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2013 [citado 3 mar 2022];534(1-2):44-54. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22910298/>
155. Rice ME, Russo-Menna I. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience* [Internet]. 1998 [citado 4 mar 2022];82(4):1213-23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9466441/>
156. Tong J, Furukawa Y, Sherwin A, Hornykiewicz O, Kish SJ. Heterogeneous intrastriatal pattern of proteins regulating axon growth in normal adult human brain. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2011 [citado 4 mar 2022];41(2):458-68. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21029775/>
157. Bermejo P, Martín-Aragón S, Benedí J, Susín C, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM. Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment. *Free Radic Res* [Internet]. 2008 [citado 8 mar 2022];42(2):162-70. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18297609/>
158. Mandal PK, Tripathi M, Sugunan S. Brain oxidative stress: detection and mapping of anti-oxidant marker 'Glutathione' in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2012 [citado 8 mar 2022]; 417(1):43–48. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/51837370\\_Brain\\_oxidative\\_stress\\_Detection\\_and\\_mapping\\_of\\_anti-oxidant\\_marker\\_'Glutathione'\\_in\\_different\\_brain\\_regions\\_of\\_healthy\\_malefe](https://www.researchgate.net/publication/51837370_Brain_oxidative_stress_Detection_and_mapping_of_anti-oxidant_marker_'Glutathione'_in_different_brain_regions_of_healthy_malefe)

[male MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spec](#)

159. Sasaki T, Senda M, Kim S, Kojima S, Kubodera A. Age-related changes of glutathione content, glucose transport and metabolism, and mitochondrial electron transfer function in mouse brain. *Nucl Med Biol* [Internet]. 2001 [citado 8 mar 2022];28(1):25-31. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11182561/>
160. Hussain S, Slikker W Jr, Ali SF. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Dev Neurosci* [Internet]. 1995 [citado 9 mar 2022];13(8):811-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8770654/>
161. de la Asuncion JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J, Viña J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* [Internet]. 1996 [citado 9 mar 2022];10(2):333-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8641567/>
162. Ravindranath V, Shivakumar BR, Anandatheerthavarada HK. Low glutathione levels in brain regions of aged rats. *Neurosci Lett* [Internet]. 1989 [citado 9 mar 2022];101(2):187-90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2771164/>
163. Sandhu SK, Kaur G. Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontology* [Internet]. 2002 [citado 12 mar 2022];3(3):161-73. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12075135/>
164. Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Colombrita C, Spadaro F, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM. Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2004 [citado 12 mar 2022];125(4):325-35. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15063109/>

165. Rikans LE, Moore DR. Effect of aging on aqueous-phase antioxidants in tissues of male Fischer rats. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1988 [citado 14 mar 2022];966(3):269-75. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3416012/>
166. Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2005 [citado 14 mar 2022];4(2):288-314. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15936251/#:~:text=This%20upregulation%20in%20glutathione%20provides,risk%20of%20succumbing%20to%20stres s.>
167. Moyse E, Arseneault M, Gaudreau P, Ferland G, Ramassamy C. Gender- and region-dependent changes of redox biomarkers in the brain of successfully aging LOU/C rats. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2015 [citado 14 mar 2022];149:19-30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25956602/>
168. Zhu Y, Carvey PM, Ling Z. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. *Brain Res* [Internet]. 2006 [citado 13 mar 2022];1090(1):35-44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16647047/#:~:text=The%20results%20suggested%20a%20significant,of%20the%20GSH%2FGSSG%20ratio.>
169. Wang H, Liu H, Liu RM. Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice. *Exp Gerontol* [Internet]. 2003 [citado 10 mar 2022];38(5):507-17. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12742528/#:~:text=In%20this%20study%2C%20we%20demonstrated,than%20did%20female%20mice%20in>
170. Benuck M, Banay-Schwartz M, DeGuzman T, Lajtha A. Effect of food deprivation on glutathione and amino acid levels in brain and liver of young and aged rats. *Brain Res* [Internet]. 1995 [citado 3 mar 2022];678(1-2):259-64. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7620894/>
171. Iskusnykh IY, Zakharova AA, Pathak D. Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules* [Internet]. 2022 [citado 16 mar 2022];27(1):324.

Disponibile en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8746815/#:~:text=Impairment%20of%20glutathione%20function%20in,%2C%20stroke%2C%20and%20Alzheimer's%20disease>

172. Dourado DF, Fernandes PA, Ramos MJ. Mammalian cytosolic glutathione transferases. *Curr Protein Pept Sci* [Internet]. 2008 [citado 16 mar 2022];9(4):325-37. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18691123/>
173. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2005 [citado 16 mar 2022];45:51-88. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15822171/>
174. Carder PJ, al-Nafussi A, Rahilly M, Lauder J, Harrison DJ. Glutathione S-transferase detoxication enzymes in cervical neoplasia. *J Pathol* [Internet]. 1990 [citado 16 mar 2022];162(4):303-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2290115/>
175. Carder PJ, Hume R, Fryer AA, Strange RC, Lauder J, Bell JE. Glutathione S-transferase in human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 1990 [citado 16 mar 2022];16(4):293-303. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2234311/#:~:text=The%20glutathione%20S%2Dtransferases%20are,level%20of%20expression%20during%20development.>
176. Baez S, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson AS, Mannervik B. Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem J* [Internet]. 1997 [citado 2 mar 2022];324 ( Pt 1)(Pt 1):25-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9164836/>
177. Kim HG, Hong SM, Kim SJ, Park HJ, Jung HI, Lee YY, Moon JS, Lim HW, Park EH, Lim CJ. Age-related changes in the activity of antioxidant and redox enzymes in rats. *Mol Cells* [Internet]. 2003 [citado 2 mar

- 2022];16(3):278-84. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14744015/>
178. Sun X, Wang JF, Tseng M, Young LT. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* [Internet]. 2006 [citado 3 mar 2022];31(3):189-96. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16699605/>
179. Gawryluk JW, Wang JF, Andreatza AC, Shao L, Yatham LN, Young LT. Prefrontal cortex glutathione S-transferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2011 [citado 17 mar 2022];14(8):1069-74. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21733244/>
180. Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep* [Internet]. 2006 [citado 20 feb 2022];7(3):271-5. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16607396/#:~:text=Glutathione%20is%20a%20ubiquitous%20molecule,formation%20of%20native%20disulphide%20bonds.>
181. Chiang HS, Maric M. Lysosomal thiol reductase negatively regulates autophagy by altering glutathione synthesis and oxidation. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2011 [citado 3 mar 2022];51(3):688-99. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21640818/>
182. Ling ZD, Collier TJ, Sortwell CE, Lipton JW, Vu TQ, Robie HC, Carvey PM. Striatal trophic activity is reduced in the aged rat brain. *Brain Res* [internet]. 2000 [citado 43 mar 2022];856(1-2):301-9. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10677639/>
183. Richman PG, Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* [Internet]. 1975 [citado 11 mar 2022];250(4):1422-6. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1112810/>



