



BUAP

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**
Posgrado en Ciencias Químicas

Maestría en Ciencias Químicas

Área:

Bioquímica y Biología Molecular

Laboratorio de Investigaciones Químico-Clínicas

T E S I S

*“Efecto de resveratrol sobre el cambio conductual,
neuronar y del sistema antioxidante durante el
envejecimiento cerebelar en ratas Wistar”*

P R E S E N T A:

Q.F.B. Daniel Juárez Serrano

Director de Tesis:

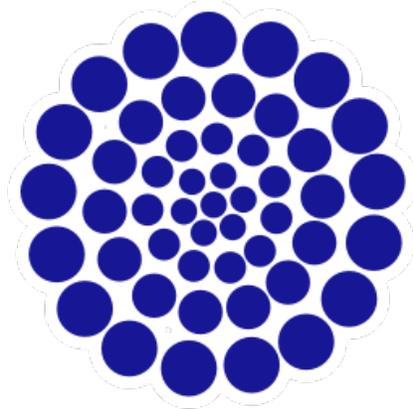
D.C. Alfonso Daniel Díaz Fonseca

Codirector de Tesis:

D.C. Julio César Morales Medina



Puebla, Pue. mayo, 2022



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional otorgada a Daniel Juárez Serrano (1037747).

Índice

Índice de figuras	5
Abreviaturas	6
Resumen	8
Introducción	9
Envejecimiento	9
Teorías del envejecimiento	12
Teorías de envejecimiento programado	12
Teorías de daño celular	13
Teoría de los radicales libres mitocondriales/estrés oxidativo	15
Teoría de la continuidad del envejecimiento	14
Marcadores de estrés oxidativo	16
Óxido nítrico (NO)	16
Lipoperoxidación	18
Malonildialdehído (MDA)	19
4-Hidroxiálquenos (4-HDA)	19
Estrategias Antienvjecimiento	22
Restricción calórica	22
Antioxidantes	23
Sistema antioxidante endógeno	24
Superóxido dismutasa (SOD)	24
Catalasa (CAT)	25
Sistema de Glutación	27
Glutación reductasa	28
Glutación peroxidasa	28
Glutación S-transferasa	28
Antioxidantes exógenos	29
Vitamina E	29
Cúrcuma	30
Resveratrol	30
Efecto neuroprotector del resveratrol	33
Cerebelo	36
Estructura del cerebelo	38

Funciones del cerebelo	39
Glia Cerebelar	40
Efectos del envejecimiento sobre el cerebelo	41
Planteamiento del problema	43
Hipótesis nula	45
Hipótesis alternativa	45
Objetivo general	45
Objetivos específicos	45
Metodología	46
Administración de Animales	47
Pruebas conductuales	48
Campo abierto	48
Prueba de reconocimiento de objeto novedoso	48
Prueba de barra de equilibrio	50
Análisis Bioquímico	51
Cuantificación de proteínas totales	51
Cuantificación de nitritos	51
Determinación de MDA+ 4-HDA	52
Cuantificación de GSH y GSSG	52
Análisis Enzimático	53
Determinación de la Actividad enzimática de Catalasa	53
Determinación de la Actividad de Superóxido Dismutasa	53
Determinación de la Actividad enzimática de Glutación transferasa	54
Determinación de la Actividad enzimática de Glutación reductasa	55
Determinación de la Actividad enzimática de Glutación peroxidasa	55
Tinción de Nissl	56
Inmunohistoquímica	56
Análisis estadístico	57
Resultados	58
Peso	58
La administración de resveratrol incrementa la actividad locomotora en la etapa de envejecimiento.	59

La administración crónica de resveratrol mantiene los procesos de memoria y aprendizaje en Ratas Wistar respecto a los grupos sin tratamiento.....	60
Efecto del resveratrol sobre la conducta motora fina durante el envejecimiento.....	62
El resveratrol disminuye los productos de lipoperoxidación (MDA y 4-HDA) y los niveles de nitritos durante el envejecimiento.	64
Efecto de la administración crónica de resveratrol sobre la actividad enzimática de Superóxido dismutasa y Catalasa durante el proceso de envejecimiento.	65
Efecto del resveratrol durante el proceso de envejecimiento sobre el sistema de glutatión.	66
Un tratamiento crónico con resveratrol atenúa la desorganización neuronal del cerebelo durante el envejecimiento.....	69
El tratamiento con resveratrol reduce la reactividad microglial, al inhibir la expresión de GFAP.....	72
Discusión de resultados.....	75
Conclusiones	90
Referencias	92

Índice de figuras

FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LA POBLACIÓN POR GRUPOS DE EDAD.	9
FIGURA 2. ESPERANZA DE VIDA POR SEXO	10
FIGURA 3. PROCESO DE ENVEJECIMIENTO Y SENESCENCIA.....	11
FIGURA 4. SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO.....	17
FIGURA 5. SITIOS MOLECULARES DE ACCIÓN DEL RESVERATROL	23
FIGURA 6. LOCALIZACIÓN ESQUEMÁTICA DE SOD1, SOD2 Y SOD3 EN HUMANOS	24
FIGURA 7. MECANISMO COMÚN DE ELIMINACIÓN DE O ₂ ⁻ POR LA SOD.....	25
FIGURA 8. ACTIVIDAD DE CATALASA	26
FIGURA 9. ESTRUCTURA DE CIS Y TRANS-RESVERATROL.....	31
FIGURA 10. MECANISMO NEUROPROTECTOR DEL RESVERATROL.	35
FIGURA 11. ESTRUCTURA DEL CEREBELO.	37
FIGURA 12. ORGANIZACIÓN CELULAR DE LA CORTEZA CEREBELOSA.	38
FIGURA 13. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE RESVERATROL SOBRE EL PESO EN RATAS DE LA CEPA WISTAR.....	58
FIGURA 14. PRUEBA DE CAMPO ABIERTO	59
FIGURA 16. PRUEBA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO NOVEDOSO.....	61
FIGURA 17. EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA MEMORIA A CORTO Y LARGO PLAZO.	62
FIGURA 18. EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA CONDUCTA MOTORA FINA.	63
FIGURA 19. EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.....	65
FIGURA 20. EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS CATALASA Y SUPERÓXIDO DISMUTASA DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.....	66
FIGURA 21. EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE EL SISTEMA DE GLUTATIÓN DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO	68
FIGURA 22. EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA CAPACIDAD DE PROTECCIÓN CELULAR Y LA CAPACIDAD DE NODO DEL SISTEMA DE GLUTATIÓN DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.....	69
FIGURA 23. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON RESVERATROL SOBRE EL NÚMERO DE CÉLULAS DE PURKINJE DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.	70
FIGURA 24. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON RESVERATROL SOBRE LA ORGANIZACIÓN NEURONAL DEL CEREBELO.....	71
FIGURA 25. EL RESVERATROL ATENÚA LA REACTIVIDAD DE LA GLÍA EN EL CEREBELO DE RATA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	72
FIGURA 26. EL RESVERATROL ATENÚA LA REACTIVIDAD DE LA GLÍA EN EL CEREBELO DE RATA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	73
FIGURA 27. EL RESVERATROL ATENÚA LA REACTIVIDAD DE LA GLÍA EN EL CEREBELO DE RATA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.	74
FIGURA 28. EFECTO DEL RESVERATROL A NIVEL CEREBELAR SOBRE LA GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES Y EL PROCESO DE LIPOPEROXIDACIÓN.....	88
FIGURA 29. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA DEL RESVERATROL A NIVEL CEREBELAR.....	89

Abreviaturas

ABREVIATURA	NOMBRE COMPLETO
4-HDA	4-Hidroxiálquenos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CAT	Catalasa
COX-1/2	Ciclooxigenasa 1/2
CONAPO	Consejo Nacional de Población
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
HPA	Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal
ECD	Enfermedades Crónico-Degenerativas
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
SASP	Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia
FPs	Fisura posterior
FPI	Fisura posterolateral
FPc	Fisura preculminar
FPp	Fisura prepiramidal
FPr	Fisura primaria
FPr	Fisura primaria
FSe	Fisura secundaria
Pi3K	Fosfoinositol 3-quinasa
GSK-3 β	Glucogeno Sintasa Quinasa 3 β
GSH	Glutación
GPX	Glutación peróxidasa
HO1	Hemo oxigenasa-1
NO $_2^-$	Ion nitrito
MDA	Malonildialdehido

MMP-3/9	Metaloproteinasas de matriz 3, 9
MRC	Miméticos de restricción de calorías
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NaNO ₂	Nitrito de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
NO	Óxido nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
PGE2	prostaglandina E ₂
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
α-TTP	Proteína de transferencia de alfa-tocoferol
pRB	Proteína del retinoblastoma
PKC	proteína quinasa C
PKB	Proteína quinasa B
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
LKB1	Quinasa hepática B1
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares.
RC	Restricción calórica
SIRT1	Sirtuina 1
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
ONOO ⁻	Peroxinitrito
GPx	Glutación peróxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación-s-transferasa
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
ECD	Enfermedades crónico-degenerativas
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial

Resumen

El envejecimiento es un proceso de deterioro progresivo e incrementa la prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas (ECD). Se han propuesto varias teorías para describirlo, incluida la teoría de envejecimiento por estrés oxidativo. En este sentido, se han descubierto biomarcadores para la cuantificación del estrés oxidativo, entre estos se incluyen los niveles de nitritos y de lipoperoxidación. Se han desarrollado diversas estrategias preventivas para desacelerar el envejecimiento, entre las más importantes la suplementación con antioxidantes. El cerebelo es una de las regiones más afectadas durante el envejecimiento ya que es encargado de diversas funciones motoras y cognitivas. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del resveratrol sobre el cambio conductual, neuronal y del sistema antioxidante durante el envejecimiento cerebelar en ratas Wistar. Se utilizaron 216 ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad, divididas aleatoriamente en 3 grupos: control; vehículo (etanol 7.5%) y resveratrol (10mg/kg de peso + etanol 7.5%), la administración fue vía oral. Los periodos de administración fueron por 2 y hasta 18 meses. Se realizaron pruebas conductuales, bioquímicas, enzimáticas, histológicas e inmunohistoquímicas. Los resultados mostraron que el etanol cumple la función de vehículo ya que no incrementó el estrés oxidativo y tampoco mostró un efecto beneficio adicional al resveratrol, en este sentido, la administración prolongada con 10mg/kg de peso de resveratrol confirmó su efecto antioxidante y antienvjecimiento ya que los animales mantuvieron la actividad locomotora y la memoria a corto y largo plazo aun en edades avanzadas, además, los niveles de los marcadores de estrés oxidativo se mantuvieron en niveles fisiológicos, la organización neuronal no sufrió cambios y GFAP no incrementó su reactividad durante el envejecimiento tomando como referencia los animales jóvenes. En conclusión, la administración crónica de resveratrol reduce los cambios conductuales, el daño oxidativo y neuronal producido en cerebelo de ratas Wistar durante el progreso del envejecimiento.

Introducción

Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso de deterioro progresivo de una amplia gama de estructuras anatómicas y, como resultado se genera la pérdida de las funciones fisiológicas corporales, aumentando el riesgo de contraer alguna enfermedad y finalmente la muerte [Goldberger, et al., 2002; Da Costa, et al., 2016]. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente hay 125 millones de personas con 80 años o más, lo cual es un factor de riesgo que convierte a esta población en la más susceptible de contraer alguna enfermedad relacionada con la edad. Para el 2050, se estima que habrá un número casi igual de personas de este grupo de edad solamente en China y 434 millones en todo el mundo [OMS, 2018].

México se encuentra en un intenso y acelerado proceso de cambio en la distribución por edades de la población, pasando de una población joven a una más envejecida. De acuerdo con la CONAPO en 2015, por cada diez mexicanos, tres eran menores de 15 años, seis tenían de entre 15-59 años y solo uno tenía 60 años o más. Para el año 2050, esta composición se verá profundamente alterada, ya que se prevé que únicamente dos de cada diez mexicanos tendrán menos de 15 años; Figura 1 [González, 2015].

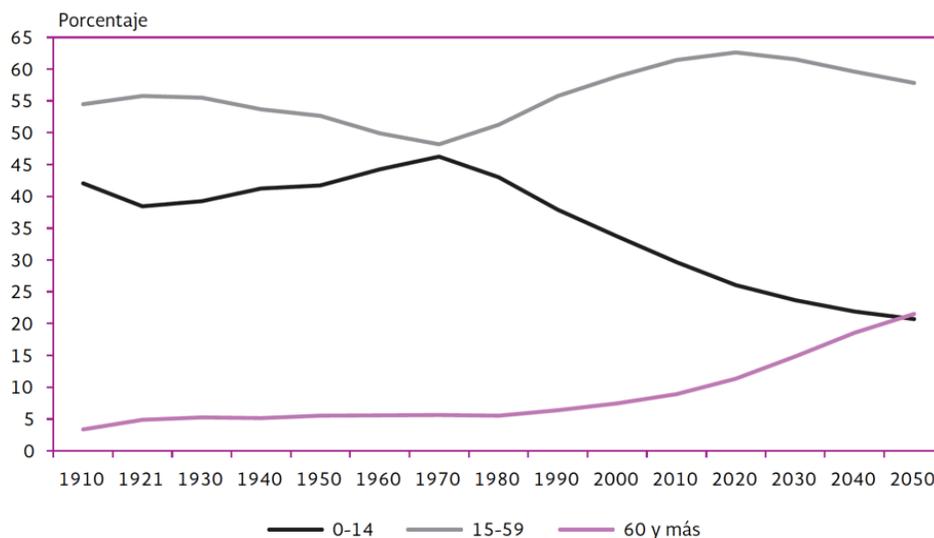


Figura 1. Distribución porcentual de la población por grupos de edad, 1910-2050 [González, 2015].

Hay una gran heterogeneidad en la forma de envejecer, determinada por factores biológicos, socioculturales y económicos [Lowsky, et al., 2014]. Este proceso aumenta la susceptibilidad del estado de salud en la población de adultos mayores, manifestándose en un incremento en la prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas (ECD), imponiendo la necesidad de modificar los sistemas de salud [Cantón, 2018; Coronel, 2017]. El aumento en la incidencia de diversas ECD podría modificar los patrones de mortalidad y la esperanza de vida principalmente en los países en vías de desarrollo [Monteverde & Novak, 2008]. Actualmente, la esperanza de vida en nuestro país oscila entre los 70 años para los hombres y 80 años para las mujeres; no obstante, esta seguirá un comportamiento ascendente, aunque a una velocidad más lenta; Figura 2 [González, 2015].

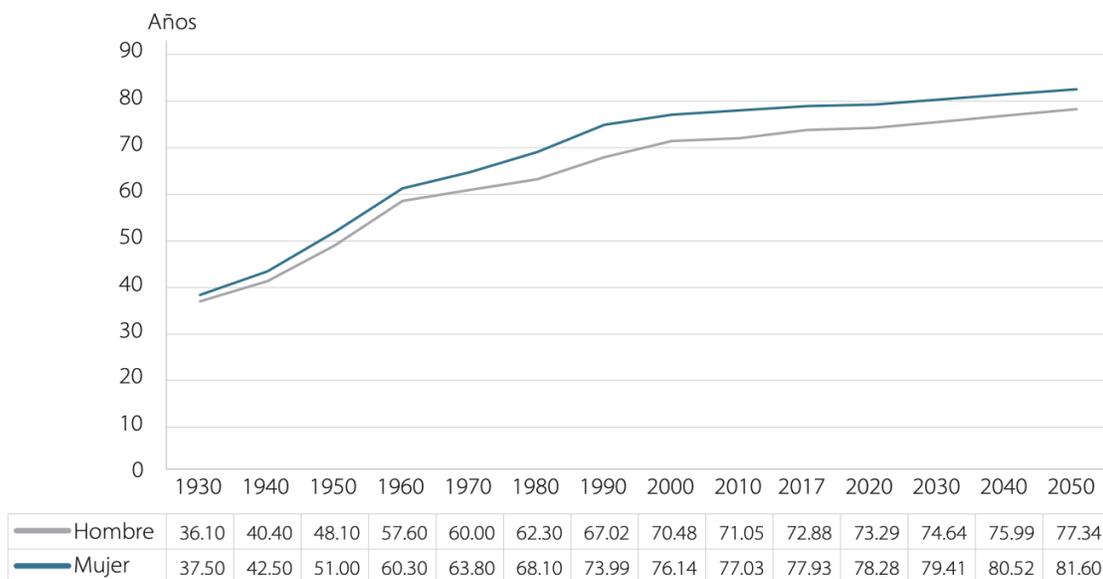


Figura 2. Esperanza de vida por sexo 1930-2050 [Coronel, 2017].

El patrón de envejecimiento en todo el mundo plantea nuevos desafíos y enfatiza la necesidad de comprender los cambios naturales, tanto a nivel celular y funcional, que se presentan durante el envejecimiento. Así como en el avance en la formulación y desarrollo de diversas estrategias anti-envejecimiento que garanticen una vejez íntegra [Monteverde & Novak, 2008].

Las características distintivas del envejecimiento se pueden dividir en tres categorías: (1) primarias o las causas del daño asociado con la edad; (2) antagónicas, o las respuestas al daño; e (3) integradoras, o las consecuencias de respuestas celulares responsables del fenotipo de envejecimiento [McHugh & Gil, 2018]. En este sentido, la senescencia, es una respuesta celular que limita la proliferación de células envejecidas, pertenece a la clase antagónica. Se ha identificado como una respuesta a numerosos factores estresantes, incluida la exposición a agentes genotóxicos, la privación de nutrientes, la hipoxia, la disfunción mitocondrial y la activación de oncogenes [Sun, et al., 2016]. Las modificaciones epigenéticas son otra característica del envejecimiento relacionada con la senescencia. La inestabilidad genómica y los cambios en la metilación del ADN se correlacionan con el envejecimiento cronológico en ratones y humanos [Kane, et al., 2019].

Durante los primeros años de vida los sistemas antioxidantes, de reparación y degradación de moléculas tóxicas se encuentran completamente activas, pero con el paso de la edad, el desgaste tisular generalizado, heridas y cuadros patológicos contribuyen a la senectud, ya que en edades avanzadas se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), liberación de citocinas y acumulación de moléculas tóxicas que en conjunto exacerban procesos como la inflamación [Wilkinson & Hardman, 2020; Grange, et al., 2009]; Figura 3.

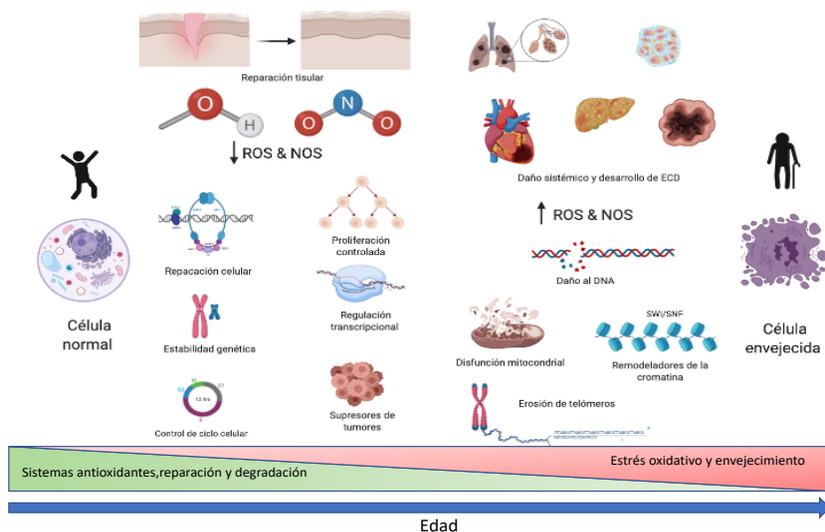


Figura 3. Proceso de envejecimiento y senescencia. [Creado en Biorender, 2020].

Teorías del envejecimiento

Se han propuesto varias teorías biológicas modernas para describir el envejecimiento en humanos, las cuales se dividen en teorías de envejecimiento programado y las teorías de daño celular.

Teorías de envejecimiento programado

Las teorías de envejecimiento programado establecen en su fundamento que un organismo sigue un calendario biológico, sosteniendo la hipótesis de que los códigos genéticos del organismo contienen instrucciones para regular el crecimiento, reproducción y muerte [Johnson, et al., 2019].

La longevidad programada es una subteoría que propone al envejecimiento como resultado de un encendido y apagado secuencial de ciertos genes y a la senescencia como el momento en que se manifiestan los déficits asociados con la edad [Jin, 2010]. Tomando en cuenta esta hipótesis, bastaría con deshabilitar las herramientas genéticas que causan y aceleran el envejecimiento.

La teoría endocrina sugiere que los cambios producidos a nivel hormonal son fundamentales para el progreso del envejecimiento. Se ha demostrado que el envejecimiento está regulado hormonalmente y que la vía de señalización insulina/IGF-1 conservada evolutivamente juega un papel clave en dicha regulación [Van-Heemst, 2010]. El eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) es un elemento importante para esta teoría ya que actúa como un regulador primario en señales de inicio y término en las distintas etapas de la vida [Herman, et al., 2016]. Por otro lado, la teoría Inmunológica, plantea que el sistema inmunológico está programado para decaer con el tiempo, lo que conduce a una mayor vulnerabilidad a las enfermedades infecciosas y, por lo tanto, al envejecimiento y la muerte. A medida que uno envejece, los anticuerpos pierden su eficacia y el cuerpo puede combatir eficazmente menos enfermedades nuevas, lo que provoca estrés celular y, finalmente, la muerte [Cornelius, 1972].

Teorías de daño celular

Las teorías de daño celular se enfocan en los ataques de agentes ambientales nocivos a cualquier organismo vivo, introduciendo un daño acumulativo que propicia la aparición de enfermedades y finalmente la muerte [Jin, 2010]. Este daño a nivel molecular incluye la inestabilidad genómica y alteraciones epigenéticas, dando lugar a daños celulares y fisiológicos como la senescencia celular, el agotamiento de las células madre y la comunicación intercelular alterada, que finalmente da como resultado un fenotipo característico del envejecimiento [Singh, et al., 2019]. La teoría de desgaste enfatiza que todos los organismos tienen partes vitales irremplazables que con la acumulación de daños se van desgastando, conduciendo a la muerte a células, tejidos y órganos. Este daño es causado por diversos factores exógenos y ambientales [Jin, 2010].

Otra teoría importante es la teoría de la tasa de vida, en la que se establece que el gasto de energía es inversamente proporcional a la vida útil, es decir, cuanto mayor es la tasa de metabolismo basal de oxígeno de un organismo, más corta es su vida útil [Dong, 2013]. A nivel bioquímico, una mayor tasa de metabolismo puede provocar un aumento en la tasa de reducción univalente de oxígeno y la consiguiente generación de radicales libres, suponiendo que una proporción fija de oxígeno consumido se desvía hacia la generación de radicales libres e hidroperóxidos [Sohal, 1986].

La teoría de error y catástrofe propuesta por Orgel en 1963, postula que los procesos del ADN (replicación, transcripción, y traducción) son necesarios para la síntesis de proteínas, por lo que, si hay un error en alguno de estos mecanismos, esta síntesis se realizaría de forma incorrecta [Dong, 2013]. Desde el nacimiento, surgen y se acumulan errores que afectan a los componentes y macromoléculas presentes en la célula, y aunque el sistema de reparación elimina parcialmente la acumulación de estos errores, este sistema no funciona de manera perfecta y permanente. [Weinert & Timiras, 2003].

Teoría de la continuidad del envejecimiento

En esta teoría se establece que los adultos mayores generalmente mantendrán las mismas actividades, comportamientos y relaciones que tenían en sus primeros años de vida. Esta teoría sostiene que, al tomar decisiones adaptativas, los adultos de mediana edad y mayores intentan preservar y mantener las estructuras internas y externas existentes; y prefieren lograr este objetivo utilizando estrategias ligadas a sus experiencias pasadas de sí mismos y de su mundo social [Atchley, 1989].

En la medida en que el cambio se basa en el pasado de la persona y tiene vínculos con él, el cambio es parte de la continuidad. Como resultado tanto de sus propias percepciones como de las presiones del entorno social, los individuos que se están adaptando al envejecimiento normal están predispuestos y motivados tanto hacia la continuidad psicológica interna como hacia la continuidad externa del comportamiento y las circunstancias sociales [Burbank, 986]. La teoría de la continuidad ve a la continuidad interna y externa como estrategias de adaptación robustas que se apoyan tanto en las preferencias individuales como en las exigencias sociales. Consiste en principios adaptativos generales que se podría esperar que siguieran las personas con el paso de los años [Atchley, 1989].

Un concepto válido de envejecimiento normal debe representar una imagen general que simbolice con precisión la experiencia del envejecimiento para la mayoría de las personas dentro de una cultura específica. En relación con lo anterior, el envejecimiento normal se refiere a los patrones habituales y comunes de envejecimiento humano. Debido a que existe una superposición sociocultural que interactúa con el envejecimiento físico y mental, se puede esperar que el envejecimiento normal difiera de una cultura a otra; además, el envejecimiento normal se puede distinguir del envejecimiento patológico por la falta de enfermedad física o mental [Atchley, 1989]. La continuidad es, por lo tanto, una gran estrategia de adaptación que es promovida tanto por la preferencia individual como por la aprobación social [Burbank, 986].

Teoría de los radicales libres mitocondriales/estrés oxidativo

En la década de 1950, Denham Harman propuso la teoría de los radicales libres del envejecimiento, a la que realizó modificaciones posteriores en 1972. En ella plantea que la mitocondria podría ser el reloj biológico del envejecimiento, ya que es en este organelo donde los radicales libres se producen al máximo, incrementando la susceptibilidad de daño de las biomoléculas que lo componen, entre las que se incluyen lípidos, proteínas y ADN; en estas situaciones, los antioxidantes endógenos no son suficientes para mantener la homeostasis celular [Harman, 1956; Harman, 1972]. En este sentido, se postula la teoría del envejecimiento por estrés oxidativo, la cual establece que la reducción de las funciones fisiológicas es causada por una acumulación lenta y constante de daño oxidativo en las macromoléculas [Lin & Beal, 2003; Liguori, et al., 2018]. El estrés oxidativo es el desequilibrio entre los radicales libres y el sistema antioxidante endógeno, inclinándose hacia el ambiente oxidante. Esto provoca daño celular en las estructuras principales, condicionando la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, daño a la mitocondria [Dias, et al., 2013] y promoviendo la desnaturalización de proteínas [Velásquez, et al., 2014].