184. Bessières B, Cruz E, Alberini CM. Metabolomic profiling reveals a differential role for hippocampal glutathione reductase in infantile memory formation. *Elife*. [Internet]. 2021 [citado 5 feb 2022];10:e68590. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34825649/>
185. Travaglia A, Bisaz R, Cruz E, Alberini CM. Developmental changes in plasticity, synaptic, glia and connectivity protein levels in rat dorsal hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* [Internet]. 2016 [citado 15 mar 2002];135:125-138. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27523749/>
186. Gawryluk JW, Wang JF, Andrezza AC, Shao L, Young LT. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2011 [citado 11 mar 2022];14(1):123-30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20633320/>
187. Ahmed FE. Toxicological effects of ethanol on human health. *Crit Rev Toxicol*. [Internet.]1995 [citado 21 de feb 2022];25(4):347-67. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7576156/>
188. Wilson DF, Matschinsky FM. Ethanol metabolism: The good, the bad, and the ugly. *Medical Hypotheses* [Internet]. 2020 [citado 14 feb 2022]; 140, 109638. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987720300797>
189. Vestal RE, McGuire EA, Tobin JD, Andres R, Norris AH, Mezey E. Aging and ethanol metabolism. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 1977 [citado 12 feb 2022];21(3):343-54. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/837653/>
190. Hernández-Rodríguez S, Gutiérrez-Salinas J, García-Ortíz L, Modragón-Terán P, Ramírez-García S, Núñez-Ramos NR. Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. *Med Int Méx* [Internet]. 2014 [citado 20 feb 2022];30:295-308. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2014/mim143i.pdf>

191. Lundgaard I, Wang W, Eberhardt A, Vinitsky HS, Reeves BC, Peng S, Lou N, Hussain R, Nedergaard M. Beneficial effects of low alcohol exposure, but adverse effects of high alcohol intake on glymphatic function. *Sci Rep* [Internet]. 2018 [citado 9 feb 2022];8(1):2246. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5797082/>
192. Brust JC. Ethanol and cognition: indirect effects, neurotoxicity and neuroprotection: a review. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2010 [citado 14 feb 2022];7(4):1540-57. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20617045/>
193. Adamson SS, Brace LE, Kennedy BK. Alcohol and aging: From epidemiology to mechanism. *Translational Medicine of Aging* [Internet]. 2017 [citado 2 feb 2022], 1, 18–23. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468501117300111>
194. Klatsky AL, Friedman GD, Siegelaub AB. Alcohol consumption before myocardial infarction. Results from the Kaiser-Permanente epidemiologic study of myocardial infarction. *Ann Intern Med* [Internet]. 1974 [citado 8 mar 2022];81(3):294-301. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4850474/>
195. Beasley MJ, Macfarlane TV, Macfarlane GJ. Is alcohol consumption related to likelihood of reporting chronic widespread pain in people with stable consumption? Results from UK biobank. *Pain* [Internet]. 2016 [citado 27 feb 2022];157(11):2552-2560. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27437785/#:~:text=Studies%20have%20suggested%20that%20alcohol,people%20with%20CWP%20or%20fibromyalgia>
196. Knott C S, Coombs N, Stamatakis E, Biddulph J P. All cause mortality and the case for age specific alcohol consumption guidelines: pooled analyses of up to 10 population based cohorts. *BMJ* [Internet]. 2015 [citado 27 feb 2022]; 350 :h384. Disponible en: <https://www.bmj.com/content/350/bmj.h384>

197. Li J, Li C, Loreno EG, Miriyala S, Panchatcharam M, Lu X, Sun H. Chronic Low-Dose Alcohol Consumption Promotes Cerebral Angiogenesis in Mice. *Front. Cardiovasc. Med* [Internet]. 2021 [citado 8 mar 2022];, 17. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2021.681627/full>
198. la Porte C, Voduc N, Zhang G, Seguin I, Tardiff D, Singhal N, Cameron DW. Steady-State pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000 mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2010 [citado 11 mar 2022];49(7):449-54. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20528005/>
199. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health* [Internet]. 2006 [citado 13 feb 2022];29(4):245-54. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6527027/>
200. Heit C, Dong H, Chen Y, Thompson DC, Deitrich RA, Vasiliou VK. The role of CYP2E1 in alcohol metabolism and sensitivity in the central nervous system. *Subcell Biochem* [Internet]. 2013 [citado 13 feb 2022];67:235-47. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23400924/#:~:text=Catalase%20and%20cytochrome%20P450%20E1,localized%20to%20particular%20brain%20regions.>
201. Farfán Labonne BE, Gutiérrez M, Gómez-Quiroz LE, Königsberg Fainstein M, Bucio L, Souza V, ... Gutiérrez-Ruiz MC. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. *Cell Biology and Toxicology* [Internet]. 2009 [citado 12 mar 2022], 25(6), 599–609. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10565-008-9115-5>
202. Ledig M, M'Paria JR, Mandel P. Superoxide dismutase activity in rat brain during acute and chronic alcohol intoxication. *Neurochem Res* [Internet]. 1981 [citado 12 mar 2022];6(4):385-90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7196509/>
203. Brocardo PS, Gil-Mohapel J, Wortman R, Noonan A, McGinnis E, Patten AR, Christie BR. The Effects of Ethanol Exposure During Distinct