En adición, en las últimas décadas se han revelado múltiples vías de reparación del ADNmt, incluida la reparación por escisión de bases, la reparación de roturas de una sola hebra, la reparación de errores de emparejamiento y posiblemente la recombinación homóloga. Estas vías de reparación del mtDNA están mediadas por enzimas que tienen una actividad similar a las que operan en el núcleo. El envejecimiento también está asociado con el aumento en la tasa de generación de H₂O₂ por parte de las mitocondrias probablemente debido, al menos en parte, al daño autoinfligido por las mitocondrias. [Barja & Herrero, 2000]. En este sentido, el peroxisoma es el generador y detoxificador más importantes de H₂O₂ en la célula [Titorenko, et al., 2011]. En consecuencia, la pérdida de la homeostasis redox dentro de los peroxisomas se correlaciona con niveles elevados de peróxido de hidrógeno y la inducción de la senescencia celular [Legakis, et al., 2002].

A finales de la década de los 80s se introdujo un grupo de biomarcadores para la medición del estrés oxidativo que, de manera directa o indirecta advierten sobre la concentración de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y NOS) [Griendling, et al., 2016]. Estos biomarcadores señalan el posible daño a macromoléculas como lípidos y proteínas, marcadores de funciones fisiológicas y cognitivas [Rossi, Garrido, & Sellés, 2016].

Marcadores de estrés oxidativo

Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) es una molécula de señalización intracelular e intercelular de vida corta y de libre difusión que se sintetiza a partir de L-arginina utilizando oxígeno molecular (O_2) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como donante de electrones [Alderton, et al., 2001]; Figura 4. La síntesis de $\cdot\text{NO}$ es catalizada por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS) cuyas isoformas incluyen NOS neural (nNOS o NOS1), NOS inducibles (iNOS o NOS2) y NOS endoteliales (eNOS o NOS3). La principal diferencia entre ellas radica en que nNOS y eNOS son enzimas constitutivas activadas por calcio y calmodulina, mientras que iNOS es independiente del calcio, está ausente en las células en reposo, pero es inducida por citocinas inmunoestimuladoras, bacterias e infecciones [Aktan, 2004]. nNOS se localiza en las neuronas y se expresa en gran medida en las células granulares del cerebelo. Por otro lado, aunque eNOS también se expresa en células granulares del cerebelo, es menos abundante que nNOS [Dinerman et al., 1994]. De acuerdo con Blanco, et al 2010, el sistema NO/NOS sufre una serie de cambios con el envejecimiento en el cerebelo: 1) Un cambio en la distribución celular de iNOS pero no en su expresión. 2) Mayor actividad de dihidronicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa (NADPH-d), y 3) Mayor nitración de proteínas. Esto sugiere que existen cambios que afectan el sistema NO/NOS y el destino del $\cdot\text{NO}$ producido durante el envejecimiento en el cerebelo, como variaciones en la producción de oxígeno reactivo o disminuciones en los mecanismos de protección antioxidante [Picón, et al., 2019].

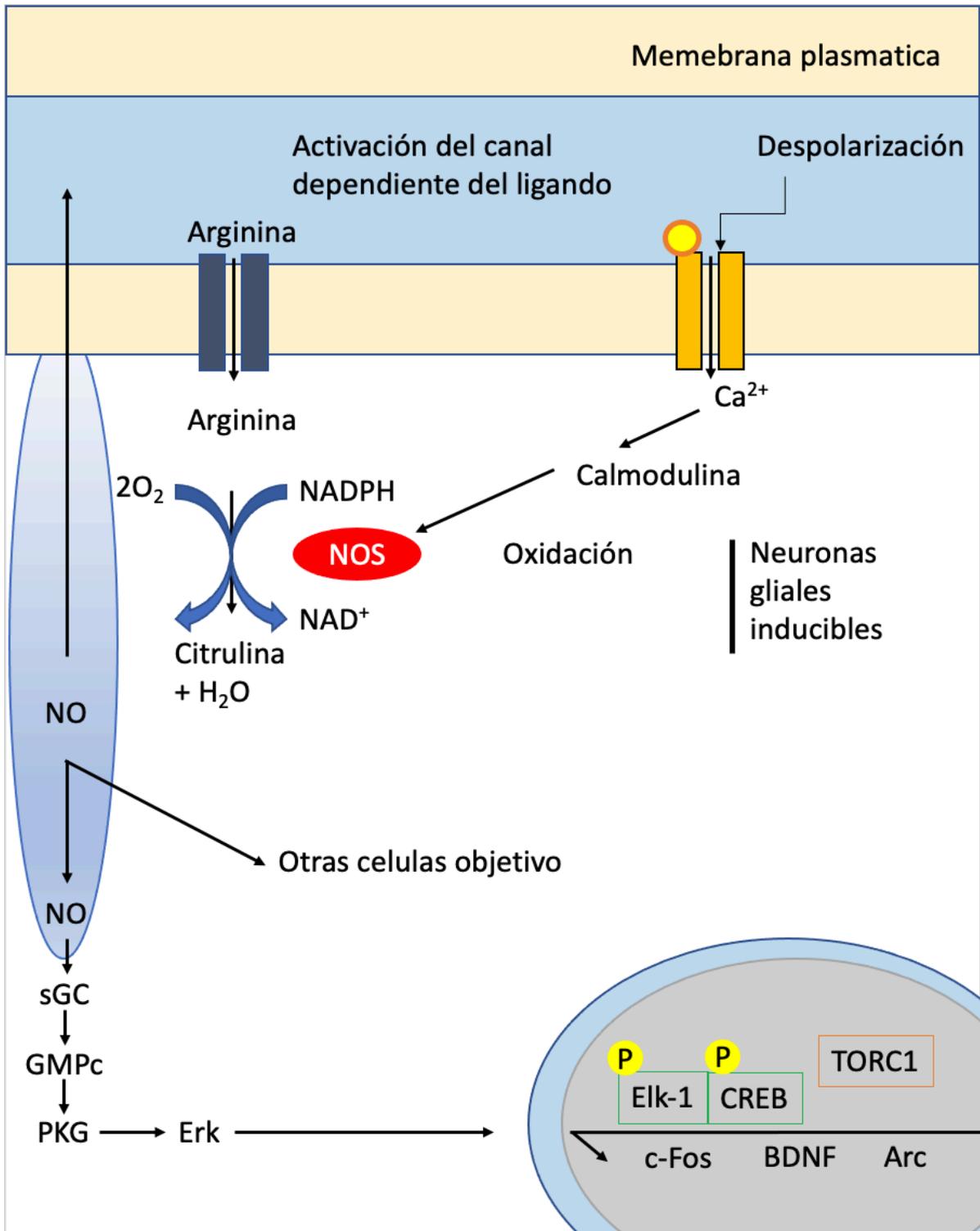


Figura 4. Síntesis de óxido nítrico. La sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) es activada por calcio dependiente de calmodulina. NOS produce óxido nítrico (\cdot NO) tras la oxidación de la arginina en citrulina. El \cdot NO se difunde y actúa sobre dianas presinápticas o postsinápticas. Una vía bien conocida del \cdot NO es a través de la activación de guanilato ciclasa soluble (sGC) que activa una proteína quinasa G (PKG) que conduce a la activación de Erk y la estabilización de TORC1 un coactivador de CREB. [Tomado y modificado de Tricoide, 2012].

Lipoperoxidación

La peroxidación lipídica es un proceso complejo que se sabe ocurre tanto en plantas como en animales. Implica la formación y propagación de radicales lipídicos, reordenamiento de los dobles enlaces y alteración en el ensamblaje, composición, estructura y dinámica de la bicapa lipídica [Gaschler, & Stockwell, 2017]. Alrededor de 32 aldehídos se han identificado como productos de la peroxidación lipídica, entre los que se encuentran: a) aldehídos saturados; b) aldehídos 2,3-trans-insaturados y c) una serie de 4 aldehídos 2,3-trans-insaturados hidroxilados [Repetto, Semprine & Boveris, 2012]. Los productos más representativos debido a su nivel de producción son los compuestos Malonildialdehído (MDA) y 4-Hidroxiálquenos (4-HDA). La lipoperoxidación es un proceso que promueve una reacción en cadena iniciada por la extracción de hidrógeno o la adición de un radical de oxígeno, que resulta en el daño oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) [Niki, et al., 2005] y que, a su vez, comprende 3 etapas conocidas como: iniciación, propagación y terminación.

El inicio de la peroxidación lipídica en la membrana celular se debe al ataque de cualquier especie que tenga suficiente reactividad para extraer un átomo de hidrógeno. El radical peróxido es capaz de extraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso poliinsaturado y así iniciar una reacción en cadena [Halliwell, & Gutteridge, 1984]. En la propagación, el segundo paso se da la degradación catalizada por hierro de los hidroperóxidos lipídicos formados durante la iniciación que generan intermediarios reactivos y productos característicos de la peroxidación lipídica como los hidroperóxidos [Svingen, et al., 1979]. Cuando la bicapa lipídica se somete a un proceso de peroxidación lipídica, es probable que las biomoléculas como las proteínas y/o los aminoácidos se modifiquen de forma covalente debido al producto formado [Lahir, 2015]. En la terminación, la reacción en cadena de radicales libres de la peroxidación lipídica se propaga hasta que dos radicales libres se eliminan entre sí para terminar la reacción en cadena. El proceso también puede terminar cuando se agrega un antioxidante el cual interrumpe la reacción, como la vitamina E o el resveratrol [Gutteridge, 1995].

Malonildialdehído

El MDA es el compuesto orgánico con la fórmula $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. Es un compuesto altamente reactivo que se presenta en su forma enólica; se produce naturalmente y es considerado un marcador del estrés oxidativo [Nair, O'Neil & Wang, 2008]. Es el más común de los conocidos como lipoperóxidos, utilizado como marcador de estrés oxidativo en plasma y tejidos [Grotto, et al., 2009, Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991]. Se genera a través de procesos enzimáticos tras la oxidación del ácido araquidónico (AA) y el ácido docosaheptaenoico (DHA) de las membranas biológicas, durante la biosíntesis de tromboxano A₂ (TXA₂) y ácido 12-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienoico (HHT), y no enzimáticos por endoperóxidos bicíclicos producidos durante la peroxidación de lípidos, es importante destacar que el AA el principal precursor de dicho endoperóxido [Ayala, et al., 2014]. Este puede metabolizarse o reaccionar con proteínas o ADN para formar aductos que contribuyen al inicio de diferentes procesos patológicos; esquema 1 [Marnett, 1999; Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014]. El metabolismo de la MDA implica su oxidación por la aldehído deshidrogenasa mitocondrial seguida de la descarboxilación para producir acetaldehído, que es oxidado por la aldehído deshidrogenasa a acetato y luego a CO_2 y H_2O [Siu, et al., 1982]. La fosfoglucosa isomerasa también es responsable de metabolizar al MDA a metilglioxal (MG) y luego a D-lactato por enzimas del sistema de glioxalasa usando GSH como cofactor [Agadjanyan, et al., 2005].

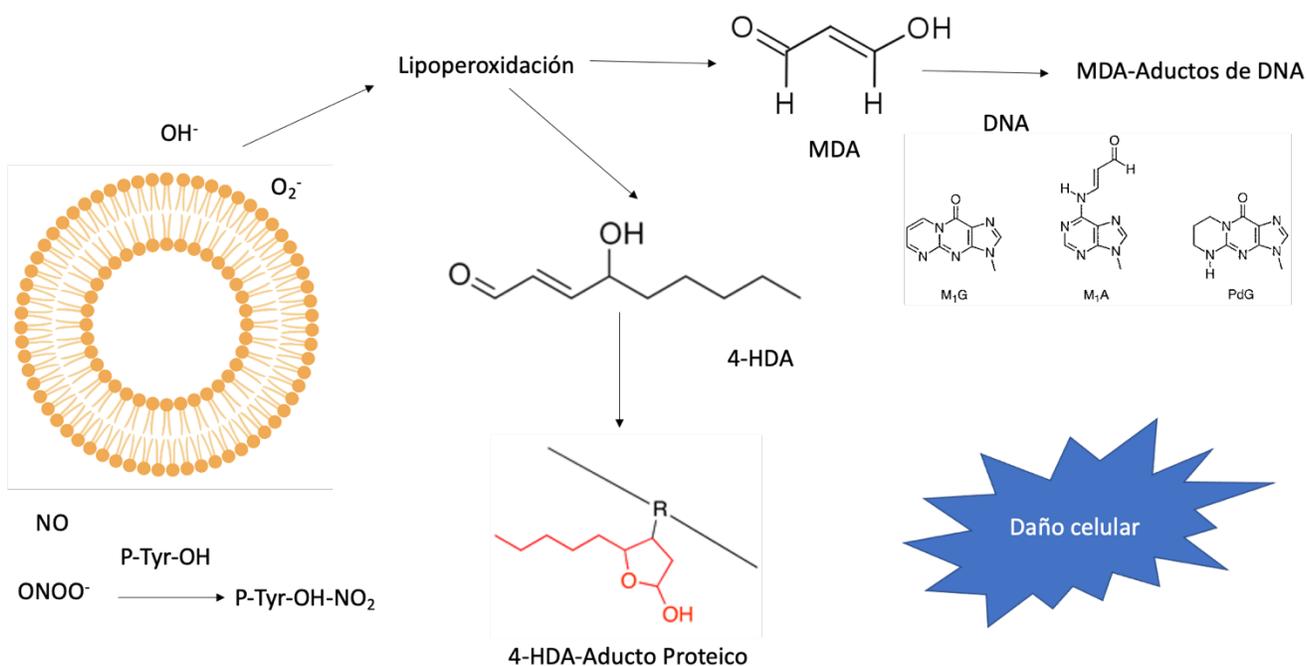
4-Hidroxi-alquenos

El 4-HDA es el principal de producto final de los hidroxi-alquenos. Este es generado por descomposición de ácido araquidónico y PUFAs, a través de procesos enzimáticos o no enzimáticos [Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991]. Se trata de un compuesto extraordinariamente reactivo que contiene tres grupos funcionales: (i) doble enlace $\text{C} = \text{C}$ que puede ser objetivo de las adiciones de Michael al tiol, reducción o epoxidación, (ii) grupo carbonilo que puede producir acetal/tiol o puede ser objetivo para la formación, oxidación o reducción de la base de Schiff, y (iii)

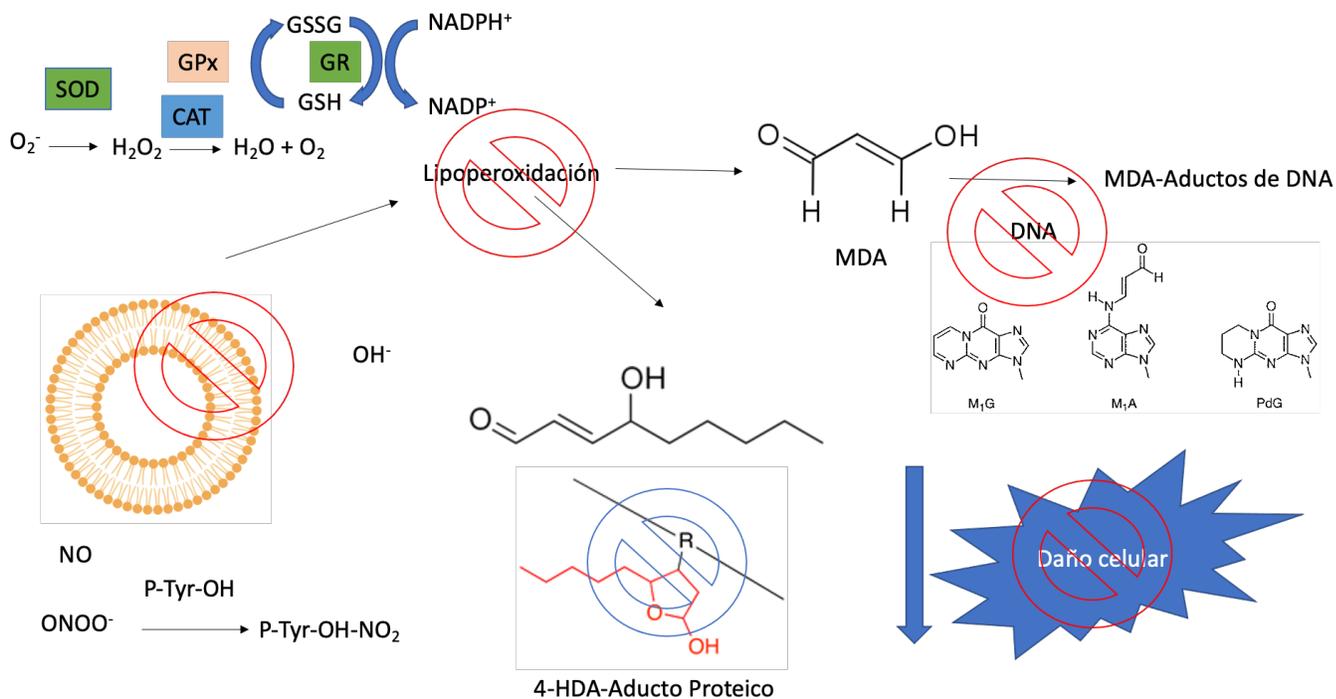
grupo hidroxilo que puede oxidarse a una cetona [Schaur, 2003]. El 4-HDA es el producto final de la peroxidación lipídica más estudiado, se sabe que a niveles fisiológicos se metaboliza enzimáticamente y desempeña un papel importante como molécula de señalización que estimula la expresión génica, aumenta la capacidad antioxidante celular y ejerce una respuesta adaptativa; a concentraciones moderadas, los daños en los orgánulos y proteínas conducen a la inducción de autofagia, senescencia o detención del ciclo celular, y en concentraciones altas propicia la formación de aductos y la muerte celular por apoptosis o necrosis [Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014]. Además, puede inactivar varias enzimas y también inhibir la síntesis de ADN y proteínas; esquema 1 [Shoeb, et al., 2014]. Se ha demostrado que este alquenal en concentraciones altas es altamente reactivo y puede causar deterioro del transporte de glucosa en neuronas cultivadas y una alteración del transporte de glutamato en sinaptosomas neocorticales, lo que puede conducir a la neurodegeneración exitotóxica en rata [Pedersen, Cashman & Mattson, 1999]. En este sentido, Liu, et al., 2016 demostraron que ratones con una mutación en el gen similar a la péptido 2 de la membrana mitocondrial interna (*Immp2l*) tenían niveles elevados de superóxido mitocondrial, problemas de fertilidad y fenotipos asociados con la edad, que incluyen cifosis y ataxia. Además, los ratones viejos mutantes mostraron un mayor contenido de carbonilo de proteína sérica, 4-hidroxi alquenes (4-HDA) cerebeloso y modificación de nitrotirosina en comparación con los ratones de control normales viejos.

Estos marcadores son utilizados con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias preventivas, diagnósticas y terapéuticas para impedir la aparición de diversas enfermedades [Grotto, et al., 2009]. Se sabe que procesos oxidativos como la peroxidación de lípidos se produce después de una lesión cerebral traumática grave, cuadros patológicos, y durante la progresión del envejecimiento y se correlaciona con la mortalidad. La identificación de los aductos, radicales libres y fuentes de oxidación es de fundamental conocimiento para el estudio y establecimiento de terapias antioxidantes basadas en mecanismos celulares y así implementarlos en estudios clínicos con bases moleculares.

Mecanismos de daño a nivel celular en el envejecimiento



Esquema 1. Mecanismos de daño a nivel celular en el envejecimiento. Implicación de radicales libres (ROS y RNS) en la progresión de procesos oxidativos como la lipoperoxidación y su interacción con las macromoléculas [Creado en Biorender].



Esquema 2. Papel del sistema antioxidante endógeno frente a los mecanismos de daño celular durante el envejecimiento. Los elementos enzimáticos y no enzimáticos del sistema antioxidante endógeno frenan el desarrollo de procesos oxidativos como la lipoperoxidación y desgaste de las macromoléculas celulares [Creado en Biorender].

Estrategias Antienvjecimiento

Restricción calórica

La restricción calórica (RC) es un proceso en el cual la ingesta de alimentos de un individuo disminuye sin llegar a la desnutrición [Montano, 2014]. Este proceso ralentiza el proceso de envejecimiento y amplía la esperanza de vida, esto se logra suprimiendo una serie de cambios biológicos y anomalías patológicas relacionadas con la edad, independientemente del género y la especie [McCay, et al., 1935].

Los mecanismos por los cuales la restricción de calorías induce propiedades que prolongan la vida no se comprenden completamente. Se han sugerido las siguientes cuatro vías posibles de destino: 1) Activación de la proteína quinasa AMP (AMPK), 2) Activación de las sirtuinas, 3) Inhibición de la señalización del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y 4) Inhibición de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) por rapamicina; [Mitchell, et al., 2015; Saraswat, 2017]. Diversos estudios apoyan significativamente la hipótesis de que la RC es capaz de reducir el daño oxidativo asociado a la edad y suprimir la inflamación crónica sistémica, esto debido principalmente a su importante papel regulador en el estrés oxidativo y su capacidad para mantener las condiciones redox adecuadas [Kim, et al., 20202].

A pesar de los beneficios comprobados de la RC, es una estrategia difícil de aplicar con éxito en humanos, principalmente a largo plazo, ya que requiere un alto nivel de disciplina. La dificultad de implementación de la RC ha llevado a los investigadores del área de la salud a proponer nuevos compuestos activos que imiten los resultados metabólicos, hormonales y fisiológicos de la RC, los cuales han sido denominados como “miméticos de restricción de calorías” (MRC). Una de las consideraciones más importantes que debe cumplir un MRC es que debe demostrar la capacidad de aumentar la vida útil en el ser humano; sin embargo, existen diversos objetivos moleculares que deben ser atacados por estos compuestos para lograr el mismo beneficio que brinda la RC [Son, et al., 2019]. Se ha propuesto al resveratrol como mimético de la RC por sus sitios diana; Figura 5.

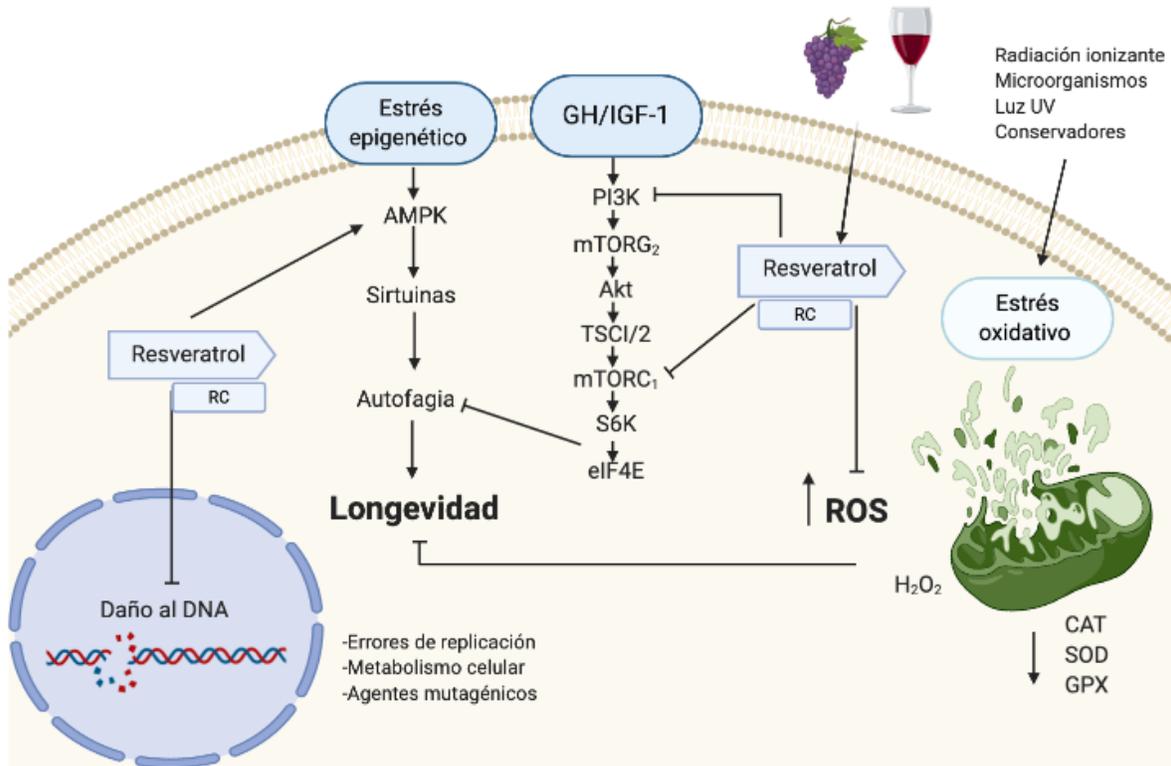


Figura 5. Sitios moleculares de acción del resveratrol, como mimético de la restricción calórica. [Creado en Biorender, 2020].

Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias sintéticas o naturales que se presentan en bajas concentraciones respecto a las biomoléculas que deben proteger. Actúan retardando o inhibiendo los efectos nocivos de los radicales libres y se clasifican en tres categorías: **Antioxidantes endógenos** (catalasa, superóxido dismutasa, sistema de reciclaje de glutatión, etc.) que son fabricados por la propia célula; **antioxidantes exógenos**, que ingresan al organismo a través de la dieta (vitamina E, vitamina C, curcumina, resveratrol, etc.) o mediante suplementos con formulaciones farmacéuticas y **cofactores** (cobre, zinc, manganeso, hierro, selenio, etc.). El consumo de antioxidantes exógenos puede aumentar la protección del organismo y ayudar al sistema endógeno a combatir el daño oxidativo y la aparición de diversas enfermedades [Chehue, et al., 2013].

Sistema antioxidante endógeno Superóxido dismutasa (SOD)

Las superóxido-dismutasas son un grupo de metaloenzimas esenciales para la defensa contra la toxicidad producida por los metabolitos parcialmente reducidos, generados durante la reducción biológica normal del oxígeno molecular. En la tabla 1 se presentan las características de las 3 isoformas [García-Triana, et al., 1995] y en la figura 6 se representa de manera esquemática su localización celular [Matsuda, et al., 2018].

Tabla 1. Isoformas de la enzima Superóxido dismutasa [Tomado y modificado de Gómez-Quiroz, & Cuevas-Bahena, 2008].

Enzima	Metal	Localización celular	kDA	Cromosoma/gen humano	Característica
SOD1	Cu/Zn	Citoplasma	32,5	21	Homodímero,
SOD2	Mn	Mitocondria	89	6	Homotetrámero
SOD3	Cu/Zn	Extracelular	135	4	Glucoproteína tetramérica

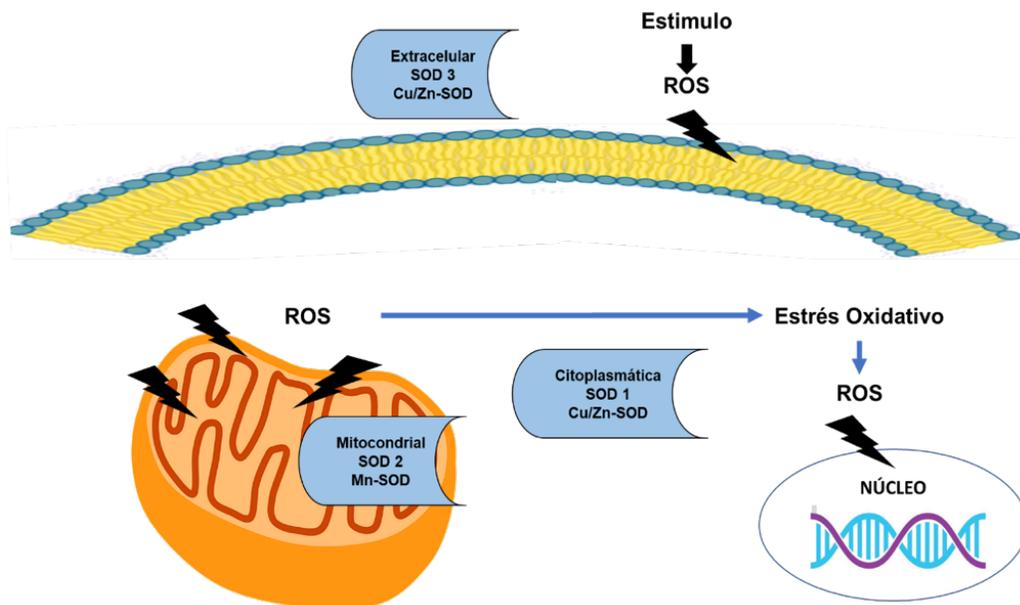


Figura 6. Localización esquemática de SOD1, SOD2 y SOD3 en humanos están compartimentados (SOD1, citoplasma; SOD2, en la mitocondria; SOD3, en el espacio extracelular). Los relámpagos muestran el ataque oxidativo de las ROS a macromoléculas como proteínas, lípidos y ADN [Tomado y modificado de Matsuda, et al., 2018].

Estas enzimas son responsables de proteger a las células y tejidos del ataque de ROS, generadas a partir de fuentes endógenas y exógenas. Intracelularmente las mitocondrias son una fuente y centro de lesión celular mediada por ROS, por lo tanto, la SOD2 desempeña un papel importante en la defensa mitocondrial contra el daño oxidativo por ROS; esquema 2 [Izuo, et al., 2015].

El deterioro de la producción energética y el aumento del daño oxidativo mitocondrial se consideran eventos patológicos tempranos que conducen a la neurodegeneración [Fukai, & Ushio-Fukai, 2011]. Las SODs eliminan el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), produciendo H_2O_2 , e inhibiendo la producción de peroxinitrito ($ONOO^-$) en la matriz mitocondrial y en el espacio intermembranal, como se muestra en la Figura 7 [Izuo, et al., 2015].

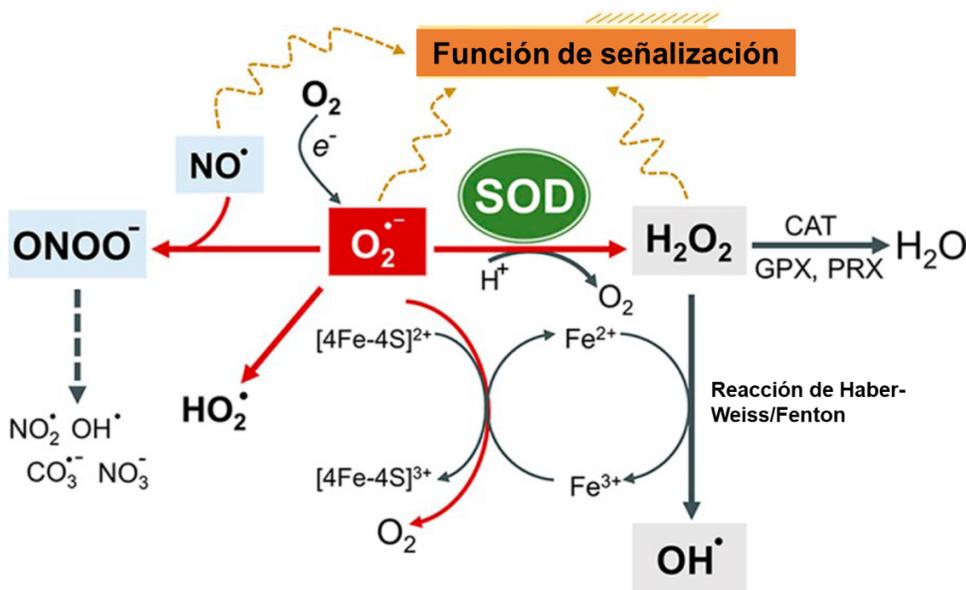


Figura 7. Mecanismo común de eliminación de $O_2^{\cdot-}$ por la SOD. [Tomado y modificado de Wang, et al., 2019]

Catalasa (CAT)

La CAT se encuentra ampliamente distribuida en el organismo. La actividad de esta enzima varía en dependencia del tejido, siendo más elevada en el hígado y los riñones que en el tejido conectivo y los epitelios, o prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol [Nandi, et al., 2019].

Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kD. Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX y el contenido protohémico y el de hierro representan un 1,1 y 0,09% respectivamente del peso molecular total de la enzima [Hajdu, Wyss, & Aebi, 1977; Vainshtein, et al., 1981].

La CAT, como parte del sistema antioxidante, está involucrada en la biotransformación del H_2O_2 generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción, pero relativamente poca afinidad por el sustrato. Presenta 2 funciones: la catalítica y la per-oxidativa. Ambas se pueden representar por la siguiente reacción: Figura 8 [Miranda, et al., 1996].

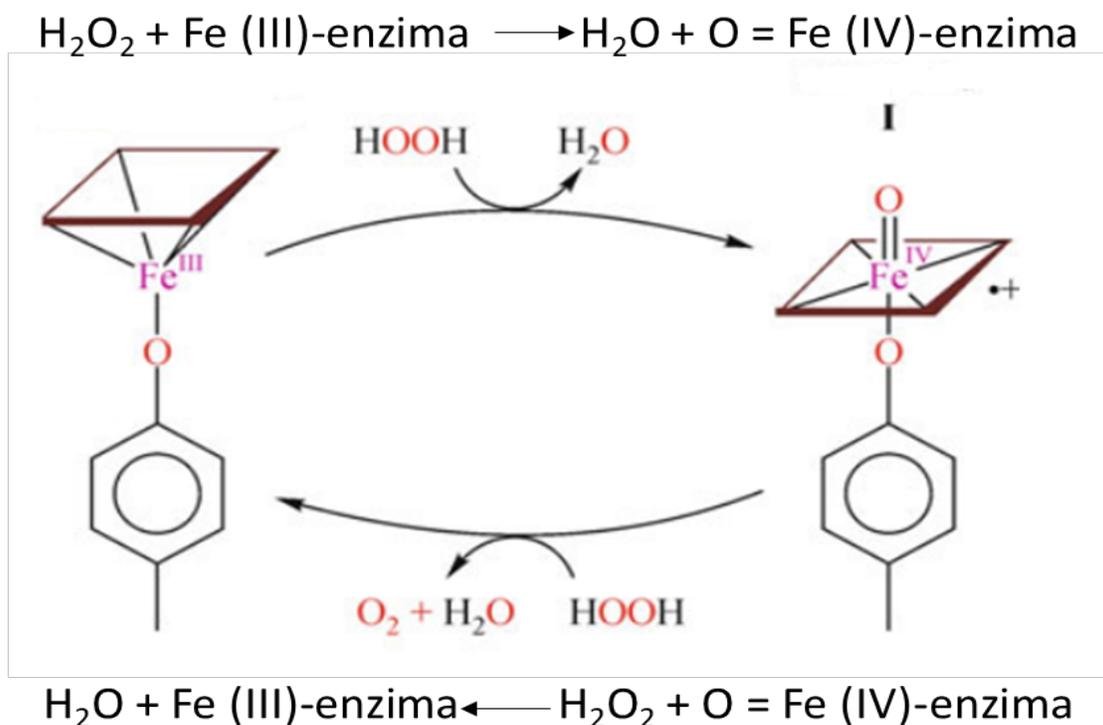


Figura 8. Actividad de Catalasa. La actividad de esta enzima se lleva a cabo en 2 pasos. El primero; una molécula de H_2O_2 oxida el grupo Hemo a una especie oxiferrilo esta reacción es equivalente a remover un Fe^{+3} de la porfirina; y el segundo, donde una segunda molécula de H_2O_2 es utilizada como reductor del compuesto 1 para regenerar a la enzima formando en el proceso $H_2O + O_2$ [Chelikani, Fita & Loewen, 2004].

Sistema de Glutación

El tripéptido glutación (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) es el tiorintracelular más difundido; comprende más del 90% de los equivalentes reductores en la célula [Dickinson, et al., 2002]. En la mayoría de los tejidos, la concentración de GSH está cerca de los valores milimolares. Además del citosol, el GSH está presente en las mitocondrias, el núcleo y el retículo endoplásmico, donde forma depósitos redox separados con diferentes proporciones de formas reducidas y oxidadas [Galkina, et al., 2017].

La concentración de GSH en el cerebro es mayor en comparación con las concentraciones de otros aminoácidos y péptidos de escape de glutamato y glutamina [Aoyama, 2021]. El nivel máximo de GSH se observa en la corteza y el cerebelo. Los astrocitos contienen niveles más altos de GSH en comparación con las neuronas, por lo que estas células juegan un papel clave en el metabolismo cerebral del GSH al suministrar este tripéptido y los precursores para su síntesis a las neuronas [Miller, et al., 2009].

Hay tres mecanismos principales de mantenimiento del nivel de GSH en células de mamíferos, incluida la biosíntesis *de novo*, el transporte desde el medio extracelular a través de las membranas plasmáticas y la reducción desde la forma oxidada (GSSG) debido a la actividad de la glutación reductasa (GR). En el cerebro, la homeostasis del glutación se mantiene mediante su reducción por la GR en una reacción dependiente de NADPH [Aoyama, 2021].

Toro, et al., 2006, demostraron en ratones que después de la exposición a radiación ionizante se indujo un aumento acelerado de ROS, sugiriendo a estos como un marcador de daño previo a la muerte celular, además, sugieren que el sistema de Glutación podría desempeñar un papel en los mecanismos compensatorios desencadenados para contrarrestar el daño cerebeloso inducido por la radiación o cualquier desencadenante de estrés oxidativo.

Glutación reductasa

La glutación reductasa (GR; EC 1.8.1.7) es una enzima dependiente de NADPH de la flavoproteína oxidoreductasa y un componente importante de la ruta del ascorbato-glutación. La GR cataliza la reducción del glutación oxidado (GSSG; dimérico) a glutación reducido (GSH; monomérico) [Rajput, et al., 2021]. Existen pocos estudios sistemáticos sobre la expresión de GR en estructuras cerebrales. Los estudios inmunohistoquímicos muestran que GR se localiza preferentemente en las neuronas. En cultivos celulares, GR se encontró en neuronas, microglía y oligodendrocitos, pero no en astrocitos [Galkina, et al., 2017]. Las diferencias regionales en la distribución de GR están relacionadas con su prevalencia en la corteza cerebral en comparación con otras estructuras.

Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPX; EC 1.11.1.9) cataliza la reducción de H_2O_2 y HO_2 a agua y alcoholes lipídicos, respectivamente. Entre las enzimas del tejido nervioso que son capaces de utilizar hidroperóxidos y H_2O_2 , la catalasa tiene una actividad baja, por lo que cobra importancia el funcionamiento de las enzimas del metabolismo del glutación, como la glutación peroxidasa (GPx) y la glutación S-transferasa [Bakhtyukov, et al., 2016]. En el cerebro, la GPx-1 citosólica o “clásica” está presente en las neuronas y la glía, mientras que la GPx-4 de hidroperóxido de fosfolípidos se observa principalmente en las neuronas. Anteriormente se informó que la actividad de algunas enzimas del sistema antioxidante, incluida la GPx, es menor en el cerebro en desarrollo en comparación con el cerebro adulto [Bakhtyukov, et al., 2016].

Glutación S-transferasa

La glutación-S-transferasa (GST) es otra enzima que utiliza GSH y cataliza la conjugación de GSH con compuestos electrofílicos. Hay tres familias de esta enzima, específicamente las GST citosólicas, las mitocondriales hidrosolubles y las

GST microsomales unidas a la membrana [Allocati, et al., 2018; Dasari, et al., 2018]. En los mamíferos, hay ocho clases de GST citosólicas: α , μ , π , θ , σ , κ , ζ y ω . GST exhibe actividad de peroxidasa, reduciendo los hidroperóxidos de fosfolípidos, ácidos grasos y colesterol. GST está ampliamente distribuido en el cerebro y se han revelado tres isoenzimas, α , μ y π , en neuronas y células gliales. Específicamente, se encontró GST- α en núcleos neuronales y astrocitos de cerebro de rata, GST- μ en neuronas y astrocitos, y GST- π en el citoplasma de oligodendrocitos maduros en la corteza cerebral de roedores [Allocati, et al., 2018; Johnson, et al., 2003]. En la corteza cerebelosa, la concentración de la subunidad 4 de GST- μ (Yb2) fue mayor en el flóculo y menor en el vermis. Esto tiene interés clínico porque el patrón de expresión de la subunidad 4 (Yb2) de GST de clase μ en el cerebelo coincide con la susceptibilidad regional conocida de esta estructura a la degeneración después de la exposición a agresiones tóxicas o metabólicas [Johnson, et al., 1993].

Antioxidantes exógenos

Vitamina E

El término vitamina E se usa para describir ocho compuestos lipofílicos de origen natural que incluyen cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles designados como alfa, beta, gamma y delta. Su función más conocida es la de antioxidante, capaz de prevenir el proceso de lipoperoxidación eliminando los radicales lipoperoxilo mediante la donación de hidrógeno del grupo fenólico en el anillo cromanol [Jiang, 2014]. A pesar de esto, los requerimientos de vitamina E en la dieta en humanos se limitan solo al alfa-tocoferol debido a que las otras formas de esta vitamina son poco reconocidas por la proteína de transferencia de alfa-tocoferol (TTP) hepática [Chung, et al., 2016]. Las formas naturales de la vitamina E son producidas por plantas, aunque el alfa tocoferol existe en algunas frutas y verduras, semillas de plantas como las nueces, cacahuates, almendras y semillas de girasol; también se encuentran en algunos aceites alimenticios como el aceite de maíz y soja [Della-Penna & Pogson, 2006].

Cúrcuma

La cúrcuma es una planta herbácea perenne rizomatosa (*Curcuma longa*) de la familia del jengibre [Hewlings & Kalman, 2017]. Las propiedades medicinales de la cúrcuma se conocen desde hace miles de años. Sin embargo, recientemente se han investigado y propuesto diversos mecanismos de acción y se han determinado varios de sus componentes bioactivos [Gupta, et al., 2013]. Este polifenol se dirige a múltiples moléculas de señalización demostrando su actividad celular y beneficios para la salud. Estudios en roedores han demostrado que es útil en enfermedades inflamatorias, síndrome metabólico y enfermedades neurodegenerativas [Gupta, et al., 2013].

Se ha demostrado que la cúrcuma mejora los marcadores sistémicos de estrés oxidativo, aumentando la actividad sérica de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx [Sahebkar, et al., 2015]. El efecto de la cúrcuma sobre los radicales libres se lleva a cabo mediante diversos mecanismos diferentes. Su mecanismo de acción incluye diferentes formas de eliminar radicales libres como ROS y NOS, su capacidad de inhibir enzimas generadoras de ROS como la lipoxigenasa/oxidasa e interviene en la modulación de la actividad de enzimas antioxidantes [Lin, et al., 2007].

Resveratrol

El resveratrol (3,5,4, trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina producida por más de 70 especies de plantas en respuesta a infecciones y situaciones estresantes, como daño mecánico, baja temperatura, radiación ultravioleta y pesticidas [Perrone, et al., 2017]. Es un polifenol presente en frutos secos, como nueces y cacahuates, y en frutos silvestres como bayas, uvas y vino tinto [Pannu & Bhatnagar, 2019]. Aunque su síntesis disminuye regularmente durante el proceso de maduración de la uva [Salehi, et al., 2018]. Los dos factores más importantes que condicionan la

variabilidad en el contenido de este polifenol son el clima y la presencia de hongos [Gambini, et al., 2015].

La estructura química del resveratrol fue caracterizada en 1940. El nombre químico formal (IUPAC) del resveratrol es E-5-(4-hidroxiestiril) benceno-1,3-diol. Existen dos isómeros geométricos naturales que corresponden a las formas *cis* (Z) y *trans* (E); sin embargo, el isómero *trans* es la forma natural predominante y estable, Figura 9. El isómero *cis* puede producirse cuando la isoforma *trans* se expone a la luz solar, artificial o ultravioleta, en un rango de longitud de 254-366 nm. Diversos factores físicos exógenos y de estrés biológico impactan en el contenido de resveratrol en un alimento o bebida; además, existen factores endógenos que interfieren con la biosíntesis del resveratrol [Salehi, et al., 2018].

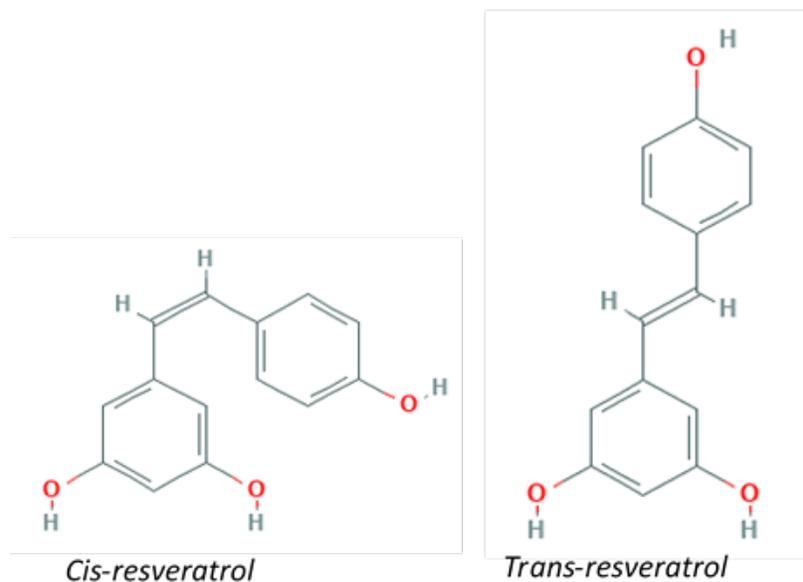


Figura 9. Estructura de *cis* y *trans*-Resveratrol [Estructuras tomadas de PubChem, 2020].

El resveratrol posee diversas propiedades biológicas, entre las que se incluye su efecto como cardioprotector, antiinflamatorio, anticancerígeno y anti-envejecimiento. No obstante, la propiedad del resveratrol mejor descrita es su capacidad para actuar como antioxidante [Navarro-Cruz, et al., 2017; Aguilar-Alonso, et al., 2018]. La actividad antioxidante del resveratrol depende de la disposición de los grupos funcionales en la estructura nuclear. Por lo tanto, la configuración, la sustitución y el número total de grupos hidroxilo influyen sustancialmente en varios mecanismos de actividad antioxidante, como la

capacidad de eliminación de radicales y de quelación de iones metálicos [Salehi, et al., 2018].

Se ha demostrado que a administración intravenosa supera las restricciones mecánicas de la absorción gastrointestinal (es decir, el contacto entre las moléculas de resveratrol y los enterocitos), al tiempo que preserva inicialmente el compuesto original al eludir la conjugación de los enterocitos y la microbiota intestinal [Smoliga & Blanchard, 2014.]. Se ha demostrado que la administración intravenosa de resveratrol en ratas produce una mayor absorción de esta molécula en comparación con la administración oral. Sin embargo, es importante señalar que si bien la administración intravenosa puede proporcionar una mayor concentración plasmática de trans-resveratrol libre que la administración oral típica, no es clínicamente práctica si se desea la autoadministración crónica [Kapetanovic, et al., 2011]. En este sentido, se ha realizado un esfuerzo considerable para aumentar la relación entre la concentración de trans-resveratrol libre y la dosis administrada vía oral, al experimentar con diversos vehículos que faciliten la administración, mejoren la biodisponibilidad y absorción del resveratrol, tal es el caso del etanol, que ha demostrado en concentraciones bajas ser el mejor vehículo para este polifenol.

La mayor C_{max} y biodisponibilidad de trans-resveratrol libre se han observado después la administración de dosis altas, en humanos [Thompson, et al., 2014]. Esto ha demostrado que se puede alcanzar una C_{max} de aproximadamente 4 µM en plasma humano, y esto puede ser suficiente para lograr algunos de los beneficios fisiológicos demostrados en modelos de laboratorio de trans-resveratrol solo. El resveratrol se absorbe a un ritmo alto a través del intestino delgado. El carácter pequeño y no polar del *trans*-resveratrol puede permitir su absorción a través de las membranas por difusión pasiva; sin embargo, existe evidencia convincente de que el resveratrol se transporta principalmente a través del epitelio intestinal mediante transportadores dependientes de ATP. Dentro de los enterocitos del intestino delgado y los hepatocitos del hígado, la conjugación de glucurónido y sulfato de *trans*-resveratrol a los principales metabolitos es extensa [Kenealey, et al., 2011]. Esta conjugación aumenta la solubilidad acuosa del

resveratrol y reduce el flujo a través de las membranas, lo que evita que las moléculas no polares interactúen con las macromoléculas esenciales y permite la excreción renal a través de la orina [Thadhani, 2019]. El extenso metabolismo de los conjugados de glucurónido y sulfato durante la absorción está bien descrito y disminuye los niveles circulantes de *trans*-resveratrol libre. Por lo tanto, el metabolismo del resveratrol finalmente da como resultado cantidades relativamente pequeñas de resveratrol libre en el plasma para ser entregado a otros tejidos. [Thadhani, 2019].

La administración oral de este polifenol se ha realizado en diversos estudios a través de varios regímenes de dosis, tamaños y formulaciones fisiológicas [Ratnam, et al., 2006]. En última instancia, una serie de factores influyen en los parámetros farmacocinéticos de la administración oral, incluidos los factores relacionados con la molécula en sí, la fisiología y las características individuales. Esto incluye el tamaño de la molécula, la carga a pH fisiológico, la solubilidad, la tasa de absorción activa y pasiva en el tracto gastrointestinal y la actividad enzimática del metabolismo de primer paso [Planas, 2012].

Efecto neuroprotector del resveratrol

Una buena alimentación ha demostrado ser capaz de retrasar la aparición de trastornos neurológicos relacionados con la edad, como la pérdida de memoria, demencia, Alzheimer, Parkinson y accidentes cerebrovasculares [Morris, 2009]. Por consiguiente, se ha informado que el consumo regular de frutas, verduras y pescado reduce el riesgo de deterioro cognitivo relacionado o no con la demencia en la población anciana. En general, este tipo de dietas están compuestas por diversos fitoquímicos con propiedades antioxidantes, como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides y compuestos polifenólicos que en dosis farmacológicas constituyen una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas [Diaz-Gerevini, et al., 2016].

Así mismo, el resveratrol incrementa la biogénesis de algunas enzimas como las sirtuinas, encargadas de regular los procesos metabólicos y ciertos mecanismos que retrasan el envejecimiento y contribuyen a prevenir enfermedades. El resveratrol disminuye la neurotransmisión colinérgica, la expresión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) y el estrés oxidativo, promoviendo la eliminación de péptidos β -amiloides y reduciendo la muerte neuronal [Rege, et al., 2014].

En un modelo de ratas con oclusión de la arteria cerebral media, el resveratrol redujo la apoptosis inducida por isquemia en el hipocampo de manera dosis-dependiente, lo que indica que el resveratrol es una sustancia neuroprotectora con potencial terapéutico [Meng, et al., 2015]. De acuerdo con estos hallazgos, un informe reciente en el que se evaluaron los efectos neuroprotectores del resveratrol en ratas recién nacidas mostró que los efectos del resveratrol son duraderos, protegen contra el daño cerebral, reducen el volumen del infarto y evita la pérdida de mielinización [Arteaga, et al., 2015]. Sarubbo, et al., en 2015 sugieren que un tratamiento crónico con resveratrol puede actuar como una terapia restauradora de las funciones cognitivas deterioradas por el envejecimiento, ya que mejora la síntesis de monoaminas en ratas envejecidas. Por otro lado, Ghorbani, et al., en 2018 describen en un modelo de ataxia cerebelosa en rata que el resveratrol protege a las neuronas de Purkinje, mostrando un aumento de estas neuronas acompañado de una reducción en los cuerpos apoptóticos; también reportan que el resveratrol restaura la actividad muscular y coordinación del movimiento.

Los estudios en ratas envejecidas sugieren que el tratamiento crónico con resveratrol mejora el rendimiento de la memoria y previene el deterioro cognitivo. El efecto antioxidante del resveratrol protege la estructura y función de las neuronas que pueden resultar dañadas por el estrés oxidativo durante el envejecimiento. Este efecto también evita una reducción del número de espinas dendríticas en las regiones límbicas en animales ancianos bajo este tratamiento [Flores, et al., 2016].

Adicional a esto, Hernández-Hernández, et al., 2016 sugieren que el resveratrol induce modificaciones de la morfología dendrítica ya que observaron un aumento significativo en la longitud dendrítica y la densidad de neuronas piramidales en corteza prefrontal e hipocampo, cambios que pueden explicar el efecto terapéutico del resveratrol en el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer. En los últimos años ha cobrado gran interés el elucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales el resveratrol es capaz de prevenir las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad. Las principales vías propuestas como posibles mecanismos de acción se muestran en la figura 10 [Bastianetto, et al., 2015].