- Periods of Brain Development on Oxidative Stress in the Adult Rat Brain. Alcohol Clin Exp Res [Internet]. 2017 [citado 15 mar 2022];41(1):26-37. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27862017/>
204. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry [Internet]. 2011 [citado 15 mar 2022] 29;35(3):676-92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20471444/>
205. Crews FT, Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. Alcohol Alcohol [Internet]. 2009 [citado 15 mar 2022];44(2):115-27. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2948812/#:~:text=Regeneration%20of%20brain%20occurs%20during,in%20neurogenic%20hippocampal%20dentate%20gyrus.>
206. Hare BD, Duman RS. Prefrontal cortex circuits in depression and anxiety: contribution of discrete neuronal populations and target regions. Mol Psychiatry [Internet]. 2020 [citado 16 mar 2022];25(11):2742-2758. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32086434/>
207. Farfán Labonne BE, Gutiérrez M, Gómez-Quiroz LE, Königsberg Fainstein M, Bucio L, Souza V, Flores O, Ortiz V, Hernández E, Kershenovich D, Gutiérrez-Ruíz MC. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. Cell Biology and Toxicology [Internet]. 2009 [citado 12 mar 2022]; 25(6), 599–609. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10565-008-9115-5>
208. Burr ML. Explaining the French paradox. J R Soc Health [Internet]. 1995 [citado 12 mar 2022];115(4):217-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7562866/>
209. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2006 [citado 16 mar 2022];5(6):493-506. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16732220/>

210. Blagosklonny MV. Aging is not programmed: genetic pseudo-program is a shadow of developmental growth. *Cell Cycle* [Internet]. 2013 [citado 16 mar 2022];12(24):3736-42. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3905065/>
211. Teschendorff AE. Epigenetic aging: Insights from network biology. *Aging* [Internet]. 2013 [citado 16 mar 2022]; 5, 719–720. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/258064354\\_Epigenetic\\_aging\\_insights\\_from\\_network\\_biology](https://www.researchgate.net/publication/258064354_Epigenetic_aging_insights_from_network_biology)
212. Soares JP, Cortinhas A, Bento T, Leitão JC, Collins AR, Gaivão I, Mota MP. Aging and DNA damage in humans: a meta-analysis study. *Aging* (Albany NY) [Internet]. 2014 [citado 16 mar 2022];6(6):432-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25140379/>
213. Stauch KL, Purnell PR, Fox HS. Aging synaptic mitochondria exhibit dynamic proteomic changes while maintaining bioenergetic function. *Aging* (Albany NY) [Internet]. 2014 [citado 16 mar 2022];6(4):320-34. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24827396/#:~:text=During%20the%20process%20of%20aging,overall%20maintenance%20of%20mitochondrial%20function.>
214. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* [Internet]. 2006 [citado 17 mar 2022];444(7117):337-42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17086191/>
215. Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Baur JA, Boyd AR, de Cabo R, Fernandez E, Flurkey K, Javors MA, Nelson JF, Orihuela CJ, Pletcher S, Sharp ZD, Sinclair D, Starnes JW, Wilkinson JE, Nadon NL, Strong R. Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* [Internet]. 2011 [citado 17 mar 2022];66(2):191-201. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20974732/#:~:text=Rapamycin%20attenuated%20age%2Dassociated%20decline,in%20male%20or%20female%20mic>  
[e](#).

216. Poulsen MM, Vestergaard PF, Clasen BF, Radko Y, Christensen LP, Stødkilde-Jørgensen H, Møller N, Jessen N, Pedersen SB, Jørgensen JO. High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition. *Diabetes* [Internet]. 2013 [citado 17 mar 2022];62(4):1186-95. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23193181/>
217. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2004 [citado 17 mar 2022];32(12):1377-82. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15333514/>
218. Olesen J, Gliemann L, Biensø R, Schmidt J, Hellsten Y, Pilegaard H. Exercise training, but not resveratrol, improves metabolic and inflammatory status in skeletal muscle of aged men. *J Physiol* [Internet]. 2014 [citado 17 mar 2022];592(8):1873-86. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24514907/#:~:text=In%20conclusion%2C%20resveratrol%20did%20not,and%20inflammation%20in%20skeletal%20muscle>.
219. Smoliga JM, Colombo ES, Campen MJ. A healthier approach to clinical trials evaluating resveratrol for primary prevention of age-related diseases in healthy populations. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2013 [citado 16 mar];5(7):495-506. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24073437/>
220. Thompson AM, Martin KA, Rzucidlo EM. Resveratrol induces vascular smooth muscle cell differentiation through stimulation of SirT1 and AMPK. *PLoS One* [Internet]. 2014 [citado 18 mar 2022];9(1):e85495. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24416418/>

221. Szende B, Tyihák E, Király-Véghely Z. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exp Mol Med* [Internet]. 2000 [citado 17 mar 2022];32(2):88-92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10926121/>
222. Jagdeo J, Adams L, Lev-Tov H, Sieminska J, Michl J, Brody N. Dose-dependent antioxidant function of resveratrol demonstrated via modulation of reactive oxygen species in normal human skin fibroblasts in vitro. *J Drugs Dermatol* [Internet]. 2010 [citado 17 mar 2022];9(12):1523-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21120261/>
223. Stocco B, Toledo K, Salvador M, Paulo M, Koyama N, Torqueti Tolo MR. Dose-dependent effect of resveratrol on bladder cancer cells: chemoprevention and oxidative stress. *Maturitas* [Internet]. 2012 [citado 17 mar 2022];72(1):72-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22386766/>
224. Peltz L, Gomez J, Marquez M, Alencastro F, Atashpanjeh N, Quang T, Bach T, Zhao Y. Resveratrol exerts dosage and duration dependent effect on human mesenchymal stem cell development. *PLoS One* [Internet]. 2012 [citado 17 mar 2022];7(5):e37162. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22615926/>
225. Elliott P, Walpole S, Morelli L, Lambert P, Lunsman W, Westphal C, Lavu S. Resveratrol /SRT-501. *Drugs Future* [Internet]. 2009 [citado 17 mar 2022]; 34, 291–295. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/247829676\\_ResveratrolSRT-501](https://www.researchgate.net/publication/247829676_ResveratrolSRT-501)
226. Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, Booth TD, Crowell JA, Perloff M, Gescher AJ, Steward WP, Brenner DE. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2007 [citado 17 mar 2022];16(6):1246-52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17548692/>
227. Amiot MJ, Romier B, Dao TM, Fanciullino R, Ciccolini J, Burcelin R, Pechere L, Emond C, Savouret JF, Seree E. Optimization of trans-

- Resveratrol bioavailability for human therapy. *Biochimie* [Internet]. 2013 [citado 16 mar 2022];95(6):1233-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23376875/>
228. Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcão A, Soares E, Costa R, Loureiro AI, Fernandes-Lopes C, Rocha JF, Nunes T, Wright L, Soares-da-Silva P. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2009 [citado 18 mar 2022];53 Suppl 1:S7-15. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19194969/>
229. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol* [Internet]. 2012 [citado 19 mar 2022];3:141. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398412/>
230. Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1999 [citado 19 mar 2022];58(5):759-65. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10449184/>
231. MacCarrone M, Lorenzon T, Guerrieri P, Agrò AF. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur J Biochem* [Internet]. 1999 [citado 19 mar 2022];265(1):27-34. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10491155/>
232. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1997 [citado 19 mar 2022];17(11):2744-52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9409251/>