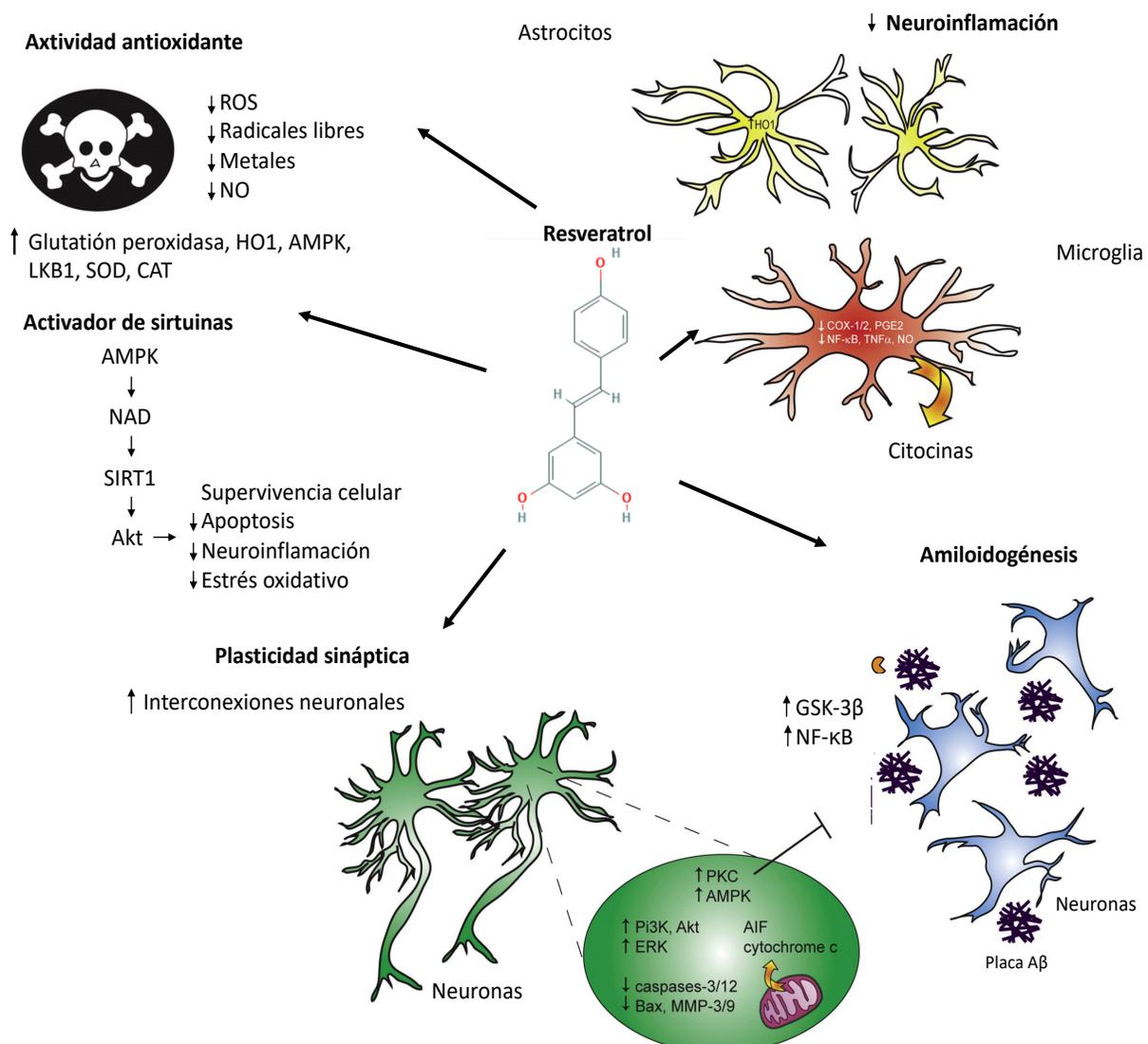


Figura 10. Mecanismo neuroprotector del resveratrol [Tomado y modificado de Bastianetto, et al., 2015].

La actividad antioxidante del resveratrol ha demostrado la capacidad de eliminar los radicales libres y los metales pesados, protege contra la toxicidad del $\cdot\text{NO}$, reduce la actividad de la Quinona reductasa 2 (QR2) y regula al alza las enzimas endógenas como GPx, GST, CAT, SOD, etc. Este polifenol también inhibe la expresión de ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y -2), reduce la activación del factor nuclear kB (NF-kB), así como la producción de prostaglandina E2 (PGE2), $\cdot\text{NO}$ y factor de necrosis tumoral α (TNF α), la liberación de citoquinas y aumenta la expresión y actividad de hemo oxigenasa 1 (HO1) en los astrocitos. Protege contra la toxicidad inducida por el péptido β -amiloide (A β) al reducir la actividad de la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK-3 β) y puede promover la eliminación de A β . Además, el tratamiento con resveratrol puede afectar a múltiples efectores de la vía de señalización implicados en la supervivencia celular, incluyendo a la quinasa activada por AMP (AMPK), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), proteína cinasa B (PKB), muerte celular programada que implica a caspasa-3/12, metaloproteinasas 3/9 (MMP-3/9), factor inductor de apoptosis (AIF), citocromo C) y de plasticidad sináptica que incluyen a la proteína quinasa C (PKC), quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares (ERK1/2) [Bastianetto, et al., 2015].

Cerebelo

El cerebelo forma parte del SNC de todos los vertebrados y está constituido por una gran cantidad de neuronas, que superan el total de la corteza cerebral. Es la parte más grande del cerebro posterior y tiene un peso aproximado de 150 g en humanos [Singh, 2020]. Está ubicado en la fosa craneal posterior, en la línea media de la región dorsal del tallo cerebral y por encima del cuarto ventrículo, figura 11a.

El cerebelo está conectado al tronco del encéfalo por tres grandes pedúnculos cerebelosos. El pedúnculo superior conecta el cerebelo con el cerebro medio, el medio con la protuberancia y el inferior con el bulbo raquídeo [García, et al., 2009].

El cerebelo macroscópico se divide de tres partes: dos superficies, dos muescas y tres fisuras bien delimitadas. Consta de una región central llamada vermis (gusano), dos hemisferios cerebelosos, uno a cada lado de la vermis, y dos pequeños flóculos colocados de forma bilateral, figura 11b. Dos profundas fisuras transversales dividen al cerebelo en tres regiones principales. La fisura horizontal, es más prominente y separa las superficies superior e inferior del cerebelo. La fisura primaria separa a la región anterior (lóbulos I al V) de la región posterior (lóbulos VI al IX). La fisura posterolateral separa la región posterior del lóbulo floculonodular, este último constituido por los flóculos y el lóbulo [García, et al., 2009]; figura 11c.

La organización neuronal del cerebelo es peculiar por varias razones. En primer lugar, aunque el cerebelo representa tan sólo un 10% del peso del encéfalo, contiene la mitad del total de neuronas de éste. Por otra parte, podría afirmarse que la organización celular de la corteza cerebelosa es casi cristalina, pues mantiene una disposición y conectividad que se repite sin variación desde los vertebrados más primitivos [Delgado-García, 2001].

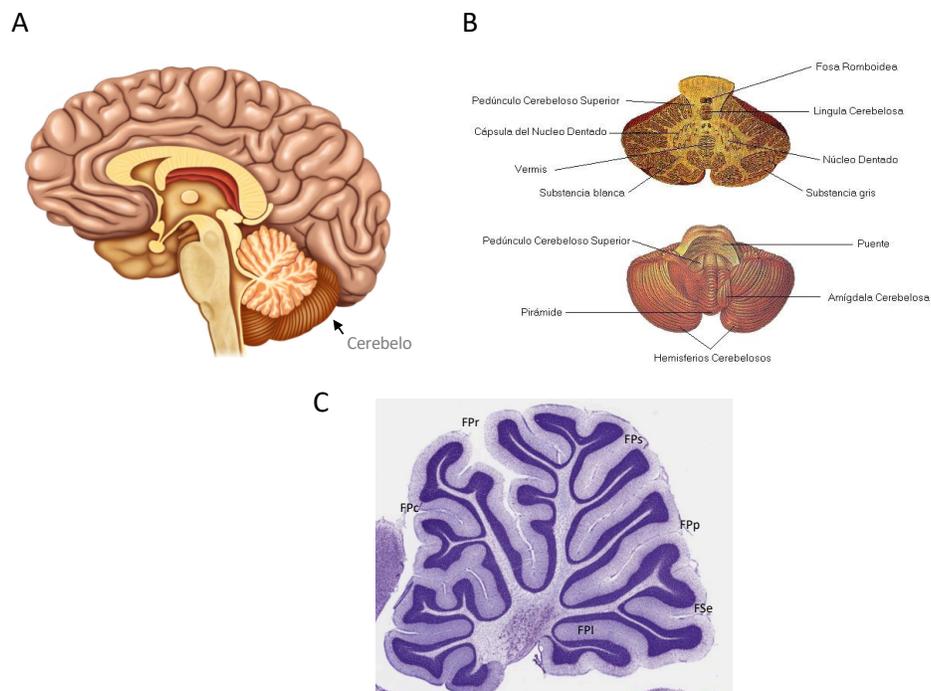


Figura 11. Estructura del cerebelo. A) Ubicación del cerebelo; B) Anatomía gruesa del cerebelo; C) Corte sagital en donde se señalan las fisuras y lóbulos. FPC, fisura preculminar; FPr, fisura primaria; FPs, fisura posterior; FPP, fisura prepiramidal; FSe, fisura secundaria; FPI, fisura posterolateral [Schmahmann, 1997].

Estructura del cerebelo

El cerebelo consta de la capa externa de la materia gris, la corteza cerebelosa y la capa interna de la materia blanca. La materia gris forma la corteza cerebelosa y los núcleos intracerebelosos [Singh, 2020]. La corteza cerebelosa está compuesta por 3 capas distintas: la capa molecular externa, capa intermedia de células de Purkinje y la corteza de capa granular interna la capa molecular. La estructura cerebelar contiene en su totalidad axones de las células granulares (fibras paralelas), las dendritas de las células de Purkinje y unas pocas células denominadas estrelladas y en canasta. En la capa intermedia se encuentran los cuerpos neuronales de las células de Purkinje, y la capa más interna, la de la granulosa, contiene principalmente células granulares; asimismo, en menor proporción se encuentran células de Golgi, células de Lugaro y células en forma de brocha [Voogd & Glickstein, 1998] figura 12.

Contiene alrededor de 30 a 50 mil millones de células granulares, 30 millones de células de Purkinje y 100 millones de células estrelladas y en cesta [Singh, 2020]. Las células mencionadas anteriormente, junto con las células de Golgi, constituyen las neuronas intrínsecas de la corteza cerebelosa. Las células estrelladas, en cesta y de Golgi, son interneuronas inhibitoras y tal colección no se encuentra en ninguna parte del sistema nervioso central excepto en el cerebelo [Voogd & Glickstein, 1998].

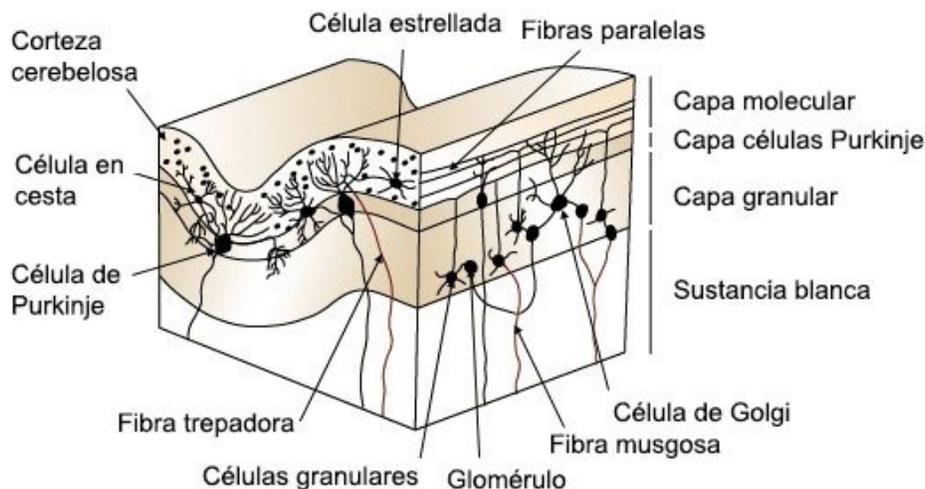


Figura 12. Organización celular de la corteza cerebelosa [Peters & Van Der, 2002].

Funciones del cerebelo

El cerebelo se encarga de mantener el equilibrio, el tono muscular, la postura y coordina los movimientos voluntarios habilidosos al regular el grado de tensión muscular entre los músculos agonistas y antagonistas [Delgado-Garcia, 2001; Morton & Bastian, 2004].

Varias entradas sensoriales de los sistemas vestibular, visual y auditivo, los receptores de estiramiento del huso muscular y el órgano del tendón de Golgi, además de los receptores táctiles y de presión de la cabeza y el cuerpo, se transmiten al cerebelo. Los impulsos sensoriales se procesan en el circuito cerebeloso intrínseco y se integran en el sistema motor mediante la corteza motora cerebral, el núcleo rojo, los núcleos vestibulares y la formación reticular [Singh, 2020]. Cuando se realiza algún movimiento, la corteza cerebral envía información a las células del asta anterior de la médula espinal para iniciar el movimiento, y también envía impulsos al cerebelo sobre el movimiento a ejecutar. Asimismo, el cerebelo recibe información propioceptiva de los músculos y las articulaciones sobre el movimiento real que se produce. El cerebelo compara esta información sobre el movimiento y, si se observa alguna diferencia en la información sobre el movimiento real y previsto, el cerebelo envía la información a la corteza cerebral y a las células de la asta anterior de la médula espinal para corregir la discrepancia, de modo que el movimiento realizado sea preciso en tiempo, velocidad, rango, fuerza y dirección [Buckner, 2013; Delgado-Garcia, 2001; Singh, 2020].

El cerebelo también ejerce influencia sobre los sistemas descendentes mediales (tracto reticuloespinal, vestibuloespinal y tectoespinal) y laterales (como el tracto rubroespinal), involucrados en mecanismos que regulan reflejos medulares, el equilibrio y la ejecución de movimientos finos [Buckner, 2013]. Por otro lado, se ha descrito que el cerebelo podría ser el sitio donde ocurre el proceso de aprendizaje motor y quizá también el lugar donde dicha información queda almacenada y da lugar a la formación de la memoria [Lisberger, 2020].

Glia Cerebelar

Las células gliales del cerebelo, y en particular los astrocitos y los oligodendrocitos, se caracterizan por una notable variedad fenotípica, en la que rasgos morfológicos muy peculiares se asocian a características funcionales específicas, únicas entre las células gliales de todo el sistema nervioso central (SNC) [Buffo, et al., 2013].

Los astrocitos, inicialmente descritos como meras células de soporte, ahora se conocen como una población heterogénea de células involucradas activamente en una variedad de funciones biológicas tales como: migración y diferenciación neuronal, regulación del flujo sanguíneo cerebral, control metabólico de la concentración de potasio extracelular y modulación de la formación y eliminación de sinapsis, entre otros. Se ha demostrado que las células gliales del cerebelo desempeñan un papel importante en la proliferación, diferenciación, migración y sinaptogénesis, mantenimiento de la barrera hematoencefálica y control de la homeostasis y el tono vascular [Araujo, et al., 2019].

Los astrocitos representan el grupo más grande de células gliales. Al igual que otros tipos de células, el envejecimiento puede causar una pérdida de la función, lo que reduce su capacidad para mantener adecuadamente un entorno saludable del SNC, alterando negativamente sus interacciones con las células vecinas y contribuyendo al estado inflamatorio característico del envejecimiento [Palmer, et al., 2018]. Los estudios que se centran en la relación que existe entre los astrocitos y la sinapsis excitatoria han demostrado que la cantidad de esta relación varía entre las regiones del cerebro entre el 60 y el 90 % de las sinapsis en el cerebelo [Farhy, et al., 2018]. Arus, et al., 2017 mostró que existen niveles elevados de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) durante el envejecimiento cerebral. Sin embargo, GFAP es solo uno de los cientos de genes que pueden regularse en astrocitos reactivos. También se han identificado cambios diferenciales en la expresión génica entre los astrocitos de envejecimiento normal y los patológicos.

La proteína ácida fibrilar glial es la principal proteína de filamento intermedio en los astrocitos maduros, pero también es un componente importante del citoesqueleto en los astrocitos durante el desarrollo [Middeldorp, et al., 2011]. El papel estructural de GFAP en los astrocitos ha sido ampliamente aceptado durante mucho tiempo, pero a lo largo de los años se ha demostrado que GFAP participa en las funciones de los astrocitos, que son importantes durante la regeneración, la plasticidad sináptica y la gliosis reactiva. Además, se han identificado diferentes subpoblaciones de astrocitos que probablemente tengan tareas distintivas en la fisiología y patología del cerebro, y que no solo se clasifican por su apariencia espacial y temporal, sino también por su expresión específica de filamentos intermedios, incluidas distintas isoformas de GFAP [Potokar, et al., 2020]. La presencia de estas isoformas aumenta la complejidad del citoesqueleto de los astrocitos y es probable que sea la base de las funciones específicas del subtipo. Se ha discutido la versatilidad de la red citoesquelética GFAP desde el gen hasta la función con un enfoque en los astrocitos durante el desarrollo, cuadros patológicos y envejecimiento del cerebro humano [Tyszkiewicz, et al., 2021].

Los informes sobre el envejecimiento de los astrocitos han demostrado que la expresión de GFAP aumenta [Clarke et al., 2018] y dado que un aumento en la expresión de GFAP es una característica común de los astrocitos reactivos/activados [Liddel et al., 2017], estos hallazgos sugieren que los astrocitos se vuelven reactivos con la edad. Tyszkiewicz, et al., 2021 demostraron una mayor reactividad de GFAP en el cerebelo y cambios de comportamiento en ratones macho de 24 semanas de edad.

Efectos del envejecimiento sobre el cerebelo

La vida diaria requiere una amplia variedad de comportamientos motores y cognitivos. Con el paso de la edad, los individuos comienzan a mostrar descensos en el rendimiento en una variedad de dominios, incluida la memoria de trabajo, la velocidad de procesamiento, el procesamiento espacial y la memoria a largo plazo,

aunque el conocimiento cristalizado notablemente, como el vocabulario, permanece intacto [Bernard & Seidler, 2014]. El volumen cerebeloso total se ha investigado principalmente utilizando técnicas automatizadas, y varios estudios informaron un volumen cerebeloso más pequeño con la edad avanzada [Andersen, et al., 2003; Hoogendam, et al., 2012].

Por otro lado, se ha demostrado gran estabilidad en el número de neuronas en la mayoría de las regiones del cerebro, incluida gran parte del hipocampo, mientras que la pérdida significativa de neuronas de Purkinje se produce en el cerebelo. Evaluaciones estereológicas de las neuronas piramidales y granulares del hipocampo y de las neuronas granulares y de Purkinje del cerebelo en ratones de 12-28 meses han revelado que en ambos tipos neuronales del hipocampo y en las neuronas granulares del cerebelo hay estabilidad en el número de neuronas; sin embargo, hay una pérdida significativa de neuronas de Purkinje [Woodruff-Pak, et al., 2010].

El aprendizaje y la memoria muestran muchos resultados alternativos y una gran variación individual durante el envejecimiento normal. El aprendizaje dependiente del cerebelo se asocia con el número de neuronas de Purkinje y se ve afectado por alteraciones relacionadas con la edad, tanto en su morfología como en la función [Kennard, et al., 2013]. Los datos sobre la vida adulta en mamíferos humanos y no humanos sugieren que las tareas esenciales del cerebelo muestran déficits relacionados con la edad a edades más tempranas que las tareas esenciales del hipocampo [Woodruff-Pak, et al., 2010].

Planteamiento del problema

Durante el envejecimiento se genera un declive estructural y funcional en diferentes órganos y sistemas que componen a un ser vivo. Esto provoca mayor susceptibilidad a enfermedades crónico-degenerativas y disminuye la calidad de vida del ser humano. Estadísticamente, se sabe que en el mundo hay 125 millones de personas con 80 años o más, siendo este el grupo más susceptible de contraer alguna enfermedad relacionada con la edad. Se estima que para el año 2050, habrá al menos 434 millones de personas en este rango de edad a nivel mundial. La distribución poblacional en México para ese mismo año se verá alterada drásticamente, ya que se prevé que únicamente dos de cada diez mexicanos tendrán menos de 15 años, lo que implica una problemática importante, puesto que decaerá la productividad laboral y económica, afectando al sistema nacional de salud. Los daños a nivel cerebral y del sistema nervioso central son inminentes causados por la pérdida de funciones motoras y cognitivas y esto ha sido estudiado en diversos modelos animales y en diversos estudios clínicos, sin embargo, a nivel del cerebelo existen pocas investigaciones que describan de forma detallada los efectos del envejecimiento y por extensión los efectos benéficos que proveen las diversas terapias anti-envejecimiento. Se ha demostrado que el 30% de los adultos mayores sufre una caída, porcentaje que aumenta hasta 40 % en los mayores de 80 años, como resultado de la pérdida del equilibrio. En años recientes, se ha señalado la afectación estructural y funcional a nivel cerebelar, lo cual se traduce en la pérdida de funciones como el equilibrio, memoria a largo plazo y una disminución de la conducta motora fina. La búsqueda de estrategias terapéuticas que retarden la aparición de los efectos del envejecimiento incluyendo el uso de antioxidantes como la cúrcuma, vitamina E, y resveratrol han mostrado gran eficacia al reducir algunos efectos característicos de la etapa senil, Ghorbani et al., 2018 demostraron que el resveratrol protege las neuronas de Purkinje y restaura la actividad muscular en un modelo de rata con ataxia cerebelosa, lo que sugiere a esta molécula como una terapia preventiva de los efectos de la etapa senil. Por lo anterior nos planteamos evaluar los efectos de un tratamiento crónico con resveratrol durante el progreso del envejecimiento

Justificación

El crecimiento acelerado de la población adulta mayor ocasiona el aumento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas o trastornos neurodegenerativos como la pérdida de la memoria, demencia, Alzheimer, entre otras. Enfermedades que incapacitan al adulto mayor en sus actividades diarias. Durante las últimas décadas, los eventos característicos del envejecimiento se han estudiado en diferentes especies, incluido el ser humano, esclareciendo el proceso fisiológico a nivel conductual y celular. Una de las principales causas del deterioro cognitivo y conductual es la acumulación de estrés oxidativo generado con el envejecimiento aunada la disminución del sistema antioxidante endógeno y daño a nivel neuronal.

En contraste, en los últimos años los investigadores se han dado a la tarea de proponer nuevos compuestos activos que retarden la disminución estructural y funcional resultantes durante el envejecimiento y con ello mantener la calidad de vida en los adultos mayores. Entre los mas destacados se encuentran la cúrcuma, vitamina E y los polifenoles como el resveratrol.

Existen estudios en modelos murinos y en cultivos celulares que describen las propiedades del resveratrol como un compuesto anticancerígeno, cardioprotector, antiinflamatorio, antioxidante, neuroprotector y antienvjecimiento. Sin embargo, aún se desconoce su efecto durante el envejecimiento a nivel cerebelar cuando es administrado crónicamente por vía oral. Por esta razón el presente trabajo plantea evaluar el uso del resveratrol como un sistema de protección para el cerebelo frente al estrés oxidativo generado durante el envejecimiento fisiológico. De tal manera, la pregunta científica de este trabajo es la siguiente:

¿La administración crónica de resveratrol mejora la estructura y función del cerebelo durante el envejecimiento en ratas Wistar?

Hipótesis nula

La administración crónica de resveratrol no muestra efectos sobre el cambio conductual, neuronal y del sistema antioxidante durante el envejecimiento cerebelar en ratas Wistar.

Hipótesis alternativa

La administración crónica de resveratrol muestra efectos benéficos sobre el cambio conductual, neuronal y del sistema antioxidante durante el envejecimiento cerebelar en ratas Wistar.

Objetivo general

Evaluar el efecto del resveratrol sobre el cambio conductual, neuronal y del sistema antioxidante durante el envejecimiento cerebelar en ratas Wistar.

Objetivos específicos

En un modelo de ratas macho de la cepa Wistar a partir de los 3 meses de edad administradas con resveratrol en una dosis de 10mg/kg de peso y sin administración alguna:

Evaluar la memoria de reconocimiento y la actividad motora en ratas administradas con resveratrol en el envejecimiento.

Identificar los cambios en los marcadores de estrés oxidativo en el cerebelo de ratas administradas con resveratrol durante el envejecimiento.

Analizar la organización neuronal del cerebelo de ratas administradas con resveratrol durante el envejecimiento.

Metodología



n=216

Ratas Wistar 3
meses de edad

Grupo control
(Sin tratamiento)

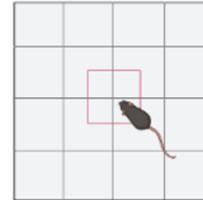
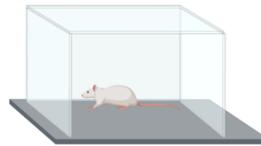
Grupo Vehículo
(Etanol 7.5%)

Grupo Vehículo + Resveratrol
(Etanol 7.5% + Resveratrol
10mg/kg/día)

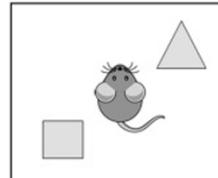
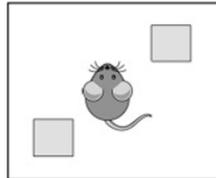
Subgrupos
2,4,6,8,10,12,14,16,18 meses de
tratamiento

Análisis conductual

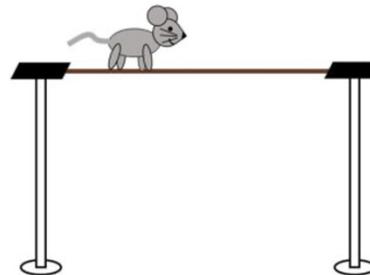
Campo abierto



Prueba de reconocimiento de objeto novedoso



Barra de equilibrio



Análisis bioquímico

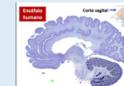


- ✓ Proteínas totales
- ✓ Nitritos
- ✓ Malonildialdehido
- ✓ 4-Hidroxiálquenos
- ✓ GSH
- ✓ GSSG

Análisis enzimático

- ✓ Catalasa
- ✓ Superóxido dismutasa
- ✓ Glutatión reductasa
- ✓ Glutatión peroxidasa
- ✓ Glutatión transferasa

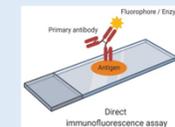
Análisis histológico



10X

- ✓ Tinción
de nissl

Análisis inmunohistoquímico



- ✓ GFAP

Administración de Animales

Se utilizaron 216 ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad con un peso aproximado de 280-320 g, obtenidas del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales se alojaron en condiciones estándar de bioterio, se colocaron en cajas de acrílico, con ciclos de luz-oscuridad de 12-12 h y temperatura $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con acceso de agua y alimento *ad libitum*.

Los animales fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos: un grupo Control (sin tratamiento), un grupo Vehículo (7.5% de etanol) y un grupo administrado con Resveratrol + Vehículo (10 mg/kg/día + 7.5% de etanol). Para la administración, la n total de animales se dividió en 9 grupos de 24 animales y se administraron durante 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 meses respectivamente. La administración se realizó mediante una cánula para todos los grupos por vía oral esofágica de Lunes a Viernes a las 8:00 am aproximadamente. El resveratrol utilizado corresponde a la marca comercial ResVitále procedente de la raíz de la planta *polygonum cuspidatum*. Para la administración de resveratrol se preparó la solución en un vehículo de agua-etanol a 7.5% en una concentración de 5 mg de resveratrol/mL. La eutanasia de los animales se hizo mediante el uso de Ketamina/Xilazina en una dosis de 0.2 mL/100 g de peso. La mitad del cerebelo fue disectado y almacenado a -70°C para las determinaciones bioquímicas y enzimáticas, y la otra mitad del cerebelo fue almacenado en formalina 4% para los posteriores pasos de deshidratación e inclusión para los análisis histológicos e inmunohistoquímicos.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-62-ZOO-1999, así como de la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” de México [Wolfle, et al., 1996]. Todos los procedimientos se llevaron a cabo minimizando el sufrimiento innecesario de los animales.