233. Virgili M, Contestabile A. Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. *Neurosci Lett* [Internet]. 2000 [citado 19 mar 2022];281(2-3):123-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10704758/>
234. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat* [Internet]. 1996 [citado 19 mar 2022];10(3-4):179-90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8811421/#:~:text=NO%20has%20many%20roles%20in,in%20animal%20models%20of%20stroke.>
235. Plumb GW, De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Cheynier V, Williamson G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic Res* [Internet]. 1998 [citado 20 mar 2022];29(4):351-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9860050/>
236. Kostyuk VA, Potapovich AI. Antiradical and chelating effects in flavonoid protection against silica-induced cell injury. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1998 [citado 20 mar 2022];355(1):43-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9647665/>
237. Nanjo F, Mori M, Goto K, Hara Y. Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 1999 [citado 1 mar 2022];63(9):1621-3. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10610125/>
238. Rege SD, Kumar S, Wilson DN, Tamura L, Geetha T, Mathews ST, Huggins KW, Broderick TL, Babu JR. Resveratrol protects the brain of obese mice from oxidative damage. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2013 [citado 1 mar 2022];419092. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24163719/#:~:text=Administration%20of%20Resveratrol%20decreased%20lipid.brain%20tissue%20of%20obese%20mice.>
239. Ates O, Cayli SR, Yucel N, Altinoz E, Kocak A, Durak MA, Turkoz Y, Yologlu S. Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-

- induced diabetic rats. *J Clin Neurosci* [Internet]. 2007 [citado 1 mar 2022];14(3):256-60. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17258134/#:~:text=Treatment%20with%20Resveratrol%20significantly%20reduced,agent%20against%20diabetic%20oxidative%20damage.>
240. Liu S, Li T, Liu H, Wang X, Bo S, Xie Y, Bai X, Wu L, Wang Z, Liu D. 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. *Behav Brain Res* [Internet]. 2016 [citado 2 mar 2022];302:191-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26801825/#:~:text=and%20prefrontal%20cortex-Resveratrol%20exerts%20antidepressant%20properties%20in%20the%20chronic%20unpredictable%20mild%20stress,Behav%20Brain%20Res.>
241. Farkhondeh T, Folgado SL, Pourbagher-Shahri AM, Ashrafizadeh M, Samarghandian S. The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2020 [citado 2 mar 2022]; 127, 110234. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332220304261>
242. Vasconcelos AR, dos Santos NB, Scavone C, Munhoz CD. Nrf2/ARE Pathway Modulation by Dietary Energy Regulation in Neurological Disorders. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2019 [citado 5 mar 2022]; 10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00033/full>
243. Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, You QD. The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Med Res Rev* [Internet]. 2016 [citado 5 mar 2022];36(5):924-63. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27192495/>
244. Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA. Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J* [Internet]. 2005 [citado 11 mar 2022];19(9):1061-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15985529/>

245. Narasimhan M, Rajasekaran NS. Exercise, Nrf2 and Antioxidant Signaling in Cardiac Aging. *Front Physiol* [Internet]. 2016 [citado 11 mar 2022];7:241. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4911351/>
246. Hur W, Gray NS. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2011 [citado 15 mar 2022];15(1):162-73. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21195017/>
247. Copple IM. The Keap1-Nrf2 cell defense pathway--a promising therapeutic target? *Adv Pharmacol* [Internet]. 2012 [citado 15 mar 2022];63:43-79. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22776639/>
248. Liu M, Grigoryev DN, Crow MT, Haas M, Yamamoto M, Reddy SP, Rabb H. Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice. *Kidney Int* [Internet]. 2009 [citado 16 mar 2022];76(3):277-85. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19436334/#:~:text=Our%20study%20demonstrates%20that%20Nrf2,therapeutic%20target%20in%20these%20injuries.>
249. Kong D, Yan Y, He X-Y, Yang H, Liang B, Wang J, He Y, Ding Y, Yu H. (2019). Effects of Resveratrol on the Mechanisms of Antioxidants and Estrogen in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* [Internet]. 2019 [citado 14 mar 2022]; 1–8. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/8983752/>
250. Chiang MC, Nicol CJ, Cheng YC. Resveratrol activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against amyloid-beta-induced inflammation and oxidative stress. *Neurochem Int* [Internet]. 2018 [citado 14 mar 2022];115:1-10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28989083/#:~:text=and%20oxidative%20stress-.Resveratrol%20activation%20of%20AMPK%2Ddependent%20pathways%20is%20neuroprotective%20in%20human,Neurochem%20Int.>

251. Hui Y, Chengyong T, Cheng L, Haixia H, Yuanda Z, Weihua Y. Resveratrol Attenuates the Cytotoxicity Induced by Amyloid- $\beta_{1-42}$  in PC12 Cells by Upregulating Heme Oxygenase-1 via the PI3K/Akt/Nrf2 Pathway. *Neurochem Res* [Internet]. 2018 [citado 15 mar 2022];43(2):297-305. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29090409/>
252. Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* [Internet]. 2006 [citado 2 mar 2022];209(Pt 12):2304-11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16731806/>
253. Araque A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* [Internet]. 2008 [citado 20 feb 2022];4(1):3-10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19250562/>
254. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2001 [citado 21 feb 2022];63:795-813. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11181976/>
255. Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 [citado 19 mar 2022];99(6):4037-42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11891290/#:~:text=The%20results%20indicate%20that%20S100B,information%20processing%20in%20the%20brain.>
256. Perea G, Araque A. GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev* [Internet]. 2010 [citado 19 mar 2022];63(1-2):93-102. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19896978/#:~:text=This%20new%20vision%20is%20based,regulate%20synaptic%20efficacy%20and%20plasticity.>
257. Salmina AB. Neuron-glia interactions as therapeutic targets in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2009 [citado 18 mar 2022];16(3):485-502. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19276541/>
258. Markiewicz I, Lukomska B. The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* [Internet]. 2006 [citado 18 mar 2022];66(4):343-58. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17265695/#:~:text=Astrocytes%20are%20the%20main%20class,and%20trophic%20support%20for%20them.>

259. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* [Internet]. 2000 [citado 15 mar 2022];267(16):4904-11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10931172/>
260. Quincozes-Santos A, Andrezza AC, Nardin P, Funchal C, Gonçalves CA, Gottfried C. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology* [Internet]. 2007 [citado 26 feb 2022];28(4):886-91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17498806/>
261. Van Eldik LJ, Zimmer DB. Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res* [Internet]. 1987 [citado 26 feb 2022];436(2):367-70. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3435834/>
262. Quincozes-Santos A, Nardin P, de Souza DF, Gelain DP, Moreira JC, Latini A, Gonçalves CA, Gottfried C. The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox Res* [Internet]. 2009 [citado 26 feb 2022];16(1):30-41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19526296/>
263. Cechin SR, Dunkley PR, Rodnight R. Signal transduction mechanisms involved in the proliferation of C6 glioma cells induced by lysophosphatidic acid. *Neurochem Res* [Internet]. 2005 [citado 27 feb 2022];30(5):603-11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16176063/>
264. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2001 [citado 17 feb 2022];65(1):1-105. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11369436/>
265. Hertz L. Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III. *Neurochem Int* [Internet]. 2006 [citado 16 mar 2022];48(6-7):416-25. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16500003/>
266. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I, Asenjo M, Márquez J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2002 [citado 18

- mar 2022];34(5):439-58. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11906817/>
267. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci [Internet]. 1999 [citado 19 mar 2022];22(5):208-15. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10322493/>
268. Banerjee R, Vitvitsky V, Garg SK. The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission. Trends Biochem Sci [Internet]. 2008 [citado 20 mar 2022];33(9):413-9. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18703339/>
269. dos Santos AQ, Nardin P, Funchal C, de Almeida LM, Jacques-Silva MC, Wofchuk ST, Gonçalves CA, Gottfried C. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. Arch Biochem Biophys [Internet]. 2006 [citado 20 mar 2022];453(2):161-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16904623/>
270. de Almeida LM, Piñeiro CC, Leite MC, Brolese G, Tramontina F, Feoli AM, Gottfried C, Gonçalves CA. Resveratrol increases glutamate uptake, glutathione content, and S100B secretion in cortical astrocyte cultures. Cell Mol Neurobiol [Internet]. 2007 [citado 20 mar 2022];27(5):661-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17554623/>
271. Vieira de Almeida LM, Piñeiro CC, Leite MC, Brolese G, Leal RB, Gottfried C, Gonçalves CA. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. Neurochem Res [Internet]. 2008 [citado 20 mar 2022];33(1):8-15. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17594518/#:~:text=Our%20results%20confirm%20the%20ability,stimulating%20S100B%20secretion%2C%20which%20all>
272. Kouda K, Iki M. Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health. J Physiol Anthropol [Internet]. 2010 [citado 20 mar 2022];29(4):127-32. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20686325/#:~:text=The%20beneficial%20ef>

[fects%20of%20mild.extends%20maximum%20and%20average%20lifespan](#)

273. Day RM, Suzuki YJ. Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. Dose Response [Internet]. 2006 [citado 20 mar 2022];3(3):425-42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18648617/>
274. Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A. Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. Dev Neurosci [Internet]. 1995 [citado 20 mar 2022];17(4):203-11. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8575339/>
275. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol [Internet]. 2004 [citado 20 mar 2022];142(2):231-55. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15155533/>
276. McKenna MC. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. J Neurosci Res [Internet]. 2007 [citado 20 mar 2022];85(15):3347-58. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17847118/#:~:text=However%2C%20the%20glutamate%2Dglutamine%20cycle,on%20cellular%20requirements%20and%20priorities.>
277. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. Trends Neurosci [Internet]. 2004 [citado 20 mar 2022];27(12):735-43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15541514/>
278. Chow HH, Garland LL, Hsu CH, Vining DR, Chew WM, Miller JA, Perloff M, Crowell JA, Alberts DS. Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. Cancer Prev Res (Phila) [Internet]. 2010 [citado 20 mar 2022];3(9):1168-75. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2933312/>
279. Sharma M, Gupta YK. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment

- and oxidative stress in rats. *Life Sci* [Internet]. 2002 [citado 20 mar 2022];71(21):2489-98. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12270754/>
280. Sadi G, Konat D. Resveratrol regulates oxidative biomarkers and antioxidant enzymes in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology* [Internet]. 2015 [citado 20 mar 2022]; 1–8. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2015.1056311>
281. Arús BA, Souza DG, Bellaver B, Souza DO, Gonçalves CA, Quincozes-Santos A, Bobermin LD. Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2017 [citado 20 mar 2022];428(1-2):67-77. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28070834/>
282. Kalpana T, Sree A R, Kumar BN. *Int J Anat Res* [Internet]. 2019 [citado 20 mar 2022]; 7(3.1):6691-6700. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/sea-198580>
283. Sengupta P. Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions. *Drug Chem Toxicol* [Internet]. 2013 [citado 4 mar 2022];36(3):353-68. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22947100/>
284. The Wistar Institute: History. The Wistar Institute. 2007. [Last retrieved 2008 Sep 11]. Disponible en: <http://www.wistar.org/the-institute/our-history>
285. Pass D, Freeth G. The rat. *Anzccart News*. 1993;6:1–4.
286. Sengupta P. Challenge of infertility: How protective the yoga therapy is? *Anc Sci Life* [Internet]. 2012 [citado 27 feb 2022];32(1):61-2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3733210/>
287. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* [Internet]. 2005 [citado 1 mar 2022];21(6):775-7. . Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15925305/>
288. Sengupta P. A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How old is it in comparison with Human age? *Biomed Int* [Internet]. 2012 [citado 5 mar 2022];2:81–9. Disponible en:



<https://www.semanticscholar.org/paper/A-Scientific-Review-of-Age-Determination-for-a-Rat%3A-Sengupta/0127c296097a86c47bea00957812b4fb4f2de943>

289. Sengupta P. Health Impacts of Yoga and Pranayama: A State-of-the-Art Review. *Int J Prev Med* [Internet]. 2012 [citado 19 feb 2022];3(7):444-58. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3415184/>
290. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International journal of preventive medicine* [Internet]. 2013 [citado 13 mar 2022]; 4(6), 624–630. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23930179/>
291. Cossio-Bolaños M, Gómez Campos R, Vargas Vitoria R, Hochmuller Fogaça RT, de Arruda M. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar [Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats]. *Nutr Hosp* [Internet]. 2013 [citado 18 feb 2022];28(6):2151-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24506395/>
292. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig* [Internet]. 2012 [citado 25 feb 2022];25(1):49-51. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22569979/#:~:text=Results%3A%20Rats%20rapidly%20develop%20during,equivalent%20to%202.5%20human%20years.ars.>

## 12. ANEXOS

### I. Modelo animal y correspondencia de edad.

La rata de laboratorio es una parte inevitable de la investigación biomédica actual (283). Son reconocidos como el modelo preeminente en numerosos campos. Su uso en la investigación científica comenzó en el siglo XVI, aunque el desarrollo de la rata de laboratorio como modelo experimental realmente comenzó en 1906 cuando el Instituto Wistar desarrolló el modelo de rata Wistar (*Rattus norvegicus*) (284).

Al abordar un modelo animal para estudiar el envejecimiento, se debe establecer que el parámetro edad en un biomodelo debe corresponder al humano. En este sentido, se ha establecido que las ratas de laboratorio viven entre 2 y 3,5 años (un promedio de 3 años) (285), mientras que la expectativa de vida mundial de los humanos es de 80 años, con variaciones entre los países de acuerdo con sus condiciones socioeconómicas (286). El consenso mundial del “*lineamiento para el manejo de animales de laboratorio*” establece que la esperanza de vida en rata Wistar puede ser calculada de la siguiente manera:

$$(80 \times 365) \div (3 \times 365) = 26.7 \text{ días humanos} = 1 \text{ día en la rata.}$$

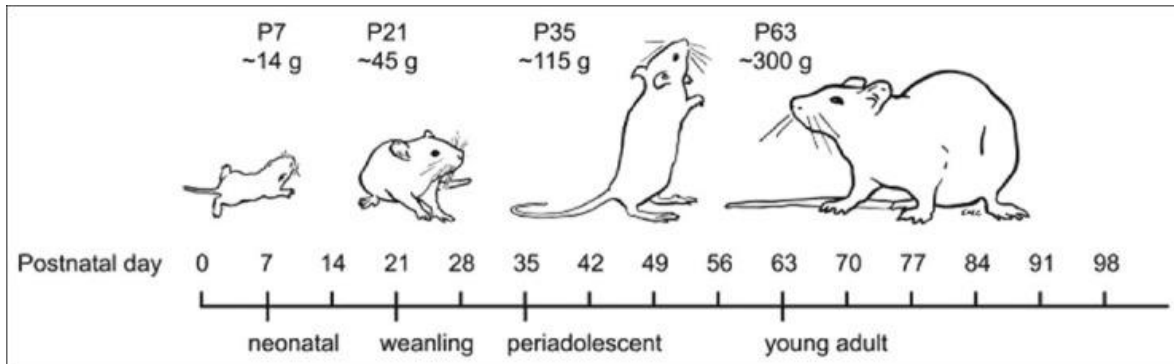
Donde: 80 es la esperanza de vida en años para humanos y 365 los días en un año. 3 corresponde a la esperanza de vida en años para la rata Wistar. De esto se puede deducir que:

$$365 \div 26.7 = 13.8 \text{ días en la rata, corresponde a 1 año en humanos.}$$

Por lo tanto, un año humano casi equivale a dos semanas de rata (13,8 días de rata) al correlacionar su vida útil completa (287, 288).

Sin embargo, al considerar las diferentes fases de la vida de las ratas, incluido el destete hasta la fase de vejez, se podría notar fácilmente que las ratas tienen una infancia breve y acelerada con respecto a los humanos. Las ratas se desarrollan rápidamente durante la infancia y alcanzan la madurez sexual alrededor de las 6 semanas de edad. Los seres humanos, por otro lado, se desarrollan

lentamente y no alcanzan la pubertad hasta los 11-12 años. La madurez social se obtiene a los 5-6 meses de edad (Figura 11) (288, 289).



**Figura 15.** Correlación del peso corporal con diferentes fases de los días posnatales. [Tomada y modificada de Pallav Sengupta, 2013] (290).

Para establecer nuestro parámetro de comparación del ritmo de crecimiento de la cepa Wistar, se consideran prepúberes a los roedores antes de los 42 días de edad, ya que diversos estudios han determinado que la pubertad se alcanza aproximadamente entre los 33 y 66 días, lo que coincide con el alcance de la madurez sexual (291), por lo que un animal es catalogado como adulto a partir de los 2-3 meses de edad. A partir de esta edad y hasta los 15-18 meses se considera un animal adulto en etapa de envejecimiento. Mientras que, a partir de los 18 meses un animal se considera senescente, o etapa de vejez, que en el humano se denomina adulto mayor o 3ª edad (292). De esta manera, en el presente trabajo, en nuestro biomodelo de experimentación se analizó el envejecimiento de la rata adulta macho de la cepa Wistar, desde la etapa de adulto hasta la senescencia.

## **II. Descripción de las técnicas de medición de las variables relevantes**

### **12.1.1 Determinación de proteínas totales**

Para la realización de la prueba bioquímica, se prosiguió de la siguiente manera:

1.- Se preparó el estándar de albúmina disolviendo por completo 1 mg de albúmina en 1 ml de solución salina sin formar espuma.

2.- Se preparó el reactivo Azul de Coomassie al 0.06% en ácido perclórico al 3%.

3.- Se elaboró una curva de calibración con el estándar de albúmina de suero bovino agregando 500  $\mu$ l de colorante Azul de Coomassie a distintas concentraciones del stock de albúmina y aforando la reacción a 1ml con agua destilada.

4.- Los tubos se agitaron y posteriormente se leó la absorbancia a 595 nm; obtener la ecuación de la recta con  $R^2 > 0.99$ .

5.- Para realizar el ensayo real con cada muestra, se tomaron 2  $\mu$ l de sobrenadante y 500  $\mu$ l de colorante Azul de Coomassie, que se combinaron en tubos Eppendorf para posteriormente pasar a la celda de cuarzo.

6.- Una vez dentro de la celda de cuarzo, se procedió a agitar y realizar la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm.

7.- La concentración de proteínas totales se determinó interpolando la absorbancia obtenida en las muestras con la curva estándar de albúmina de suero bovino calculada previamente.

### **12.1.2 Cuantificación de nitritos.**

Para la realización de la prueba bioquímica, se prosiguió de la siguiente manera:

1. Se preparó el estándar de Nitrito de Sodio a concentración de 1 mM. Se preparó una solución 1 M con 0.069 g de  $\text{NaNO}_3$  en 1 ml de agua destilada, y se realizó una dilución 1:1000.