Pruebas conductuales

Campo abierto

Se realizó la prueba mediante el protocolo de [Brooks & Dunnett, 2009; Denenberg, 1969]. Ésta prueba es una de las más antiguas y mayormente reportadas debido a su fácil evaluación. Se lleva a cabo en un dispositivo cúbico de madera con medidas de 60 cm de largo x 60 cm de ancho y 60 cm de alto donde la base se divide en 3 cuadrantes de 20 cm x 20 cm. La prueba consiste en colocar al animal en el cuadrante medio y evaluar la conducta horizontal (número de cuadros visitados), grabando durante 5 min. La evaluación se realizó a las 8:00 am.

Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

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

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

Fase 1: Día de habituación

Los animales fueron habituados; para ello la rata se colocó dentro de la caja durante 5 minutos para su exploración sin objetos; posteriormente fueron colocados nuevamente en una jaula de acrílico. Entre cada prueba se limpió a profundidad el área y los objetos entre cada animal evaluado utilizando etanol al 70%. Esta habituación es importante para que el animal se familiarice con el medio ambiente.

Fase 2a: Fase de entrenamiento

24 horas después de la habituación, se realizó la fase de entrenamiento. El animal se colocó equidistante de 2 objetos idénticos y se permitió la exploración durante 5 minutos. Entre cada prueba se limpió a profundidad el área y los objetos entre cada animal evaluado utilizando etanol al 70%.

Fase 2b: Fase de evaluación de memoria a corto plazo

Después de 2 horas de la fase de entrenamiento se evaluó la memoria a corto plazo, usando uno de los objetos utilizados en la fase anterior y un objeto novedoso en el área de trabajo. Los objetos se colocaron en la misma ubicación utilizada de la fase anterior. Se permitió la exploración libre durante 5 minutos y al finalizar se limpió a profundidad el área y los objetos entre cada animal evaluado utilizando etanol al 70%.

Fase 3: Fase de evaluación de memoria a largo plazo

Después de 24 horas de la evaluación de la memoria a corto plazo, uno de los objetos con los que se analizó la memoria a corto plazo se reemplazó por un objeto novedoso y se permitió la exploración libre durante 5 minutos y al finalizar se limpió a profundidad el área y los objetos entre cada animal evaluado utilizando etanol al 70%.

Durante cada etapa se midió el tiempo en el sujeto toca el objeto con la nariz y/o patas delanteras o lo olfatea y se calculó el índice de memoria de reconocimiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de reconocimiento} = \frac{TB}{TA+TB}$$

Donde: TA: Objeto familiar; TB: Objeto novedoso

Prueba de barra de equilibrio

Se llevó a cabo mediante el protocolo de [Wallace, et al., 1980; Tung, et al., 2014]. Las ratas fueron entrenadas 24 horas antes para viajar a través de la viga. En esta fase de entrenamiento se colocó a cada animal en la viga justo afuera de la abertura de la caja de meta, permitiéndole caminar hacia adentro. Se continuó colocando al animal más lejos de la caja de meta hasta que pudiera caminar sin ayuda desde la línea de inicio hasta la caja de meta.

Durante la prueba, los animales caminaron desde el extremo inferior de la viga, que está a 50 cm por encima del suelo, hasta la caja oscura en el otro extremo (13 x 22 cm, con una puerta de 5 x 6 cm) situada a 60 cm del suelo. La propia viga tiene 1 m de longitud y con dos secciones transversales cuadradas intercambiables con una longitud de lado de 40 y 50 mm respectivamente.

Se colocó una cámara a un costado de la barra de equilibrio, verificando que se capturara toda la longitud de la barra de equilibrio y de que las barras de salida y llegada fueran completamente visibles. También se colocó una sábana en el piso de la caja oscura para facilitar la limpieza y las heces después de cada prueba. Adicionalmente, se colocó una manta de amortiguación debajo de la viga elevada para proteger a los animales si caen de la viga.

Debido a que los roedores buscan naturalmente la oscuridad y la protección de la caja en favor del rayo expuesto, se les animó a atravesar el rayo por la ligera pendiente que explota su mecanismo de escape natural para correr en una dirección ascendente.

Análisis Bioquímico

Para realizar las determinaciones bioquímicas se preparó un homogenizado a partir de 100 mg de tejido cerebelar que previamente fue almacenado a -70°C . Los tejidos fueron pesados en una balanza analítica en una caja de Petri de plástico. Una vez obtenidos los 100 mg de tejido se realizó el homogenado en 1500 μL de PBS 1X. Posteriormente fueron centrifugados a 12 500 rpm durante 30 minutos a 4°C en una microcentrifuga. Se recolectó el sobrenadante y fue almacenado a -70°C hasta la realización de cada técnica.

Cuantificación de proteínas totales

Las proteínas totales se cuantificaron mediante el método de Sedmak & Grossberg, 1977, usando albúmina sérica bovina como estándar. Las proteínas se cuantificaron en 2 μL del sobrenadante más 500- μL del reactivo de color (azul de Coomassie 0.06% a 465 nm), llevado a 1 mL con agua destilada. La absorbancia se cuantificó en un espectrofotómetro UV/Vis Jenway 6405 a una longitud de 620 nm. La concentración de proteínas se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar de albúmina de suero bovina (1 a 10 μg).

Cuantificación de nitritos

La producción de $\cdot\text{NO}$ se analizó de manera indirecta relacionando el contenido de NO_2^- por el método de Griess Tsikas, 2006. En este ensayo la reacción colorimétrica fue inducida por la adición de 100 μL de sobrenadante + 100 μL del reactivo de Griess y 800 μL de H_2O . Posteriormente la absorbancia de la reacción se cuantificó en un espectrofotómetro UV/Vis Jenway 6405 a una longitud de 540 nm. La concentración de NO_2^- se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar de NaNO_2 determinada para el ensayo.

Determinación de MDA+ 4-HDA

Los niveles de MDA y 4-HDA se realizaron por el método de Erdelmeier, et al., 1998, en las muestras se analizó la concentración de la peroxidación lipídica, utilizando el N-metil-2-fenil-indol como reactivo cromógeno [10.3 mM]. Para esto se adicionó 100 μ L de agua destilada + 100 μ L de sobrenadante + 650 μ L de solución I diluida, se agitó vigorosamente y luego se adicionó 150 μ L de ácido metanosulfónico (MDA + 4-HDA) ó HCl al 35% (MDA). Los tubos se incubaron a 45°C por 60 minutos (MDA) y a 45°C por 40 minutos (MDA + 4-HDA), se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugaron por 15 minutos a 3000 rpm. Posteriormente se cuantificó la absorbancia de la reacción en un espectrofotómetro UV/Vis Jenway 6405 a una longitud de 586 nm. La concentración de MDA y 4-HDA se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar de 1, 1, 3, 3, tetrametoxipropano.

Cuantificación de GSH y GSSG

El contenido total de GSH y GSSG fue determinado mediante la técnica de reciclaje enzimático basada en el uso de la enzima glutatión reductasa [Rahman, et al., 2007]. El glutatión es oxidado por el ácido 5,5'-nitrobenzoico (DNTB) y reducido por la NADPH en presencia de glutatión reductasa [Tietze, 1969]. Para determinar la concentración de glutatión total, la formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico fue monitoreada a 412 nm y el glutatión presente fue evaluado por la comparación del resultado con la curva estándar. Cuando se utiliza 2-vinilpiridina o 4-vinilpiridina (que no inhiben a la glutatión reductasa) para enmascarar GSH, el procedimiento es específico para GSSG.

Para el cálculo de la concentración de GSH se realizó la siguiente operación:

$$GSH = GSH \text{ total} - GSSG.$$

Para el cálculo de la capacidad de protección celular se utilizó la operación:

$$\text{Capacidad de protección} = 2GSH/GSSG$$

Análisis Enzimático

Determinación de la Actividad enzimática de Catalasa

La actividad de CAT se determinó espectrofotométricamente por el método de Aebi, 1984; Aguilar-Alonso, et al., 2018. Se adicionó en una celda de cuarzo 635 μL de PBS [50 mM] pH 7.4, 330 μL de H_2O_2 [30 mM] y 35 μL de sobrenadante, se siguió la reacción por dos minutos tomando la lectura en el minuto 0 y 2 a una temperatura de 20 °C mediante baño María. Las lecturas se realizaron utilizando la región ultravioleta, específicamente en un espectrofotómetro UV/Vis Jenway 6405 a una longitud de 240 nm. Para la determinación de la actividad enzimática, la ΔDO se multiplicó por el coeficiente de extinción molar 692.5 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ y se ajustó a 1 mg de proteína presente en el sobrenadante.

Determinación de la Actividad de Superóxido Dismutasa

La actividad de SOD se determinó de acuerdo con el método del pirogalol [Marklund & Markund, 1974; Baltazar-Gaytan, et al., 2019]. El pirogalol en medio básico se auto-oxida generando en el medio de reacción al radical superóxido; de este modo, la reacción radicalaria se propaga, acelerando la auto-oxidación, absorbiendo el paso de luz a 420 nm. La presencia de SOD inhibe la autooxidación al evitar la reacción de propagación.

Se realizó el ensayo blanco de la reacción no inhibida hasta obtener una ΔDO 0.020 ± 0.001 (en caso de no obtener los resultados con volúmenes estándar se varía el volumen de Pirogalol y Tris-HCl para obtener una ΔDO de 0.020 ± 0.001). La actividad enzimática se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

Dónde: Δ D.O.m: Diferencia de D.O. de la muestra.

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

V.M. valor medio.

Determinación de la Actividad enzimática de Glutación transferasa

La actividad de GST se determinó de acuerdo con el método de Habig, et al., 1974. Se homogenizó el tejido en buffer de fosfatos 50 mM; posteriormente se centrifugaron las muestras a 10000rpm por 10 minutos a 4°C.

Preparación de los reactivos:

Para calcular la masa hay que pesar de cada reactivo cuando se especifique concentración molar se usa la formula de la molaridad de la cual se desprende que

$$m = M(PM)(V)$$

m= masa

M= Molaridad

PM= Peso molecular

V= Volumen

Reactivo 1: Buffer 0.1M de KH_2PO_4 a pH 6.25. Se prepara en agua destilada

Reactivo 2 : GSH 30.7 mg/mL en agua destilada.

Reactivo 3: DNCB (1 cloro,2-4dinitrobenceno) 76.8 mg en 5 mL de etanol al 95%.

Se tomaron 30 μL del sobrenadante obtenido previamente, se adicionaron 125 μL de reactivo 1, 15 μL del reactivo 2 y 3.5 μL del reactivo 3. Se obtuvo la $\Delta\text{ABS}/\text{min}$ monitoreando la reacción por 5 min, a 37 °C y una longitud de 405 nm

Cálculos:

$$\text{Actividad de GST} \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) = (\Delta\text{ABS muestra} - \Delta\text{ABS blanco (4166.66)}) * \text{Factor} = 2$$

Determinación de la Actividad enzimática de Glutación reductasa

La actividad de GR se determinó de acuerdo con el método de Smith, et al., 1988. Se homogenizó el tejido en buffer de fosfatos 50 mM; posteriormente se centrifugaron las muestras a 10000rpm por 10 minutos a 4°C.

-Paso A: Se añadió 150 µL del reactivo principal + 30 µL del buffer regulador + 10 µL de muestra + 10 µL de FAD 315 µM. Se determinó la Δ ABS/min durante 3 min en un espectrofotómetro atemperado a 340 nm (A).

-Paso B: Se añadió 20 µL de buffer regulador + 30 µL de GSSG. Se determinó la Δ ABS/min durante 3 minutos en un espectrofotómetro a 37 °C a una longitud de 340 nm (B).

Cálculos:

$$\text{Actividad de GR} \left(\frac{U}{mL} \right) = (B - A) * (\text{Factor de dilución} = 2)$$

Determinación de la Actividad enzimática de Glutación peroxidasa

La actividad de GPx se determinó de acuerdo con el método de Flohé, 1984. Se homogenizó la muestra en buffer de sucrosa al 10%. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 10000rpm por 10 minutos a 4°C.

Para la reacción se tomaron 125 µL de muestra y 200 µL de reactivo de acoplamiento. Se incubó durante 3 minutos a 37 °C. Luego, se adicionó 6.25 µL de sustrato de hidroperóxido. Se determinó la Δ ABS/min durante 2 minutos en un espectrofotómetro a 37 °C a una longitud de 340 nm.

Cálculos:

$$\text{Actividad de GPx} \left(\frac{U}{mL} \right) = (\Delta\text{ABS}/\text{min}) * (\text{Factor de dilución} = 161)$$

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

Inclusión en parafina

Los cerebros fijados en formalina al 4% fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol (70, 80, 96, 100%), mezcla de alcohol-xilol y xilol. Una vez los tejidos estaban deshidratados fueron embebidos e incluidos en parafina (Paraplast) para la formación de bloques. Posteriormente, utilizando un microtomo se obtuvieron cortes de 7 μ M de grosor. Finalmente, los cortes se montaron en laminillas silanizadas previamente.

Tinción de Nissl

Las laminillas con los cortes histológicos fueron colocadas en una canastilla para llevarlos a aclaramiento con xilol, hidratación con alcoholes y enjuagados con agua desionizada. Fueron teñidas en solución de Violeta de Cresilo durante 30 min, para posteriormente ser enjuagados con agua destilada, deshidratados con alcoholes y, por último, aclarados con xilol. Las laminillas fueron acondicionadas con Resina de Entellan para su posterior observación al microscopio. Las células de Purkinje viables se identificaron a aquellas que contaban con núcleo azul redondo y citoplasma perinuclear claro. Las células de Purkinje dañadas o no viables se tomaron a las células con núcleos alterados (picnosis, cariorexis y cariólisis). Se examinó el número de células de Purkinje viables en el cerebelo. Las neuronas se contaron utilizando imágenes capturadas con cámara digital y utilizando el software Leica IM1000. De todas las imágenes, analizamos las neuronas no dañadas por campo óptico de cuatro secciones en serie para cada rata a través de Image-J.

Inmunohistoquímica

Los cortes se desparafinaron y rehidrataron, luego se enjuagaron las laminillas con buffer de fosfatos, pH 7.4 (PBS) por 5 minutos. La unión inespecífica fue bloqueada con albúmina de suero bovino (Sigma) al 5% en PBS durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para ello se marcó con plumón hidrofóbico alrededor de la muestra, se colocaron 40 μ L de albúmina a cada corte. Seguido de esto, se hizo enjuague con PBS por 5 minutos. Posteriormente se

realizó la inmersión en solución de Tritón X-100 0.2% colocando 200 mL de PBS y 400 μ L de Tritón; se mezcló y se dejaron las laminillas 10 minutos en el Köplin. Nuevamente se enjuagaron las laminillas con PBS por 5 minutos. Los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario (Anti-Glial fibrillary Acidic Protein (GFAP) LOT: 2842124) durante 24 horas a 4°C a oscuras; para esto se colocaron 40 μ L de anticuerpo por cada corte para cubrir todo el tejido y se colocaron en cámara húmeda cerrada. Después del tiempo de incubación, se enjuagaron las laminillas con PBS por 5 minutos. Después se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor488-conjugated AffiniPure Goat) diluido en PBS 1X con 1% de BSA libre de IgG a oscuras. Pasado ese tiempo, se enjuagaron las laminillas con PBS por 5 minutos. Finalmente, se hizo el montaje con VectaShield-DAPI, \cong 15 μ L/laminilla a oscuras y se sellaron las laminillas con barniz alrededor del cubreobjetos. El análisis de la inmunorreactividad de GFAP se realizó en un microscopio acoplado a una lámpara de mercurio y con los filtros: rojo, azul y verde (Leica, DM/LS). El registro de las imágenes observadas se captura por medio de una cámara digital (DFC – 300 FX) Leica, acoplada al microscopio y con los objetivos 20x y 40x. Las fotomicrografías obtenidas en formato JPEG, del software IM1000, se almacenaron y fueron posteriormente analizadas. El número de píxeles fue contado por cada rata por medio de imágenes capturadas con una cámara digital Leica usando el software Image–J.

Análisis estadístico

Para los resultados obtenidos de variables no paramétricas, los datos obtenidos se expresaron como la media de 6 animales \pm Error Estándar de la media (EEM). Prueba de U de Mann-Whitney, seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni-Dunn se usaron como una prueba posterior para evaluar las diferencias estadísticamente significativas. * Indica $p < 0.05$.

Para los experimentos de variables paramétricas, los datos obtenidos se expresaron como la media de 6 animales \pm Error Estándar de la media (EEM). ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey se usaron como una prueba posterior para evaluar las diferencias estadísticamente significativas. * Indica $p < 0.05$.

Resultados

Peso

Los grupos de ratas fueron pesados al inicio de la administración y antes de la eutanasia según el periodo de tratamiento correspondiente, figura 13. Los animales fueron alimentados con la dieta estándar 5001 de Labdiet. En el día 0 del tratamiento los animales de los grupos control, vehículo y resveratrol mostraron una media de 276.54 ± 4.15 gramos en el peso corporal. Para los primeros 2 meses de tratamiento, se observó un incremento en el peso a 328.33 ± 4.7 gramos; subsecuentemente, el grupo con 4 meses de administración presentó una media de peso de 386.87 ± 9.5 gramos. El grupo con 6 meses de tratamiento incrementó su peso corporal a 432.45 ± 13.45 gramos. Lo anterior se denota como un incremento gradual dependiente de la edad en todos los grupos experimentales, sin diferencias significativas entre sí. A partir de los 8 meses de tratamiento se registró una tendencia más lenta hacia el incremento en el peso de los animales para los siguientes periodos evaluados.

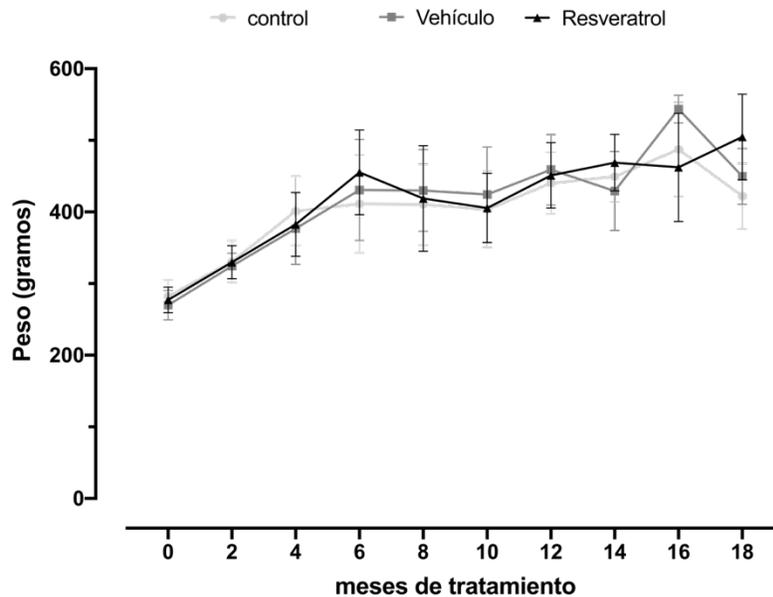


Figura 13. Efecto de la administración de resveratrol sobre el peso en ratas de la cepa Wistar. Los datos expresan la media \pm EEM para una $n = 8$. (Prueba de U de Mann-Whitney post-hoc Bonferroni-Dunn; $p < 0.05$)

La administración de resveratrol incrementa la actividad locomotora en la etapa de envejecimiento.

Se realizó la prueba de campo abierto a todos los grupos estudiados. En este ensayo se cuantificó la conducta horizontal mediante el conteo del número de cuadros visitados en el campo de trabajo durante 5 minutos, figura 14. Los resultados se muestran en la figura 15A. Durante los primeros 10 meses de estudio no existió modificación en la actividad locomotora en los grupos vehículo y control; sin embargo, el grupo resveratrol mostró una tendencia al incremento en la actividad motora. A partir del grupo tratado durante 12 meses con resveratrol, el incremento en la actividad locomotora fue estadísticamente significativo, mostrando una media de 27.5 ± 1.05 para el grupo control, una media de 27.12 ± 1.67 para el grupo vehículo y para el grupo tratado con resveratrol una media de 34.37 ± 1.64 , demostrando un incremento del 27.3% en la actividad locomotora. El mayor incremento en la actividad locomotora se dio con 16 meses de tratamiento, mostrando una media de 26.8 ± 0.66 para el grupo control, una media de 27.5 ± 0.5 para el grupo tratado con vehículo y para el grupo administrado con resveratrol una media de 37 ± 1.58 , siendo un incremento del 37.07 % de la actividad respecto al grupo control.



Figura 14. Prueba de campo abierto. Realizada en una caja de 60 cm de largo x 60 cm de ancho y 60 cm de alto donde la base se divide en 3 cuadrantes de 20 cm x 20 cm.

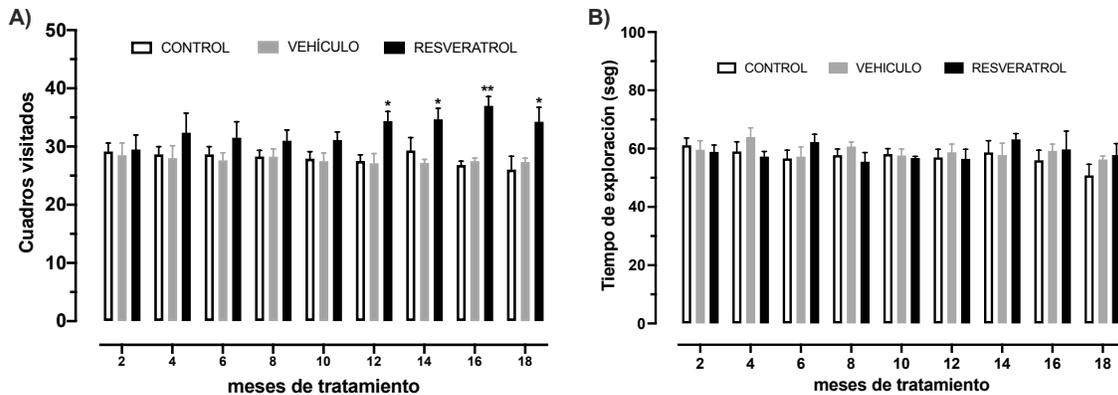


Figura 15. Efecto del resveratrol sobre la conducta motora. A) Número de cuadros visitados, durante la prueba de campo abierto B) Tiempo total de exploración de 2 objetos idénticos, durante la fase de habituación de la prueba de NOR. Los datos expresan la media \pm EEM para una $n = 8$. Los datos expresan la media \pm EEM para una $n = 8$. (Prueba de U de Mann-Whitney post-hoc Bonferroni-Dunn; * $p < 0.05$; ** $p < 0.0001$)

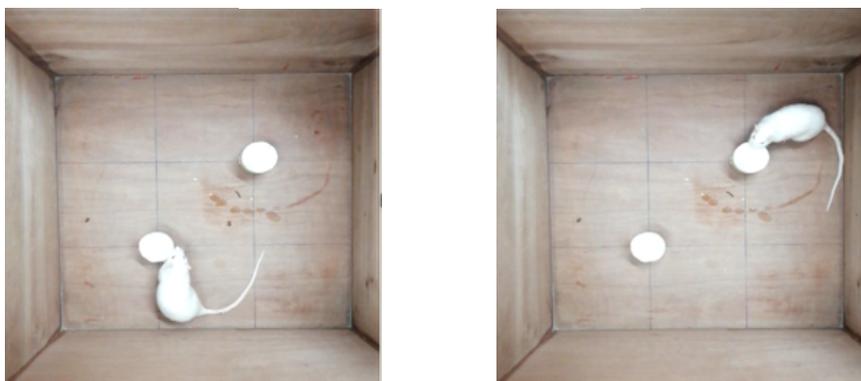
Uno de los métodos utilizados para la evaluación de la capacidad de aprendizaje y memoria de los roedores fue mediante la prueba de NOR. En esta prueba se evaluó el tiempo de exploración que cada animal le dedica a diferentes objetos presentados ante él en un espacio determinado. Primero se realizó la fase de habituación donde se expuso a los animales a 2 objetos idénticos y los resultados se muestran en la Figura 15B, donde se observó claramente que la capacidad de exploración de los animales no se vio modificada durante los diferentes periodos de administración evaluados, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.

La administración crónica de resveratrol mantiene los procesos de aprendizaje y memoria en Ratas

Se realizó la prueba de NOR con el fin de evaluar el efecto del resveratrol sobre el aprendizaje y memoria a corto y largo plazo, figura 16. Los resultados se muestran en la figura 17. Se graficó el índice de reconocimiento que relaciona el tiempo de exploración del objeto familiar respecto al tiempo invertido en explorar los objetos novedosos, durante la evaluación a corto y largo plazo. Seguido del análisis se observaron diferencias significativas a partir de los 8 meses de tratamiento entre el grupo resveratrol respecto al grupo control correspondiente.

La mayor diferencia se evidenció a los 18 meses de tratamiento, ya que la evaluación de la memoria de reconocimiento a corto plazo (MRCP) mostró una media de 0.5883 ± 0.01 para el grupo control, para el grupo tratado con vehículo 0.5925 ± 0.01 y para el grupo tratado con resveratrol una media de 0.72 ± 0.01 , en el índice de reconocimiento. Por otro lado, durante la evaluación de la memoria a largo plazo se observó una media de 0.5683 ± 0.01 para el grupo control, una media de 0.5725 ± 0.012 que corresponde al grupo vehículo y para el grupo resveratrol se encontró una media de 0.72 ± 0.01 . Estos datos sugieren una mejora en la memoria de reconocimiento en un 25% y 30.35% para la memoria a corto y largo plazo, respectivamente.

Fase de familiarización



Familiarización con 2 objetos idénticos (cilindros), de mármol sin aroma o textura que modifique la conducta de los sujetos de experimentación

Evaluación de memoria a corto y largo plazo



Se usó uno de los objetos utilizados en la fase anterior (cilindro) y un objeto novedoso en el área de trabajo (cubo).

Uno de los objetos con los que se analizó la memoria a corto plazo (cubo) se reemplazó por un objeto novedoso (octaedro).