2.- Se preparó el reactivo de Griess conformado por la solución A y la solución B. La solución A utilizó 1.32 g de sulfanilamida, 60 ml de ácido acético concentrado y 39 ml de agua destilada. La solución B utilizó 0.1 g de N-1-naftiletilendiamino y 100 ml de agua destilada. Ambas soluciones se almacenaron a 4°C protegidas de la luz.

3.- Posteriormente se adicionaron en partes iguales (1:1) el reactivo A y B para conformar el reactivo final de trabajo.

4.- Se elaboró una curva de calibración con el estándar de nitritos, adicionando 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess (1:1) y llevando a un volumen final de 1 ml con agua destilada.

5.- La absorbancia se leyó a 540 nm y se obtuvo la ecuación de la recta con una  $R^2 > 0.99$

6.- Para realizar el ensayo con la muestra, se colocaron 30  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess (1:1), 20  $\mu\text{l}$  de sobrenadante, aforando con 260  $\mu\text{l}$  de agua destilada.

7.- Las muestras con el reactivo se incubaron durante 10 minutos y su absorbancia se leyó posteriormente a 540 nm.

8.- Se determinó la concentración de nitritos interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar de Nitrito de Sodio.

### **12.1.3 Cuantificación de MDA + 4HDA.**

Para la realización de la prueba bioquímica, se prosiguió de la siguiente manera:

1.- Se preparó una solución de I de N-metil-2-fenil-indol disolviendo 38 mg en 18 ml de acetonitrilo [10.3mM], antes de emplear la solución I, esta se diluyó adicionando 6 ml de metanol hasta alcanzar un volumen final de 24 ml.

2.- Se preparó la solución II estándar de 1,1,3,3-tetrametoxipropano logrando una concentración de 10mM. Para esto se adicionaron 16.5  $\mu$ L de solución de tetrametoxipropano (densidad= 0.997 g/ml) en 10 ml de agua destilada. Antes de su uso, la solución II también se diluyó (500  $\mu$ L de la solución en 50 ml de agua destilada).

3. Se mezclaron en un tubo Eppendorff:

- Para determinar MDA
  - 650  $\mu$ l de solución diluida II
  - 200  $\mu$ l de muestra
  - Se agitaron y pasaron por el vortex.
  - Se adicionaron 150  $\mu$ l de Ácido clorhídrico al 35%.
- Para determinar MDA + 4HDA
  - 650  $\mu$ l de solución diluida I
  - 200  $\mu$ l de muestra
  - Se agitaron y pasaron por el vortex.
  - Se adicionaron 150  $\mu$ l de Ácido metanosulfónico al 35%.

4.- Ambos se incubaron a 45°C durante 40 minutos (MDA) o 1 hora (MDA + HDA).

5.- Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se centrifugaron a 3000 RPM durante 15 minutos.

6. La absorbancia fue leída en el espectrofotómetro a 585 nm.

15.- La concentración de MDA o MDA+4-HDA se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras con los resultados obtenidos con la curva estándar de la solución II. La concentración de 4-HDA se determinó matemáticamente mediante la resta de los resultados obtenidos en ambas pruebas.

#### **12.1.4 Determinación de actividad enzimática de CAT.**

Para la realización de la prueba enzimática, se prosiguió de la siguiente manera:

Se prepararon el reactivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30mM (diluyendo 408 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% para preparar 120 ml) y un buffer de fosfato de potasio (a base de fosfato monobásico y dibásico de potasio) a una concentración de 50 mM.

##### 1.- Procedimiento:

Se adicionaron en una celda de cuarzo:

- 655 microlitros del buffer de fosfatos (se revisó que el pH era de 7.4 antes de ser utilizado).
- Se añadieron 330 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Se agregará 15 µL del homogenado.

2. Se realizó la mezcla por agitación de los reactivos y se procedió a hacer la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 240 nm, con un monitoreo de hasta 90 segundos dependiendo de los resultados en la lectura. Los cálculos se realizaron mediante la diferencia obtenida entre la absorbancia en el minuto final y el minuto inicial de la reacción.

#### **12.1.5 Determinación de actividad enzimática de SOD.**

Para la realización de la prueba enzimática, se prosiguió de la siguiente manera:

Se llevó a cabo la preparación de tres reactivos: solución de pirogalol al 7.37 mM (que se obtuvo por la disolución de 9.3 mg de pirogalol en 10 ml de agua destilada), EDTA disódico a 60mM (obtenido de la mezcla de 223.3 g de EDTA en 10 ml de agua destilada)

##### 1. Preparación del ensayo blanco.

- Se mezcló con una cubeta:
  - 933 µL de Tris-HCl

- 33  $\mu\text{L}$  agua destilada
  - 16.6  $\mu\text{L}$  de EDTA 60 mM
  - 16.6  $\mu\text{L}$  de Pirogallol
- Se dejaron reaccionar por 10 segundos.
  - Posteriormente se blanqueó y se realizó la medición, que fue leída a 420 nm con monitoreo durante 1 minuto.

La  $\Delta\text{DO}$  del blanco coincidió con los valores  $0.020 \pm 0.001$

2.- Ensayo real (procedimiento):

- Se mezcló en una cubeta de cuarzo:
  - 700  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl
  - 50  $\mu\text{L}$  de EDTA 60 mM
  - 100  $\mu\text{L}$  de muestra
  - 100  $\mu\text{L}$  de Pirogallol
- Se dejó reaccionar por 10 segundos. Se realizó el blanqueo y la medición comenzó a partir de ese momento. La lectura del espectrofotómetro se realizó a una absorbancia de 420 nm y se monitoreó la reacción durante 1 minuto anotando las lecturas cada 10 segundos.

#### **12.1.6 Cuantificación de glutatión total y oxidado.**

Para la realización de la prueba bioquímica, se prosiguió de la siguiente manera:

- 1.- Para la preparación del KPE:
  - Se preparó la solución A mezclando 6.8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 500 ml de agua destilada. La solución se mantuvo en condiciones de frío a  $4^\circ\text{C}$ .
  - Se preparó la solución B mezclando  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en 500 ml de agua destilada. De igual manera, se mantuvo a  $4^\circ\text{C}$ .



- Para la preparación final: se mezcló en proporción de 16 ml de la solución A + 84 ml de solución B. Se ajustó el pH a 7.5 y se añadieron 0.327 g de EDTA.