Figura 16. Prueba de Reconocimiento de Objeto Novedoso

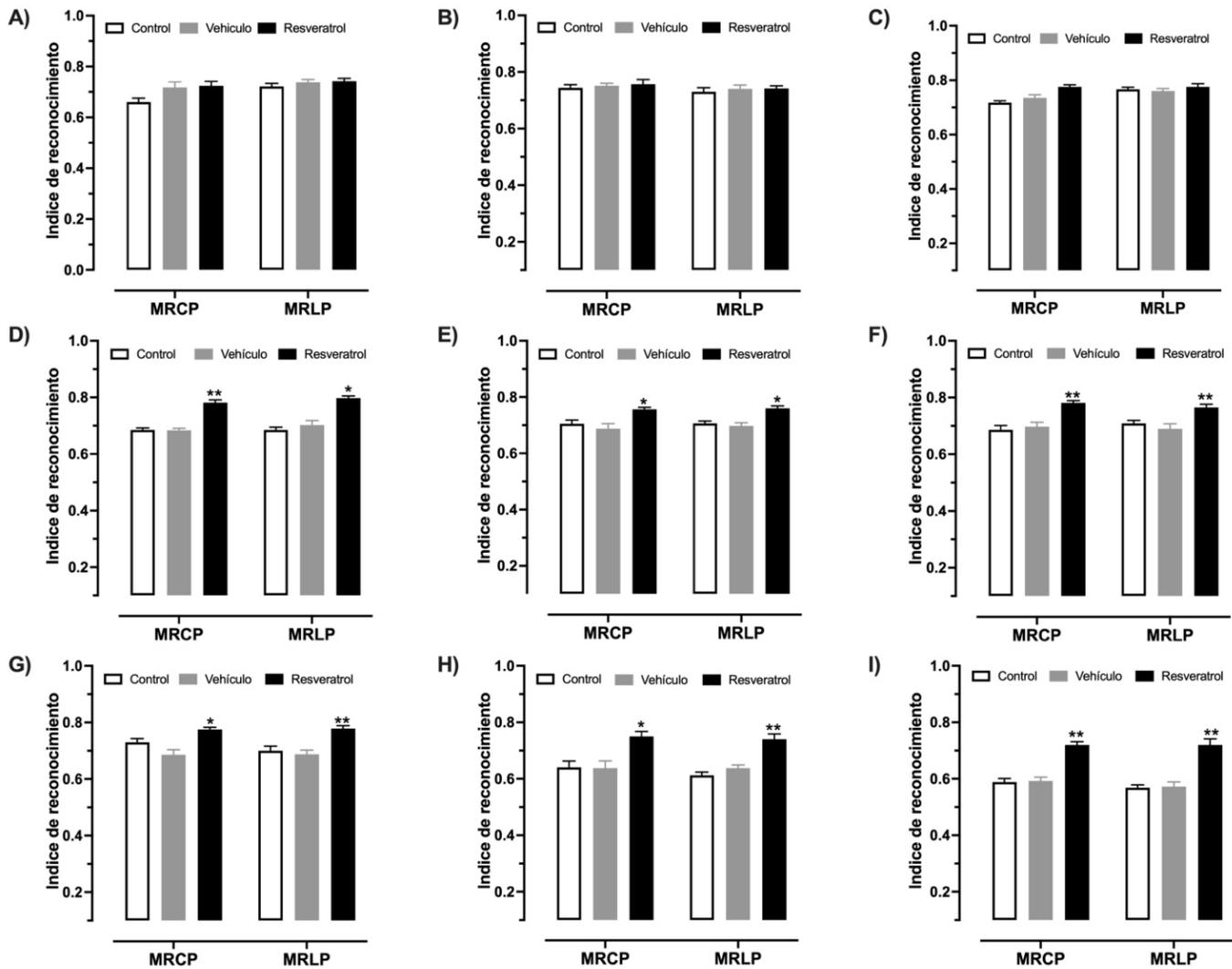


Figura 17. Efecto del resveratrol sobre la memoria a corto y largo plazo. **A)** 2 meses; **B)** 4 meses; **C)** 6 meses; **D)** 8 meses; **E)** 10 meses; **F)** 12 meses; **G)** 14 meses; **H)** 16 meses y **I)** 18 meses de tratamiento. MRCP (Memoria de reconocimiento a corto plazo); MRLP (Memoria de reconocimiento a largo plazo). Los datos expresan la media \pm EEM para $n=8$ ratas. Los datos expresan la media \pm EEM para una $n = 8$. (Prueba de U de Mann-Whitney post-hoc Bonferroni-Dunn; * $p < 0.05$; ** $p < 0.0001$)

Efecto del resveratrol sobre la conducta motora fina durante el envejecimiento

Se realizó la prueba de barra de equilibrio para analizar la conducta motora fina de las ratas durante el proceso de envejecimiento y el efecto que muestra un tratamiento crónico con resveratrol. Los resultados se presentan en la figura 18. Un tratamiento de hasta por 12 meses no mostró diferencias estadísticamente

significativas entre los grupos tratados con resveratrol respecto de los grupos control y los tratados con etanol 7.5% en la conducta de equilibrio.

En los incisos A y C se muestra el número de resbalones ocurridos en la viga de 50 mm y el tiempo que tardaron en cruzar la viga de 1 m de ancho. En este aspecto de la evaluación, se observó que hasta los 16 y 18 meses de tratamiento existió un incremento significativo de resbalones, que correspondieron a un aumento del 168% en el grupo control, comparándolos con el grupo administrado con resveratrol.

En los incisos B y D muestran un incremento en el número de resbalones respecto a la edad, así como el tiempo en cruzar la viga de 40mm. Sin embargo, un tratamiento crónico con resveratrol exhibió la capacidad de conservar la conducta motora fina a partir de los 14 meses de tratamiento en la viga de 40 mm y a partir de los 16 meses en la viga de 50 mm.

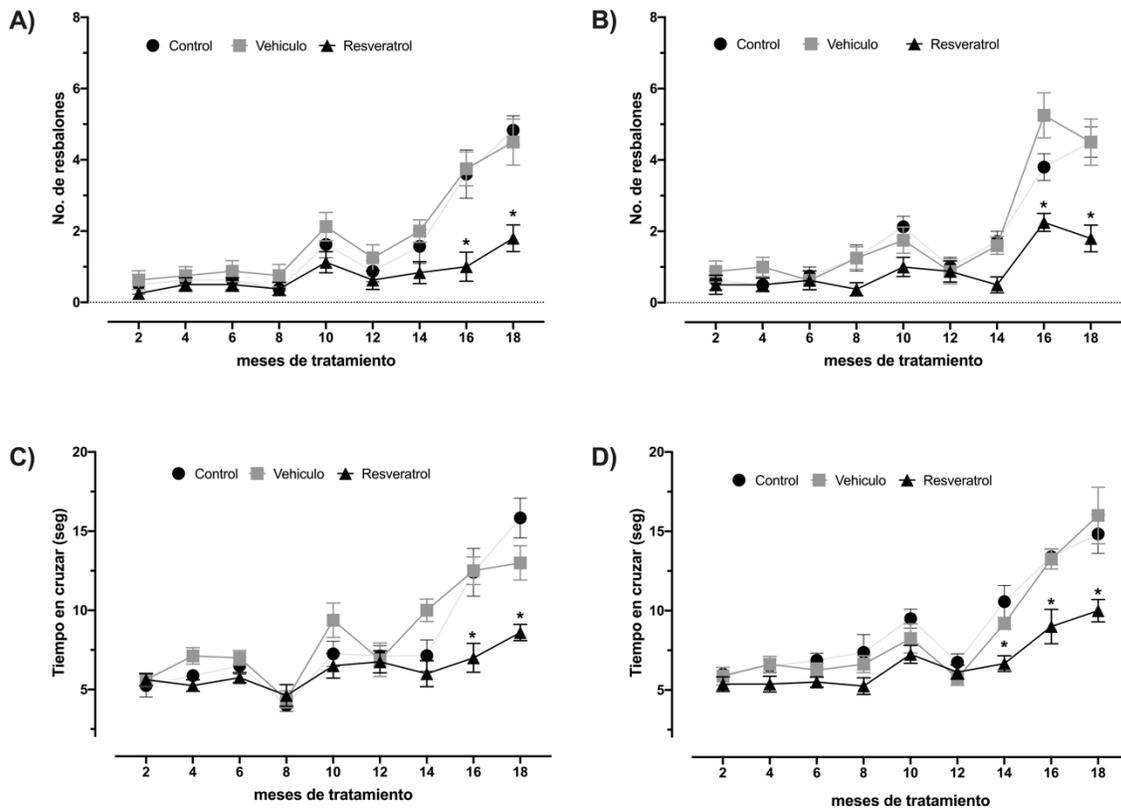


Figura 18. Efecto del resveratrol sobre la conducta motora fina. **A)** Número de resbalones en la viga de 50 mm; **B)** Número de resbalones en la viga de 40 mm; **C)** Tiempo en cruzar la viga con la viga 50mm; **D)** Tiempo en cruzar la viga con la viga 40mm. Los datos expresan la media±EEM para

*n=8 ratas. Los datos expresan la media \pm EEM para una $n = 8$. (ANOVA de una vía post-hoc Tukey; * $p < 0.05$).*

El resveratrol disminuye los productos de lipoperoxidación (MDA y 4-HDA) y los niveles de nitritos durante el envejecimiento.

Se analizaron los niveles de los productos mayoritarios de la lipoperoxidación (MDA y 4-HDA) que se generaron después de la oxidación de las membranas lipídicas. Los niveles de nitritos se emplearon como una medida indirecta de la producción de NO. Estos compuestos son comúnmente utilizados como marcadores de estrés oxidativo en plasma y tejidos, [Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014].

Durante los primeros meses de tratamiento con resveratrol no se presentó diferencia significativa en la producción de los marcadores de estrés oxidativo referidos. En la figura 19A se muestran los resultados de la evaluación de la lipoperoxidación total, donde se encontró una diferencia significativa a partir de los 12 y hasta los 18 meses de tratamiento con resveratrol, siendo este último mes donde se observó la mayor diferencia mostrando una media de $0.033 \pm 0.01 \mu\text{M}/\text{mg PT}$ para el grupo control $0.298 \pm 0.012 \mu\text{M}/\text{mg PT}$ para el grupo vehículo y una media de $0.010 \pm 0.001 \mu\text{M}/\text{mg PT}$ para el grupo resveratrol. Los niveles de MDA mostrados en la Figura 19B presentaron diferencias estadísticamente significativas del grupo tratado con resveratrol respecto a su grupo control a partir de los 10 meses de tratamiento. Por su parte el 4-HDA en la Figura 19C evidenció un incremento significativo desde los 8 meses de tratamiento con resveratrol respecto al grupo control. Podemos apreciar que el resveratrol manifestó su capacidad antioxidante, manteniendo los niveles de los productos de lipoperoxidación al mínimo como se observó en edades tempranas de los animales. Adicionalmente, los niveles de nitritos en la Figura 19D exhibieron un incremento en el grupo control desde los 4 meses de tratamiento, mostrándose la mayor diferencia a los 18 meses de tratamiento, donde existió una disminución del 59% en el grupo tratado con resveratrol respecto al grupo control.

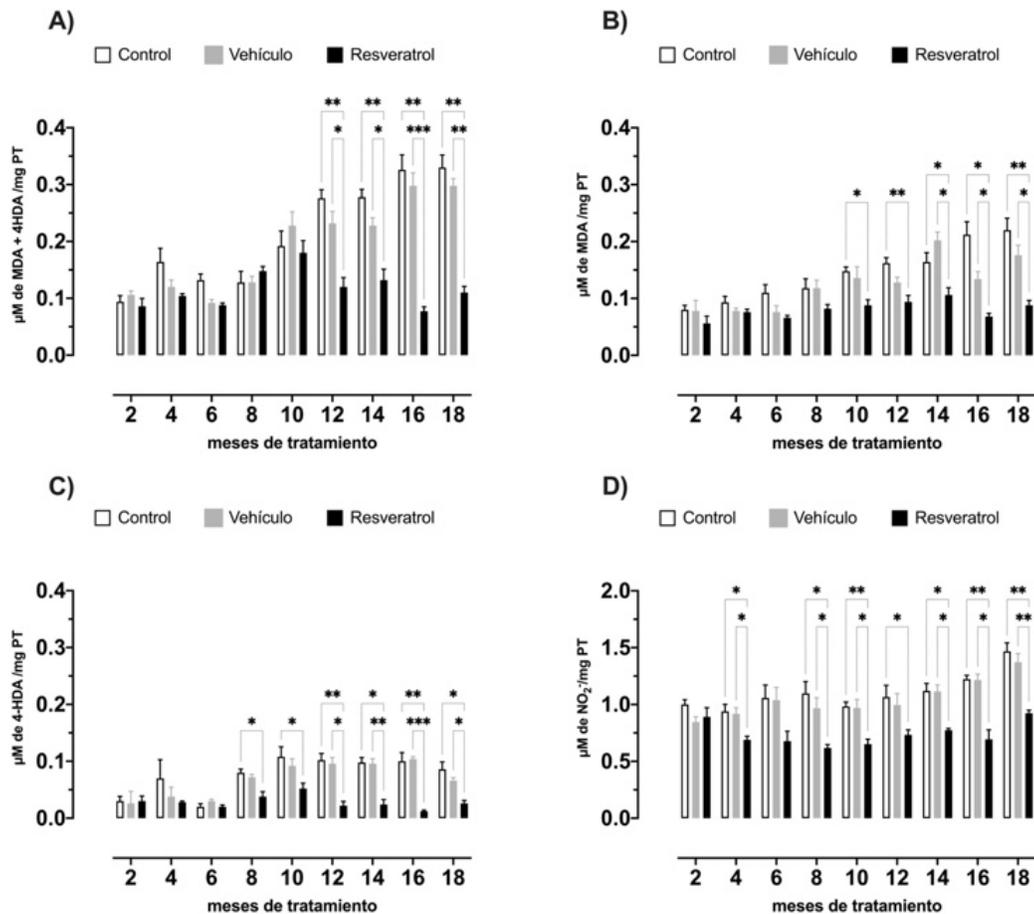


Figura 19. Efecto del resveratrol sobre los marcadores de estrés oxidativo durante el proceso de envejecimiento. A) MDA+4-HDA; B) MDA; C) 4-HDA; D) Nitritos. Los datos expresan la media \pm EEM para $n=8$ ratas. (ANOVA de una vía post-hoc Tukey); * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Efecto de la administración crónica de resveratrol sobre la actividad enzimática de Superóxido dismutasa y Catalasa durante el proceso de envejecimiento.

La modificación del sistema enzimático endógeno conduce a una acumulación de radicales libres y por consiguiente mayor daño celular. La actividad enzimática de SOD y CAT se vio modificada significativamente hasta los 10 y 12 meses de tratamiento respectivamente. Con respecto a la actividad SOD a los 18 meses de tratamiento, se presentó una media de 243.50 ± 3.55 UI/mg PT en el grupo control, una media de 239.89 ± 4.27 UI/mg PT en el grupo vehículo y para el grupo administrado con resveratrol se observó una media de 300.82 ± 3.48 UI/mg PT; esto indicó un incremento del 23.5% en la actividad de esta enzima con el tratamiento con resveratrol respecto al grupo sin tratamiento; Figura 20A.

La actividad de CAT mostró una media de 1.57 ± 0.15 UI/mg PT en el grupo control, una media de 1.42 ± 0.12 UI/mg PT para el grupo vehículo y una media de 2.68 ± 0.16 UI/mg PT en el grupo tratado con resveratrol, lo que representó un incremento del 70.7% de la actividad de esta enzima cuando se administraron 10 mg/kg/día resveratrol por periodos prolongados; Figura 20B.

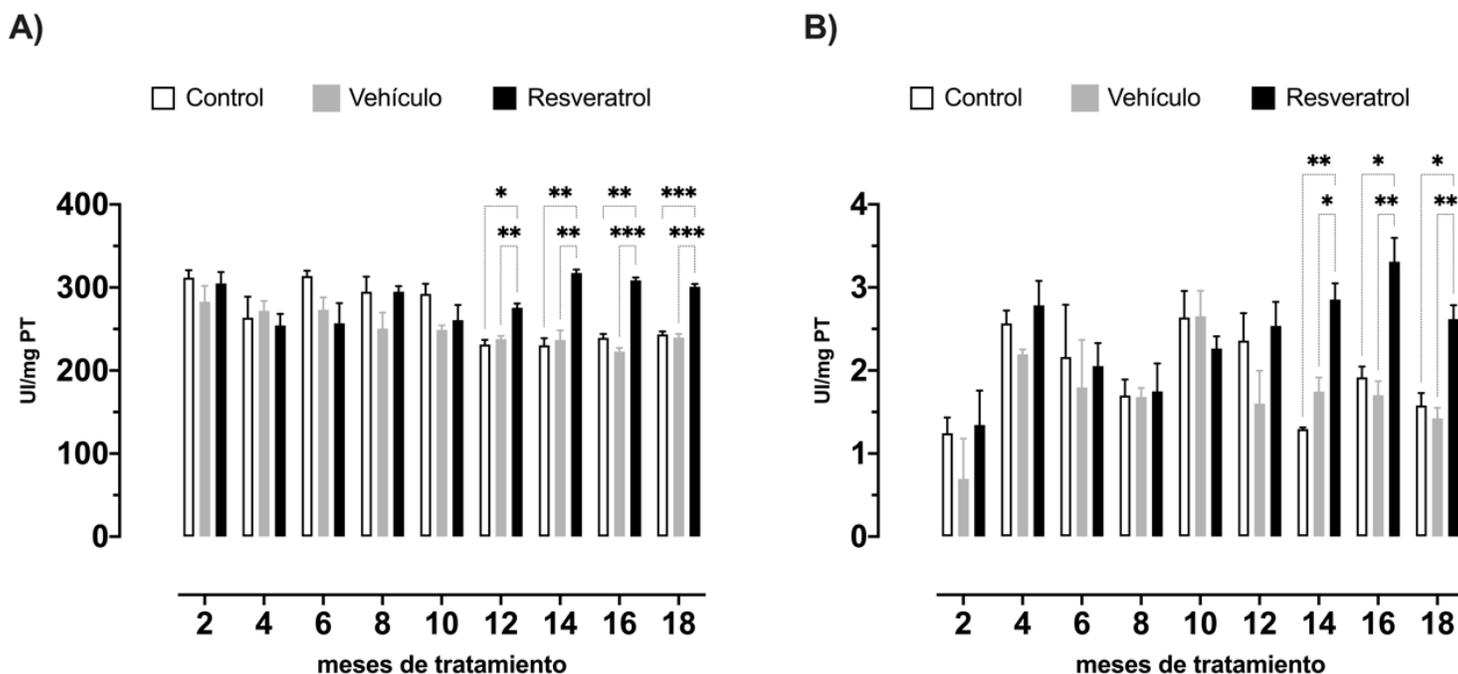


Figura 20. Efecto del resveratrol sobre la actividad de las enzimas Catalasa y Superóxido dismutasa durante el proceso de envejecimiento. A) Superóxido dismutasa; B) Catalasa. Los datos expresan la media \pm EEM para $n=8$ ratas. (ANOVA de una vía post-hoc Tukey); * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Efecto del resveratrol durante el proceso de envejecimiento sobre el sistema de glutatión.

Los resultados del análisis del sistema de recicle de glutatión se presentan en la figura 21. En relación con el comportamiento del glutatión total, ilustrado en la figura 21A, y del GSH en la figura 21B, no se presentaron diferencias significativas en el grupo tratado con resveratrol en los diferentes periodos de tiempo analizados. Sin embargo, a partir de los 10 y hasta los 18 meses, el grupo resveratrol se mostró significativamente más alto cuando se comparó con su grupo control correspondiente.

En contraste, el GSSG evidenció un comportamiento opuesto, ya que el tratamiento crónico con resveratrol mostró un impacto benéfico en los animales tratados con esta molécula ya que se evidenciaron reducciones importantes en los niveles de GSSG y en contraste se presentó un incremento directamente proporcional a la edad de los animales de los grupos control y vehículo. De manera más clara se observó que los niveles de GSH en el grupo resveratrol se mantuvieron en los diferentes periodos de tiempo mientras que el GSSG disminuyó, como se muestra en la figura 21C.

Por otro lado, la actividad enzimática de la Glutación peroxidasa al ser una enzima importante en la protección contra el daño causado por los hidroperóxidos y en especial del H_2O_2 disminuyó gradual y significativamente en el grupo tratado con resveratrol respecto su correspondiente grupo control a partir de los 12 meses, y este comportamiento continuó hasta los 18 meses de tratamiento; Figura 21D.

La actividad de glutación S-transferasa no mostró modificaciones significativas en los grupos administrados crónicamente con resveratrol, pero se observó que en los grupos control y vehículo la actividad enzimática disminuyó significativamente a partir de los 12 meses de administración, mostrando la mayor diferencia a los 18 meses de administración, al realizar la comparación cronológica se observó un descenso del 75% en la actividad enzimática del grupo control de 18 meses respecto al grupo control de 2 meses; Figura 21E.

La actividad enzimática de glutación reductasa encargada de realizar la actividad final del reciclaje de glutación presentó un incrementó gradual con un tratamiento crónico con resveratrol, presentando un 46% al alza en su actividad enzimática en el grupo resveratrol de 18 meses respecto a su grupo control, cabe destacar que no se observaron modificaciones significativas en los grupos control y vehículo, respecto a la edad; Figura 21F.

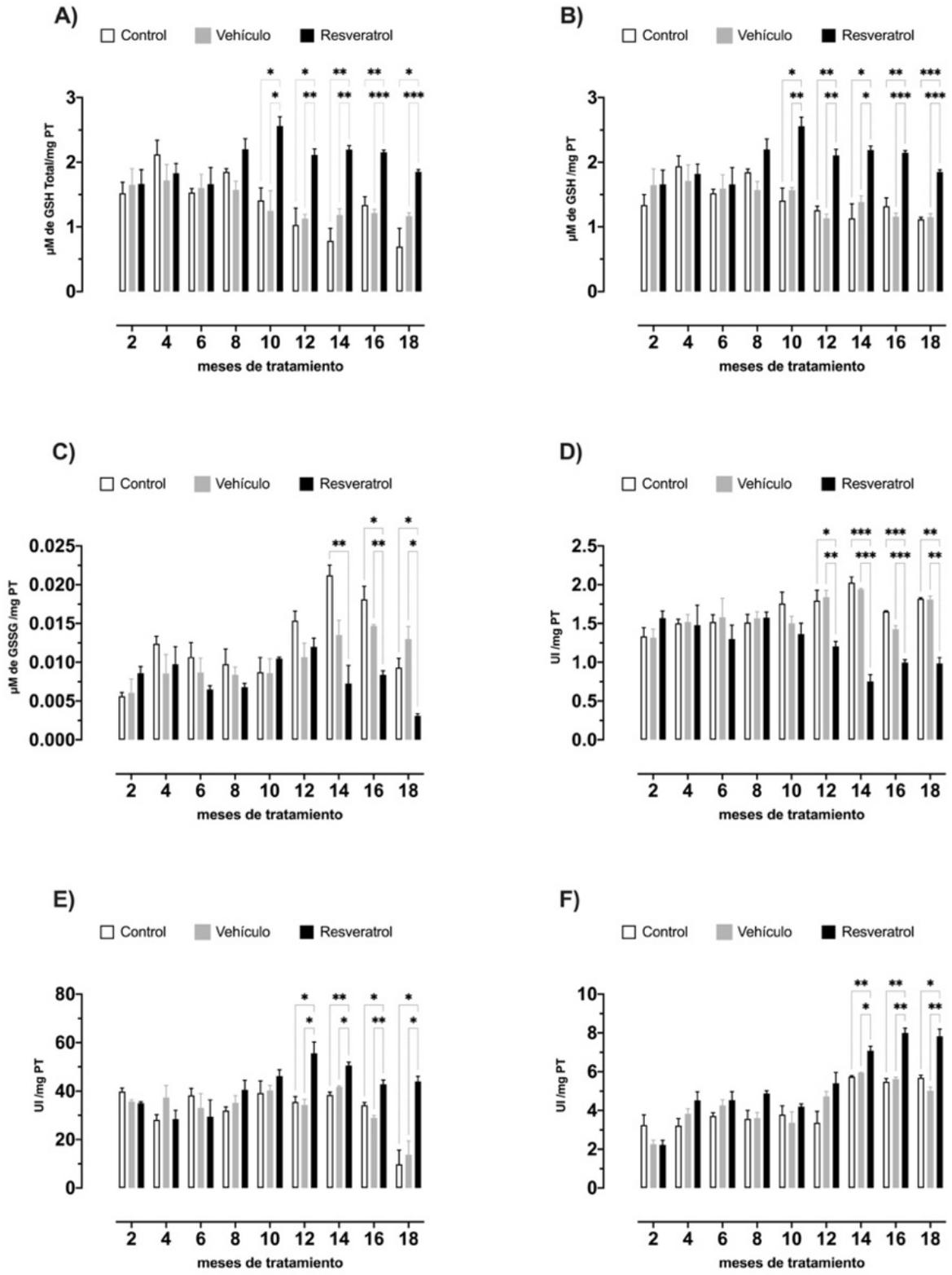


Figura 21. Efecto del resveratrol sobre el sistema de glutación durante el proceso de envejecimiento. A) Glutación total; B) GSH; C) GSSG; D) Glutación Peroxidasa; E) Glutación S-Transferasa; F) Glutación Reductasa. Los datos expresan la media \pm EEM para $n=8$ ratas. (ANOVA de una vía post-hoc Tukey); * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

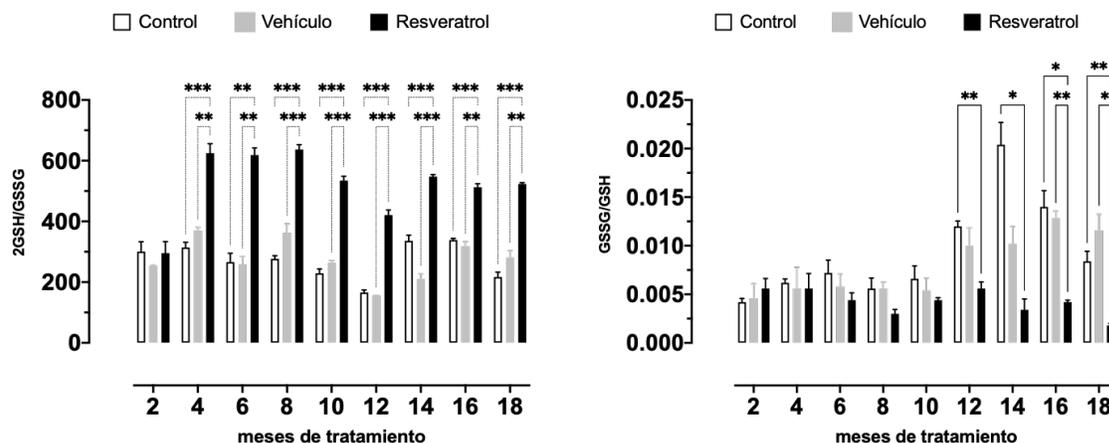


Figura 22. Efecto del resveratrol sobre la capacidad de protección celular y la capacidad de nodo del sistema de Glutación durante el proceso de envejecimiento. A) 2GSH/GSSG; B) GSSG/GSH. Los datos expresan la media \pm EEM para $n=8$ ratas. (ANOVA de una vía post-hoc Tukey); * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Al determinar la capacidad de protección celular (2GSH/GSSG); Figura 22A, se observó que los grupos administrados con resveratrol tenían índices mayores que los grupos control y vehículo, indicando que se favoreció un estado antioxidante con dicho tratamiento. En contraste, al analizar la capacidad de nodo de este sistema, (GSSG/GSH) Figura 22B, observamos que los grupos administrados con resveratrol mostraron índices significativamente inferiores respecto a su grupo control correspondiente. Al ser el glutatión el antioxidante más importante en el cerebro, debe mantenerse como un sistema eficiente durante todo el ciclo de vida, en este proyecto el tratamiento crónico con resveratrol mostró gran capacidad protectora ya que desde los 10 meses de tratamiento previno la acumulación del GSSG y la disminución de la actividad enzimática de GR y GPx.

Un tratamiento crónico con resveratrol atenúa la desorganización neuronal del cerebelo durante el envejecimiento.

Para poder evaluar las diferencias en la población neuronal del cerebelo de los diferentes grupos experimentales, se realizó la tinción de Nissl. Los resultados se muestran en las figuras 23 y 24. Se observó un cambio gradual en la organización neuronal debido a los diferentes periodos de administración evaluados. Los cambios en la población neuronal se refieren especialmente a la organización celular,

principalmente a la densidad neuronal en los campos observados. En los grupos sin tratamiento y en los administrados con vehículo se observó una modificación progresiva de la confluencia celular; Figura 23. Además, se observó una mayor dispersión en las células e incluso una disminución en el número de células de Purkinje con el paso del tiempo; estos cambios fueron más evidentes cuando se compararon el grupo de 2 meses con el último período de tratamiento. En contraste con lo anterior, los grupos administrados con resveratrol demostraron que se conservó mejor la integridad de la estructura, conservando las proyecciones axonales alineadas y ordenadas, así como un mayor número de células de Purkinje en comparación con los otros grupos; Figura 23. El recuadro inferior derecho de cada micrografía presentada en la figura 24, muestra los cambios a nivel nuclear producidos con la edad, donde se aprecia que en edades avanzadas se incrementaron los procesos de cariólisis, evento observado por una deformidad celular y disolución de los cuerpos de Nissl, que a su vez se reflejó en el incremento de la coloración en la región.

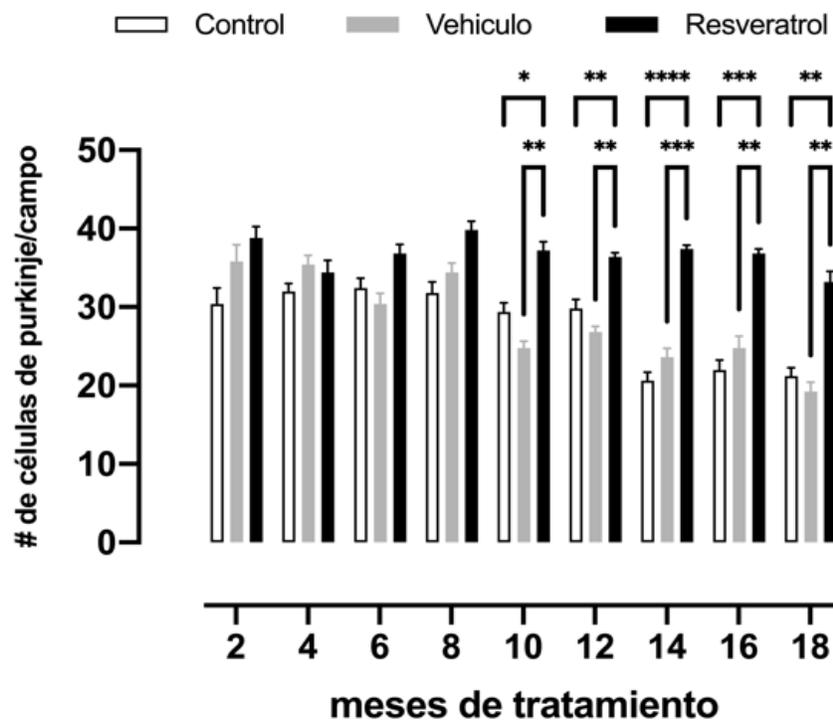


Figura 23. Efecto del tratamiento crónico con resveratrol sobre el número de células de Purkinje durante el envejecimiento. Los datos expresan la media \pm EEM para $n=8$ ratas. (Prueba de U de Mann-Whitney post-hoc Bonferroni-Dunn); * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

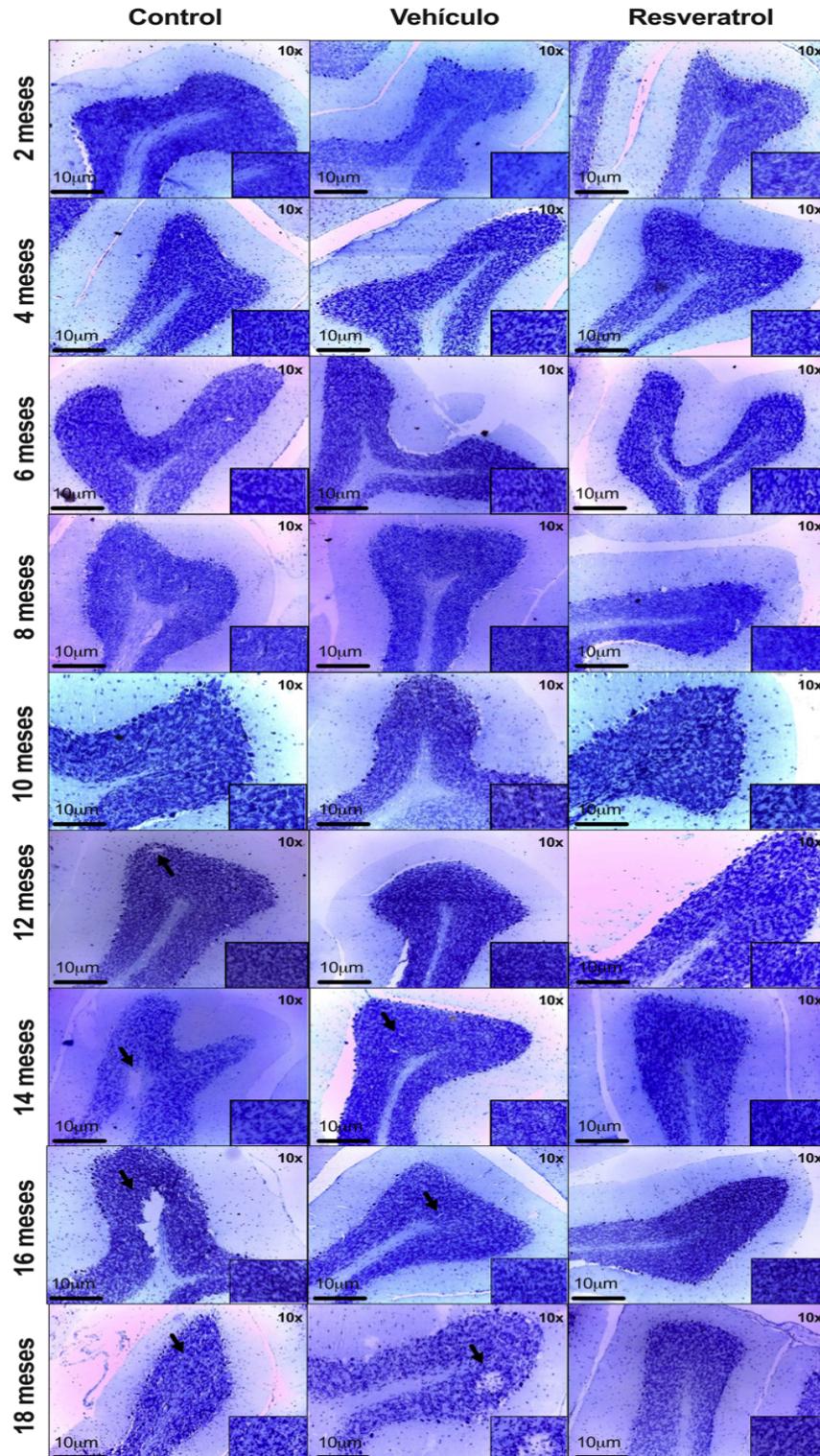


Figura 24. Efecto del tratamiento crónico con resveratrol sobre la organización neuronal del cerebelo. Las flechas indican las áreas donde existe mayor desorganización neuronal en el cerebelo. Tomadas con un objetivo de 20X.

El tratamiento con resveratrol disminuye la astrogliosis reactiva en cerebelo

Se ha descrito ampliamente que la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se considera un componente importante del citoesqueleto de los astrocitos del cerebelo y que incrementa su reactividad con el envejecimiento.

Al evaluar por inmunofluorescencia a GFAP se observó un incremento significativo en la inmunorreactividad de los grupos control y vehículo de manera dependiente de la edad. Cabe destacar que en los animales de edades tempranas (desde 2 y hasta 8 meses de tratamiento) no hubo cambios estadísticamente significativos en la expresión de este marcador, figura 26. Sin embargo, a partir de los 10 y hasta los 18 meses de administración, se presentó un incremento gradual en la inmunorreactividad a GFAP, donde el grupo control de 18 meses aumentó en un 110% el número de células positivas a este marcador en comparación con el grupo control de 2 meses, figura 27. Caso contrario, el tratamiento prolongado de resveratrol inhibió en un 90% la inmunorreactividad de GFAP comparándolo con el grupo control correspondiente al periodo evaluado, figura 25.

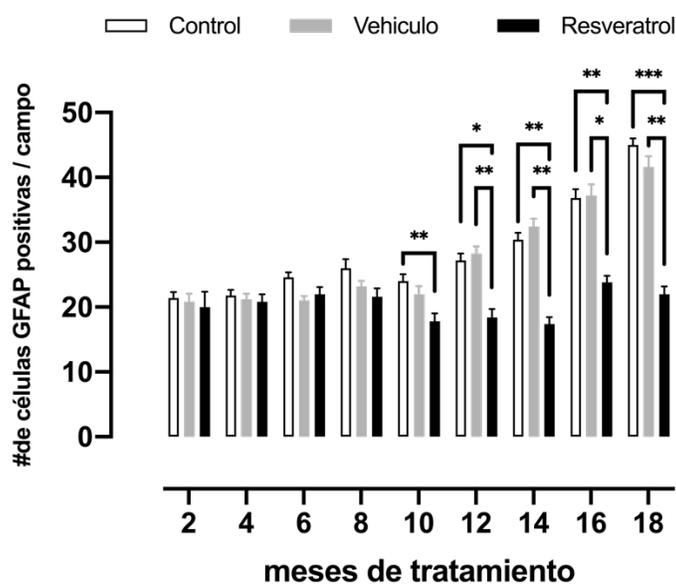


Figura 25. El resveratrol atenúa la reactividad de la glía en el cerebelo de rata durante el envejecimiento. Los datos expresan la media \pm EEM para $n=8$ ratas. (Prueba de U de Mann-Whitney post-hoc Bonferroni-Dunn); * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

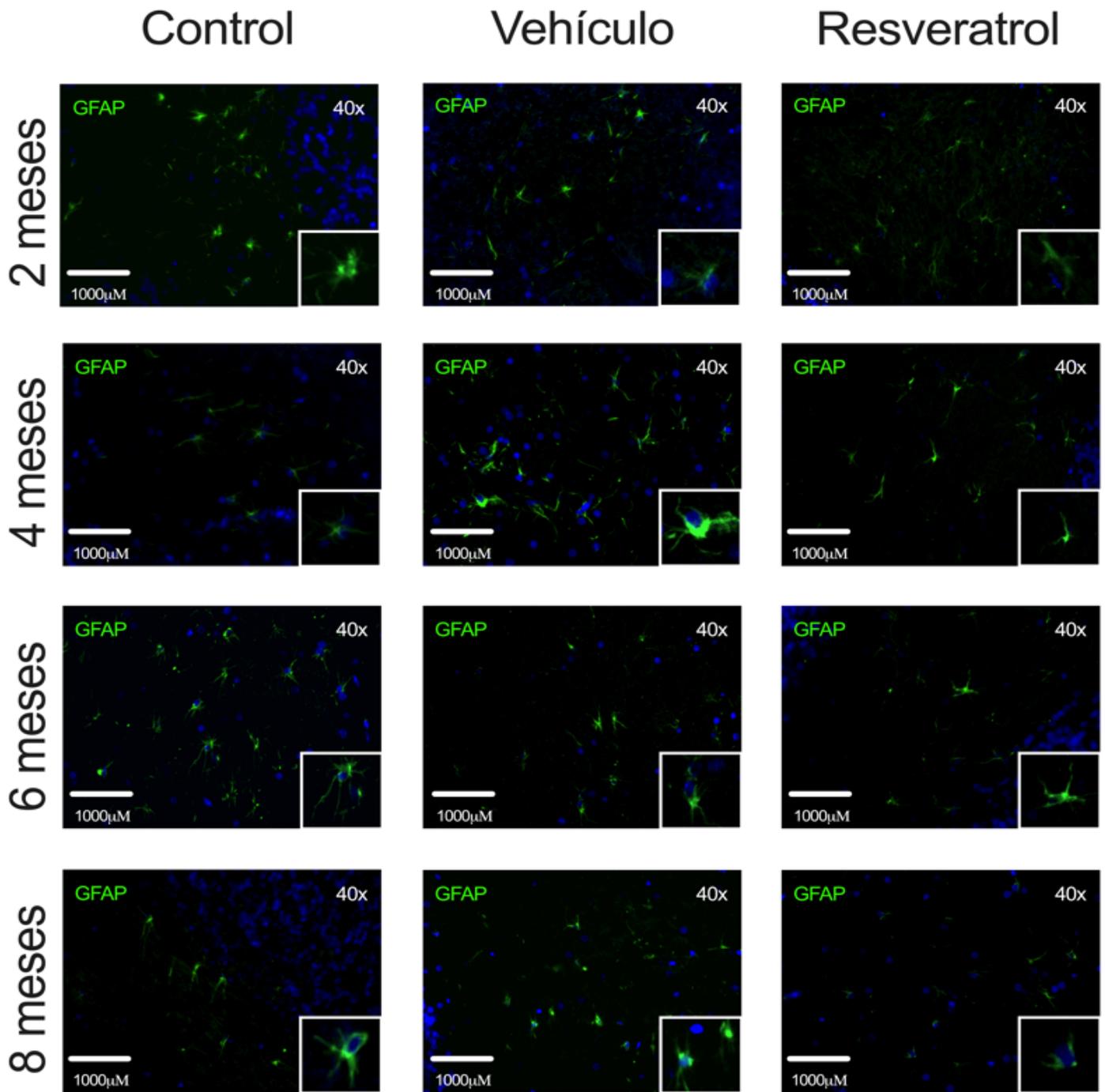


Figura 26. El resveratrol atenúa la reactividad de la glía en el cerebelo de rata durante el envejecimiento. Se muestran fotomicrografías representativas de 2-8 meses de tratamiento, las marcas verdes representan inmunorreactividad a GFAP y las marcas de color azul a DAPI. Tomadas con un objetivo de 40X.

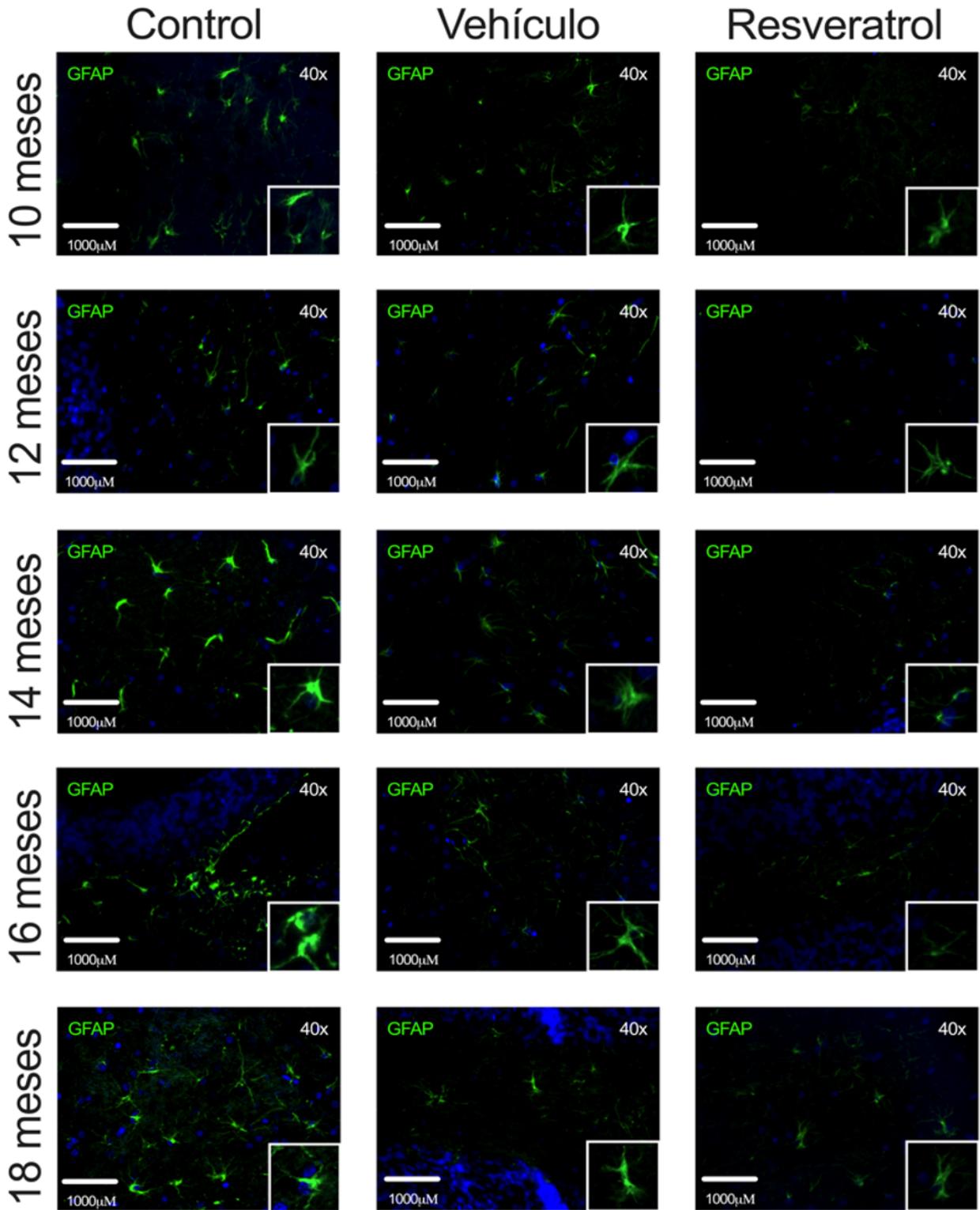


Figura 27. El resveratrol atenúa la reactividad de la glía en el cerebelo de rata durante el envejecimiento. Se muestran fotomicrografías representativas de 10-18 meses de tratamiento, las marcas verdes representan inmunorreactividad a GFAP y las marcas de color azul a DAPI. Tomadas con un objetivo de 40X.

Discusión de resultados

El proceso de envejecimiento es irreversible. Existe una gran heterogeneidad en la forma de envejecer que está determinada por factores biológicos, socioculturales y económicos [Cantón, 2018], que conlleva un aumento de la fragilidad de las condiciones de salud, requiriendo un sistema de apoyo y de salud eficientes debido a la prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas (ECD); entre estas, destacan las enfermedades neurodegenerativas [Coronel, 2017; Cantón, 2018].

Actualmente, se han desarrollado varias estrategias para combatir los efectos del envejecimiento entre las que se incluyen la restricción calórica y la suplementación con diversos productos naturales que han demostrado ser benéficos en el deterioro motor y cognitivo que se presenta durante el envejecimiento. Entre los compuestos más importantes se encuentran diversos fitoquímicos, como la vitamina C, tocoferoles como la vitamina E, carotenoides y compuestos polifenólicos como el resveratrol, que en diferentes dosis farmacológicas constituyen una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades crónicas y del envejecimiento [Si & Liu, 2014].

Los polifenoles son micronutrientes abundantes en nuestra dieta; frutas, verduras y bebidas como el té y el vino tinto son fuentes ricas en este tipo de compuestos. Se originan principalmente en las plantas que los sintetizan en cantidades variables como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales; otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.). Además, poseen una elevada capacidad antioxidante [López, Ortega, & Lozada, 2015].

Los polifenoles se pueden clasificar en diferentes grupos de acuerdo con su estructura base y al número de anillos aromáticos y elementos unidos a ellos. Entre los principales grupos polifenólicos se encuentran los ácidos polifenólicos, flavonoides, ligandos y estilbenos [Cosme, et al., 2020].

Estudios farmacocinéticos del resveratrol han demostrado que su biodisponibilidad es relativamente baja, aproximadamente 38%, por lo que se propone que esta puede variar dependiendo del vehículo y dosis administrada. Adicionalmente, algunos reportes indican que la biodisponibilidad es mayor cuando el resveratrol se administra por la mañana, cuando el ciclo circadiano, la actividad enzimática y la circulación enterohepática son más eficientes [Sergides et al., 2016].

Navarro, et al 2018, analizaron el efecto de la administración vía oral de diferentes dosis de resveratrol en ratas macho de la cepa Wistar durante 2 meses y encontraron que 10mg/kg/día es una dosis eficiente para atenuar el daño causado por el estrés oxidativo; por esta razón, fue la dosis utilizada en este proyecto. Por otro lado, a través de los años se han utilizado diversos vehículos para la administración de este polifenol, tales como, polietilenglicol, dimetilsulfoxido, agua y etanol; sin embargo, por los efectos secundarios que presentan estas sustancias se ha demostrado que el etanol es el que presenta menos efectos adversos en la dosis utilizada (7.5%). Además, el etanol como vehículo permite la absorción de los polifenoles incrementando su biodisponibilidad [Rodrigo, Miranda, & Vergara, 2011].

Cesar et al., 2019 evaluaron dosis crecientes de etanol como vehículo en combinación con 10mg/kg/día de resveratrol y encontraron que una solución de etanol 7.5% ejerce la función de vehículo sin evidenciar efectos adversos producidos por el etanol, logrando obtener al mismo tiempo una biodisponibilidad adecuada que fue demostrada por una disminución de marcadores de estrés oxidativo en ratas Wistar administradas durante 2 meses.

Se ha demostrado que la vida útil de las ratas es de 2 a 3.5 años, con un incremento en el peso corporal durante los primeros 12 meses y un mantenimiento de este hasta los 18 meses de vida para después comenzar a descender; extrapolándolo a humanos, este descenso ocurre a partir de los 60 años [Ghasemi, et al., 2021]. En este estudio, los animales no mostraron modificaciones estadísticamente significativas con el tratamiento de etanol a 7.5% o con resveratrol a una dosis de 10mg/kg/día en todos los periodos de tiempo analizados.

El peso de las ratas varía por diversos factores, en particular por la manipulación, el tipo, cantidad y la calidad de la comida, el número de animales en una jaula, la temperatura, la humedad, el régimen de luz y para garantizar oportunidades para el movimiento activo de los animales [Castelhana, et al., 2009].

Nistiar, et al., 2012 encontraron que el peso corporal de las ratas incrementa hasta los 18 meses de vida y luego comienza a disminuir gradualmente [Nistiar, et al., 2012]. En este trabajo, todos los animales fueron alimentados durante la duración del estudio con la dieta 5001 de Labdiet, la cual corresponde a una dieta estándar y no modifica el desarrollo y procesos metabólicos en los animales. Esto concuerda con los resultados hallados en este trabajo ya que, aunque existen variaciones en el peso entre animales, estas no son significativas entre grupos experimentales, destacando que el vehículo utilizado, así como el tratamiento antioxidante, no alteraron este parámetro zoométrico.

Durante el envejecimiento se generan alteraciones en componentes mitocondriales de células del músculo esquelético como, mutaciones en el ADN, disminución de la actividad de algunas enzimas involucradas en la respiración celular, modificando la dinámica mitocondrial, como las tasas de fusión y fisión, y la apoptosis inducida mitocondrialmente, que puede conducir a la pérdida neta de fibras musculares y a la sarcopenia asociada a la edad [Peterson, et al., 2012]. La prueba de campo abierto realizado en este estudio demostró que la locomoción incrementa en los animales que fueron tratados con resveratrol, mientras que los

grupos control mantienen la actividad locomotora hasta los 17 meses de edad respecto a grupos de animales jóvenes. Esto podría explicarse por el efecto protector del resveratrol, mantenimiento la masa muscular y la actividad física de los animales. Rodríguez, et al., en 2016 mostraron que el tratamiento con resveratrol en una dosis de 16mg/kg durante 2, 12 y 18 meses de tratamiento mejora la resistencia muscular, así como la activación física de los roedores.

Es bien conocido que la edad es un factor que propicia la aparición de trastornos neurológicos, como la demencia. Para este estudio se realizó la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NOR), que nos permite analizar el aprendizaje, la memoria de trabajo de tipo asociativo y la memoria a largo plazo [Ennaceur & Delacour, 1988]. Esta prueba resulta ser muy útil ya que presenta ventajas por encima de otros ensayos que comprometen la integridad de los animales de experimentación, además de que no involucra refuerzos positivos o negativos. Está basada en la conducta espontánea al acceder a una novedad y generar una aparente “preferencia no condicionada”. Se midió el tiempo de reconocimiento de objetos familiares y novedosos. Los datos de estos análisis corresponden al índice de reconocimiento, de modo que se concentra de forma precisa la evaluación de la prueba NOR con este indicador. Se considera que el índice de reconocimiento con valor >0.5 corresponde a un proceso de consolidación del aprendizaje; por el contrario, un índice <0.5 indica falta de interés por reconocer los objetos novedosos [Ramirez y Ayala, 2014]. Los resultados de este estudio mostraron que para la prueba de NOR hubo un mantenimiento de las funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria, sugiriendo que la exploración por parte de los animales a edades avanzadas no es necesariamente indicativa de ansiedad. Investigaciones recientes han enfatizado el papel del sistema vestibular en procesos cognitivos como el aprendizaje, memoria, navegación espacial, autoconciencia corporal y el equilibrio. Existen diversas vías que participan en dichas funciones cognitivas, siendo una de ellas la vía del cerebelo y el núcleo lateral ventral del tálamo que transmite información para procesar los mecanismos de aprendizaje durante el reconocimiento espacial [Wolff & Vann, 2019].