2.- Se preparó el buffer de extracción: para este proceso, se añadieron 20 ml de KPE, 20 microlitros de Tritón x-100 y 120 mg de ácido sulfosalicílico. El pH tuvo que ajustarse a 7.5.

3. Otros reactivos (al momento de su preparación, se protegieron de la luz y se mantuvieron en frío):

- 2-vinilpiridina. Se preparó en dilución 1:10 con KPE.
- Trietanolamina. Se preparó en dilución 1:6 con KPE.
- DNTB. Se añadieron 2 mg de DNTB en 3 ml de KPE.
- NADPH. Se añadieron 2 mg de NADPH en 3 ml de KPE.
- Glutación reductasa. 40 microlitros en 3 ml de KPE.

#### 4. Procedimientos:

- Glutación total: Se añadieron en la placa para su lectura:
  - Muestra: 20 microlitros. La muestra se centrifugó con el buffer de extracción previamente.
  - DNTB - 60 microlitros.
  - Glutación reductasa – 60 microlitros.
  - Una vez añadidos los reactivos, se esperó durante un periodo de 30 segundos antes de proseguir.
  - Se dispensó el reactivo NADPH: 60 microlitros.
  - Una vez añadido, se realizó la lectura a 412 nm.
  - La reacción se monitoreó a los 0, 60, 120, 180 segundos, con impresión de los valores registrados.

- Glutación oxidado:
  - Muestra: 100 microlitros. La muestra se centrifugó con el buffer de extracción previamente.
  - Vinilpiridina - 2 microlitros.
  - Ambos compuestos se mezclaron en vortex y se dejaron reposar 1 hora a temperatura ambiente.
  - Se dispensó la trietanolamina – 6 microlitros.
  - La mezcla se cerró, tapar y mezclar bien, y dejar reposar 10 minutos.
  - Se dispensó en la placa para su lectura, de la mezcla obtenida ya reposada: 20 microlitros.
    - Se añadió la glutación reductasa + DNTB (1:1) – 120 microlitros.
    - Se esperó duranter 30 segundos.
    - Se dispensó NAPDH – 60 microlitros.
    - Se realizó la lectura a 412 nm.
    - La reacción se monitoreó a los 0, 60, 120, 180 segundos.

### **12.1.7 Determinación de actividad enzimática de glutación peroxidasa.**

Para la realización de la prueba enzimática, se prosiguió de la siguiente manera:

1. Se preparó un buffer de sucrosa:

Para prepararse fue necesario tener (o preparar) un buffer de fosfatos 1x al 50 mM, al menos 50 ml, al que se le adicionó KCl al 15% (se adicionaron 0.575 gr para 50 ml de PBS). Se ajustó el pH a 7.6 y añadió a la solución la sucrosa al 0.25 M.

2. Reactivo de acoplamiento:

Este reactivo estuvo compuesto por:

- Buffer Tris HCl. Se preparó con Tris y con agua destilada. El pH se ajustó a 7.6 con HCl diluido.

- EDTA disódico (a concentración 2 mM). Para preparar 100 ml del buffer de acoplamiento se necesitaron 33.6 gr.

- NaN<sub>3</sub> (azida de sodio a concentración 1mM). Para preparar 100 ml del buffer de acoplamiento se necesitaron 6.5 gr.

- Glutación reducido (GSH, a concentración 1 mM). Para preparar 100 ml del buffer de acoplamiento se necesitaron 30 gr.

- NADPH (a concentración de 0.2 mM). Para preparar 100 ml del buffer de acoplamiento se necesitaron 16.7 gr.

- Glutación reductasa. Para preparar 100 ml del buffer de acoplamiento se necesitaron 100 unidades.

3. Sustrato de hidroperóxido al 30% con buffer Tris-HCl.

4. Procedimiento:

- Muestra: 100 microlitros.

- Reactivo de acoplamiento – 875 microlitros

- Se dejó incubar la placa dentro del lector a 37 °C durante al menos tres minutos para favorecer el acoplamiento.

- Se añadieron 25 microlitros de hidroperóxido y una vez dispensada a la última muestra se inició inmediatamente la lectura. La absorbancia se leyó a 340 nm cada minuto durante 5 minutos.

#### **12.1.8 Determinación de actividad enzimática de glutatión transferasa.**

Para la realización de la prueba enzimática, se prosiguió de la siguiente manera:

1. Se preparó un buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a concentración 0.1 mM (Reactivo 1). El pH se verificó en 6.25.
  2. Se preparó el GSH (Reactivo 2). Para este reactivo se disolvieron 30.7 mg por ml de agua destilada.
  3. Se preparó el reactivo DNTB (Reactivo 3). Para esto, se mezclaron 76.8 mg de DNTB en 5 ml de etanol al 95%.
4. Procedimiento. Se colocaron en la placa para su lectura, en el siguiente orden:
  - Reactivo 1: 912 microlitros
  - Reactivo 2: 50 microlitros
  - Reactivo 3: 12.5 microlitros
  - Muestra 25 microlitros
  - Se realizó la lectura a 405 nm. La reacción se monitoreó durante aproximadamente 5 minutos con impresión de los resultados.

#### **12.1.9 Determinación de actividad enzimática de glutatión reductasa.**

Para la realización de la prueba enzimática, se prosiguió de la siguiente manera:

1. Se preparó el buffer regulador.

Este buffer estuvo compuesto por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y por EDTA. La concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  fue de 139 mM, y la de EDTA correspondió a 0.76 mM. El pH se ajustó a 7.4.

2. Se preparó reactivo principal:

Se adicionaron 18 ml del buffer regulador más 2 ml de NADPH a concentración de 2.5 mM.

3. FAD:

La concentración de este reactivo fue de 315 mM. Para la preparación de la solución se utilizó una constante de 1 mg de FAD, añadiendo solamente el líquido necesario.

4. GSSG

La concentración final fue de 22 mM. De este reactivo se requirieron por muestra aproximadamente 60 microlitros..

5. Procedimiento. Se colocaron en la placa para su lectura, en el siguiente orden:

PASO A:

- Reactivo principal: 440 microlitros
- Buffer regulador: 60 microlitros
- Muestra: 40 microlitros
- FAD: 20 microlitros
- Se realizó una primera lectura a 340 nm con 37°C durante 3 minutos

con impresión de los resultados "A".

PASO B. Una vez terminada la primera lectura, se añadieron los siguientes reactivos, en ese orden:

- Buffer regulador: 20 microlitros
- GSSG: 60 microlitros
- Se realizó la lectura en las mismas condiciones para obtener la

impresión de los resultados "B".