Se sabe que el cerebelo recibe proyecciones directas del nervio vestibular que terminan en el nódulo y la úvula como fibras musgosas, donde la información recibida se devuelve a otras regiones del cerebro como el hipocampo [Apps, et al., 2018]. Desde la década de los 90's se ha descrito que existe conexión directa del cerebelo al hipocampo ya que la vía de estimulación del vermis rostral, el núcleo fastigial y la folia de la línea media intermedia del cerebelo inhiben la actividad del hipocampo y, por extensión, se da la disminución de la función cognitiva, incluyendo la memoria declarativa [Zhang, et al., 2016].

Tomando en consideración lo anterior, todos los grupos analizados durante el proceso de envejecimiento presentan un aprendizaje eficiente; sin embargo, tanto en el grupo control como vehículo disminuye gradual y significativamente el puntaje del índice de reconocimiento de forma dependiente de la edad. En relación con esto, se observa que el grupo administrado con vehículo tiene un índice similar al que mostraron los grupos control, lo que permite descartar que el etanol ejerza algún efecto adicional sobre los animales evaluados.

Las pruebas realizadas para la memoria de corto plazo mostraron consolidación en todos los grupos de 2 hasta 18 meses de tratamiento. Para el caso del análisis realizado para la memoria de largo plazo se observó el mismo comportamiento de consolidación en todos los grupos de tratamiento, posiblemente debido al efecto protector y antioxidante del resveratrol.

Nuestros resultados apoyan y amplían los de [Navarro Cruz, et al., 2018] que describieron que la administración oral de resveratrol durante 8 meses permite un desarrollo en el rendimiento cognitivo, particularmente en la memoria a largo plazo. El volumen reducido de diferentes regiones cerebrales por el envejecimiento se correlaciona con déficits cognitivos en los procesos de aprendizaje y memoria [Flores, et al., 2016].

La plasticidad de células de Purkinje, células en cesta y células estrelladas de la corteza cerebelosa disminuye con el envejecimiento y con ello se produce un declive en la consolidación de memoria de corto y largo plazo, así como cambios en la conducta motora fina, incluida la capacidad de equilibrio [Kenyon, 1997].

El equilibrio y la postura son fundamentales durante los movimientos estacionarios y dinámicos para prevenir caídas, particularmente en adultos mayores. De hecho, las caídas son la principal causa de lesiones entre las personas mayores de 65 años [Phelan et al., 2015]. El cerebelo mantiene el equilibrio motor y la calibración de los movimientos. Es una región esencial del cerebro que desempeña un papel central en el mantenimiento de la marcha, postura y el equilibrio, así como en la coordinación de movimientos dirigidos a objetivos y movimientos complejos [Ataullah & Naqvi, et al., 2021].

En el cerebelo los potenciales de acción que entran por medio de las fibras paralelas excitan a una célula de Purkinje tras otra; después, cada célula de Purkinje retransmite un mensaje inhibitorio hacia las neuronas de los núcleos del cerebelo y desde estos hacia núcleos en el tallo cerebral, dependiendo de la porción: vestíbulo, espinal o cerebral [Najak & Raman, 2015]. Por esta razón es importante para tareas que requieren calcular el tiempo, de tal forma que, dependiendo de cuáles y cuántas fibras paralelas estén activas, pueden estimular sólo a las primeras células de Purkinje o a una larga serie de estas [Ivry & Diener, 1991]; así, cuantas más células de Purkinje sean excitadas, tanto mayor será la respuesta colectiva y entonces se generan más ráfagas de potenciales de acción. Si se activan pocas neuronas el mensaje es breve; si se activan muchas el mensaje durará más. Los mensajes de las células de Purkinje controlan el inicio y término de los movimientos [Thier, et al., 2000].

Se ha descrito que esta región del cerebro también se activa ante estímulos sensoriales y que participa en establecer nuevos programas motores que permiten al individuo ejecutar una secuencia de acciones; participa en el proceso de recordar

información aprendida previa y principalmente se ha asociado al lóbulo anterior [Kansal, et al., 2017]. Por lo tanto, daños en el cerebelo también pueden afectar el aprendizaje motor.

En este sentido se realizó la prueba de barra de equilibrio, la cual fue aplicada en los diferentes grupos, los resultados muestran que los roedores tienen dificultades para completar la tarea de cruzar las vigas utilizadas, ya que a edades de 19 y 21 meses ocurren resbalones de las patas de los roedores, evento característico de una disminución en el equilibrio causado con el paso de la edad. Durante el envejecimiento hay una disminución gradual de la actividad locomotora y el comportamiento exploratorio, mientras que las alteraciones de la coordinación y el equilibrio se hacen evidentes por primera vez a una edad más avanzada [Altun, 2007]. Se ha demostrado que el incremento en marcadores bioquímicos asociados con el envejecimiento se correlaciona con la disminución de la velocidad, exactitud y precisión del comportamiento en ratas [Church et al., 2014]. Esto sugiere que los cambios graduales en el comportamiento dependiente del tiempo pueden servir como un marcador sustituto de los cambios bioquímicos que tienen lugar en el organismo de cualquier ser vivo. Por otro lado, se ha demostrado que diversas terapias preventivas disminuyen esta pérdida de la función motora fina, entre las principales se encuentra, la activación física, suplementación con antioxidantes, restricción calórica acompañada de una adecuada matriz alimentaria y el resveratrol que ha mostrado resultados bastante prometedores en modelos murinos ya que en combinación con el ejercicio mantienen las funciones motoras finas, incluyendo el equilibrio [Silveira, et al., 2019]. En este sentido, de acuerdo con lo anterior cabe destacar que en este proyecto el resveratrol mostró ser capaz de mantener la función de equilibrio durante el progreso del envejecimiento hasta los 17 meses de vida de los sujetos de experimentación.

Los cambios cerebrales no ocurren en la misma medida en todas las regiones del cerebro. Se ha respaldado por diversos estudios que el volumen de la corteza prefrontal es la región más afectada durante el envejecimiento, seguido del cuerpo estriado. El hipocampo, el lóbulo temporal, el vermis y los hemisferios cerebelosos también reducen su volumen. Por otro lado, la corteza occipital es la menos afectada durante la vejez [Peters, 2006]. A finales de la década de los 80s, se introdujo un grupo de biomarcadores para la medición del estrés oxidativo que, de manera directa o indirecta, denotan la concentración de las ROS y NOS. Estos biomarcadores señalan el posible daño a macromoléculas como lípidos y proteínas, marcadores de funciones motoras y cognitivas, así como la relación con alguna patología específica [Mañón, Garrido, & Sellés, 2016]. Dichos marcadores son utilizados con el objetivo de evaluar nuevas estrategias preventivas, diagnósticas y terapéuticas que impiden la aparición de diversas enfermedades oxidativas [Grotto, et al., 2009].

El cerebelo es la estructura cerebral que produce los niveles más altos de $\cdot\text{NO}$ dentro del SNC [Forstermann, et al., 1990; Blanco, et al., 2010]. El $\cdot\text{NO}$ es un segundo mensajero que tiene un papel dual: el efecto benéfico lo presenta a concentraciones bajas (nM) y el efecto citotóxico se presenta a concentraciones altas (μM), promoviendo la neurodegeneración [Moncada, 2017].

Se ha demostrado que los niveles bajos (pM/nM) son fisiológicos y están relacionados con la activación de objetivos de unión primarios de alta afinidad, como la guanilil ciclasa soluble (sGC) y la citocromo c oxidasa [Rogers, et al., 2014]. Un paradigma emergente propone que los niveles intermedios (50–300 nM) pueden activar una variedad de respuestas positivas y negativas, desde la cicatrización de heridas hasta las vías oncogénicas [Tejero, et al., 2019]. Concentraciones más altas de $\cdot\text{NO}$ ($>1 \mu\text{M}$) pueden conducir no solo al estrés oxidativo sino también al estrés nitrativo y nitrosativo a través de la generación de peroxinitrito y especies nitrosantes y, en combinación con el oxígeno, pueden desencadenar una modificación postraduccional de proteínas, lípidos y ADN [Hausladen, et al., 1998].

Según la hipótesis de McCann sobre el papel del $\cdot\text{NO}$ durante la senescencia cerebral, la hiperactividad de la vía glutamatérgica podría impulsar la función de ciertas enzimas dependientes del calcio, como las enzimas de óxido nítrico sintasa (NOS) [McCann, 1997]. Debido a su alta reactividad, el $\cdot\text{NO}$ puede reaccionar con el anión superóxido (O_2^-) para generar el radical libre peroxinitrito (ONOO^-), que a su vez puede reaccionar con el anillo fenólico de residuos de tirosina de proteínas para formar 3 -NT-tirosina (nitrotirosina, n-Tyr) [Collin, 2019].

El aumento en la concentración de $\cdot\text{NO}$ y de otras RNS se conoce como estrés nitrosante. Este tipo de estrés promueve la nitración de proteínas, lo que altera su estructura e inhibe su función normal, incrementando la formación de n-Tyr que se ha correlacionado con una amplia variedad de enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica), así como con aterosclerosis, con hipoxia e isquemia e incluso con el envejecimiento [Nakamura & Lipton, 2020]. El análisis de moléculas oxidantes como el $\cdot\text{NO}$ en este estudio mostro un incremento a partir de los 8 meses de tratamiento en los grupos control y vehículo, al mismo tiempo que para los grupos tratados con resveratrol disminuyeron los niveles de $\cdot\text{NO}$ de manera significativa. Estos resultados son comparables con lo reportado por Blanco, et al., 2010 donde muestran que el sistema $\cdot\text{NO}/\text{NOS}$ presenta una serie de cambios en cerebelo durante el envejecimiento, además mostraron una mayor actividad de NADPH-d y aumento de la nitración de proteínas; estos cambios afectan al sistema $\cdot\text{NO}/\text{NOS}$ y al destino del $\cdot\text{NO}$ producido durante el envejecimiento en el cerebelo, como variaciones en la producción de anión superóxido o disminuciones en los mecanismos de protección antioxidante endógeno.

Se ha demostrado que el incremento de radicales libres y la producción excesiva de $\cdot\text{NO}$ inducen el proceso de lipoperoxidación, figura 28. Este es un proceso complejo que implica la formación de diferentes productos con varias funciones biológicas como la regulación de la expresión génica y la señalización celular en concentraciones bajas, pero muestran un efecto citotóxico cuando estos

se acumulan en grandes cantidades [Forman, et al., 2008]. El MDA y 4-HDA se generan después de la oxidación de las membranas biológicas; estos compuestos son llamados lipoperóxidos y se usan como marcadores de estrés oxidativo en plasma y tejidos [Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014]. Acorde con nuestros resultados, Mohamed, et al., 2020 analizan los productos de lipoperoxidación en ratas de 12 y 24 meses de edad y encuentran un incremento significativo de este marcador en el grupo de 24 meses, resultados que concuerdan con lo obtenido en este trabajo, figura 28. El aumento de ROS y RNS en el cerebelo puede ser responsable del daño celular, incluso en las neuronas de Purkinje, resultando en un deterioro de la actividad motora, comportamiento ansiogénico y una falla de la memoria de reconocimiento a corto y largo plazo [Lamarão, et al., 2019].

El sistema antioxidante de glutatión está conformado por elementos enzimáticos y no enzimáticos. El glutatión (GSH) es un tripéptido antioxidante no enzimático que juega un papel crucial en la defensa antioxidante y la desintoxicación de xenobióticos y sus metabolitos, además es la fuente antioxidante más abundante en el SNC y juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis redox [Tan, et al., 2018]. Sin embargo, su comportamiento ha tenido gran controversia durante el envejecimiento en las diferentes regiones cerebrales. Emir, et al., 2011 realizaron la cuantificación de GSH en cerebro de personas adultas jóvenes y adultos mayores. Los resultados muestran una concentración menor en los adultos mayores en respuesta al estrés oxidativo generado durante el envejecimiento. Esto coincide con nuestros resultados mostrados en la figura 4, destacando que la administración crónica de resveratrol previene la disminución de GSH en edades avanzadas y disminuye los niveles GSSG.

En relación con lo anterior, es importante señalar que GSH se oxida a GSSG por acción de la GPx y el GSSG se invierte a GSH cuando la GR cataliza la reacción. La GST es otra enzima de desintoxicación antioxidante que participa en la desintoxicación de productos oxidados mediante la conjugación de GSH con centros electrofílicos en muchos sustratos tóxicos para formar productos no tóxicos.

Abdel-Aleem, et al., 2016 encontraron que un tratamiento con resveratrol redujo los niveles de GSSG y la expresión de iNOS y aumentó los niveles de GSH y la actividad de SOD en cerebro de ratones lesionados por isquemia/reperfusión lo que resultó en una mayor supervivencia de este modelo través de la vía de supervivencia Nrf2/PI3K/Akt. En adición, Kumar, et al., 2011 demostró que, en ratas, la administración de etanol en una concentración elevada (80 mM) causa la muerte neuronal en el cerebelo, pero el resveratrol protege contra la apoptosis a través de neuronas cerebelosas captadoras de ROS, lo que lleva a un aumento en la supervivencia celular, evidenciado por la vía Nrf2 [Kumar, et al., 2011]. Por su parte Farkhondeh, et al 2020 demuestran que el resveratrol incrementa la expresión y actividad de SOD, glutatión peroxidasa (GPx) y CAT; además, disminuyó los niveles cerebrales de malondialdehído (MDA) en ratones mediante la activación de la vía Nrf2, lo que conduce a una mejora en la transcripción del sistema antioxidante endógeno, lo que indica su potencial para disminuir el daño oxidativo celular, de manera similar como observamos en los resultados obtenidos de este proyecto, figura 29.

Particularmente para este trabajo se eligieron las neuronas de Purkinje para analizar el daño causado durante el envejecimiento ya que se conocen como los principales elementos del circuito cerebeloso; estas células son de fundamental importancia en la calibración sensoriomotora debido a que su actividad está implicada en las tareas motoras con el fin de generar la mejor respuesta motora [Prestori, et al., 2019]. Además, las neuronas de Purkinje pueden predecir las actividades sensoriomotoras, transferir la plasticidad de la corteza cerebelosa a los núcleos profundos y contribuir directamente al comando motor [Kudin, et al., 2008]. En este análisis encontramos una disminución de la densidad de neuronas de Purkinje en animales de los grupos control y vehículo respecto a la edad, hecho que puede haber contribuido a los daños conductuales y cognitivos observados previamente.

Los astrocitos adquieren diferentes fenotipos en respuesta a numerosos estímulos patológicos, como accidentes cerebrovasculares, trastornos neurodegenerativos, tumores, traumatismos, infecciones, isquemia y envejecimiento. Se ha demostrado que la reactividad de los astrocitos es un sello distintivo del envejecimiento fisiológico en roedores, primates humanos y no humanos [Rodríguez et al., 2014; Robillard et al., 2016]. En el giro dentado del hipocampo y CA1, los astrocitos han presentado una hipertrofia dependiente de la edad, así como una marcada reorganización de la proteína del citoesqueleto, GFAP, que condujo a un aumento del grado de reactividad, hipertrofia del cuerpo celular y aumento en el número de procesos celulares implicados en procesos de muerte celular [Matias, et al., 2019].

Orré, et al., en 2014 demostraron que los astrocitos aislados de la corteza cerebral de ratones envejecidos presentan un mayor fenotipo inflamatorio, y una mayor expresión de GFAP en comparación con los animales jóvenes. Aunque se han informado aumentos generalizados en la expresión de GFAP con el envejecimiento en todo el SNC de roedores [Matias, et al., 2019], estos aumentos se observan normalmente en ratones mayores de 24 semanas y no se limitan solo al cerebelo. En la capa molecular de la corteza cerebelosa, se cree que los astrocitos especializados llamados células gliales de Bergmann aíslan, mantienen y regulan la estructura y función neuronal de las células de Purkinje (PC) en el cerebelo adulto.

Los astrocitos pueden desencadenar una respuesta conocida como reactividad de los astrocitos, caracterizada por cambios en el perfil de la expresión génica de estas células, lo que lleva a cambios tanto morfológicos como funcionales que pueden variar desde la hipertrofia o atrofia celular hasta la proliferación y formación de cicatrices. La extensión de la reacción astrocítica se ve gravemente afectada por el tamaño del área afectada, la naturaleza del daño y su gravedad, la intensidad de la interrupción de la BHE y la respuesta inflamatoria [Penky, et al., 2016].

Lo anterior es consistente con nuestra observación de la degeneración en la estructura cerebelar de los animales analizados en este proyecto, principalmente los de edades avanzadas, tal y como se observó en los resultados obtenidos de la tinción de Nissl. Aunado a esto, los animales que mostraron una mayor inmunorreactividad de GFAP que se correlaciona de manera negativa en las pruebas conductuales realizadas. Por su parte, los marcadores de estrés oxidativo incrementaron con la edad y el sistema antioxidante endógeno disminuyó su efectividad de forma gradual y dependiente de la edad. En este sentido, los resultados del proyecto confirman el efecto antioxidante y antienvjecimiento del resveratrol con un tratamiento prolongado, además de proporcionar nuevos conocimientos sobre su efecto en funciones motoras y cognitivas, así como en la organización celular del cerebelo.

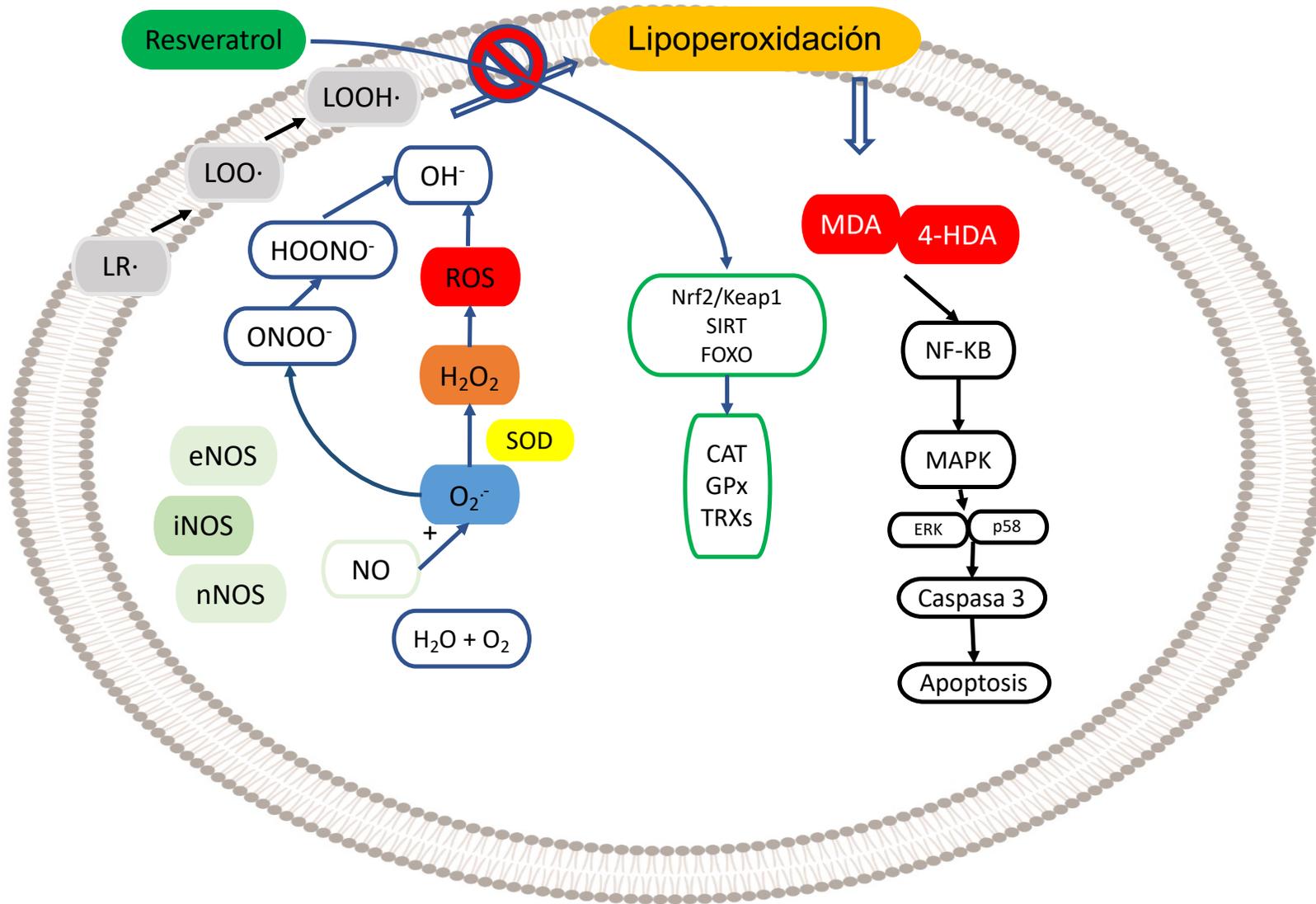


Figura 28. Efecto del resveratrol a nivel cerebelar sobre la generación de radicales libres y el proceso de lipoperoxidación.

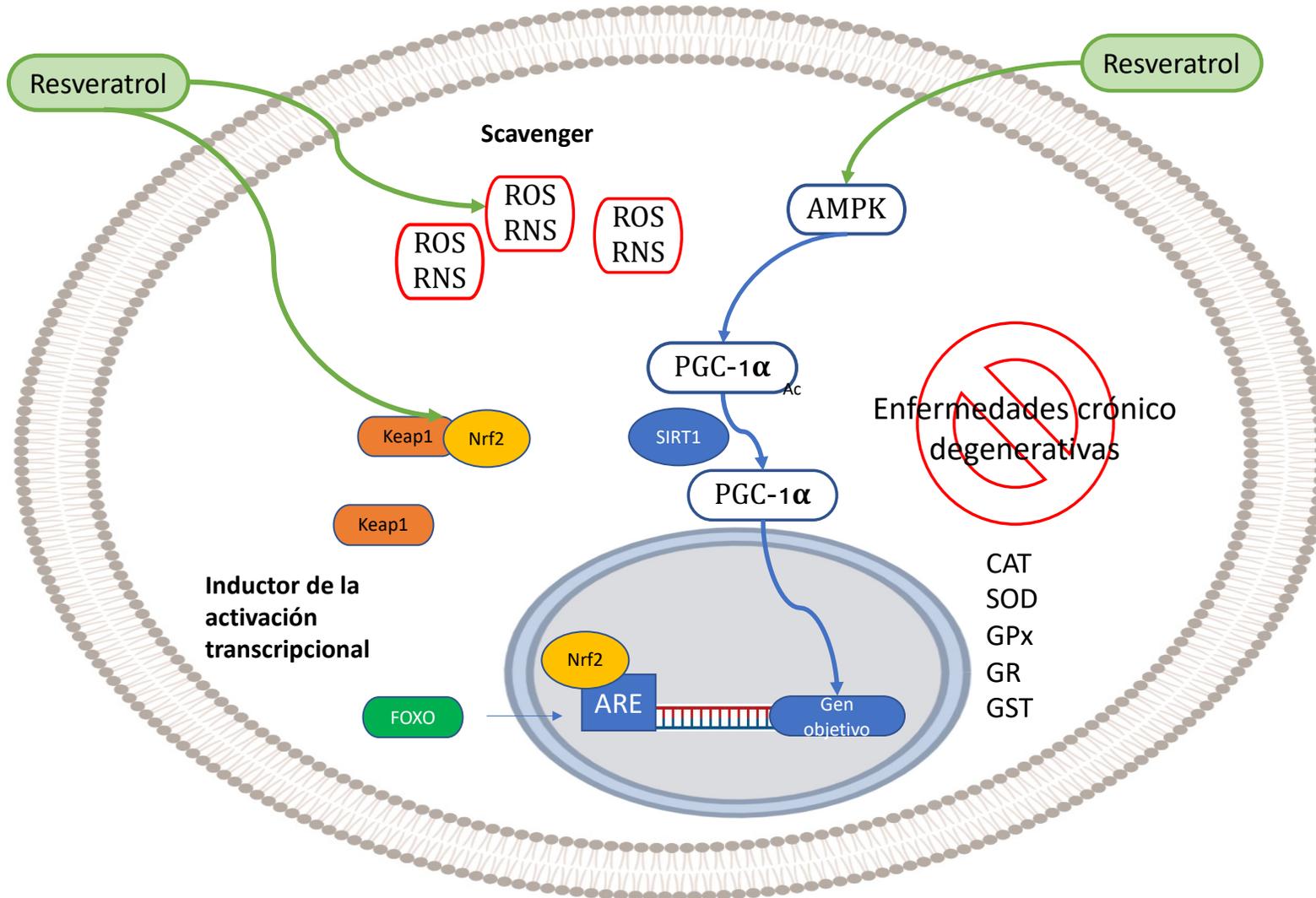


Figura 29. Mecanismos implicados en la actividad neuroprotectora del resveratrol a nivel cerebelar.

Conclusiones

La administración crónica de resveratrol en una dosis de 10mg/kg:

- Protege las funciones motoras (conducta horizontal y de equilibrio) y cognitivas (memoria a corto y largo plazo) frente al estrés oxidativo que se genera durante el envejecimiento cerebral.
- Reduce la producción de nitritos como de los productos de lipoperoxidación (MDA y 4-HDA), cuando se administra desde 2 y hasta por 18 meses, lo que sugiere una neuroprotección del cerebro.
- Mantiene la actividad y eficiencia del sistema antioxidante endógeno de primera línea durante el desarrollo del envejecimiento, incluyendo a GSH, GSSG y las enzimas de CAT, SOD, GPx, GR, GST, aún a edades avanzadas.
- Atenúa la desorganización neuronal del cerebelo y disminuye la inmunorreactividad de GFAP.

Esto contribuye a consolidar al resveratrol como una opción farmacoterapéutica de prevención y/o regeneración importante para retardar el deterioro cerebelar durante el envejecimiento y de esta forma incrementar la calidad de vida, al reducir el estrés oxidativo y el daño neuronal en el cerebelo de ratas Wistar durante el progreso del envejecimiento.

Perspectivas

- Analizar por la técnica de PCR en tiempo real los cambios en el nivel de mRNA y del transcrito de las SIRT, FOXO, Nrf2 luego de la administración de resveratrol en animales seniles.
-
- Analizar los cambios de mTOR y Akt relacionados con la edad y después del tratamiento crónico con resveratrol.
- Medir por microscopia de fluorescencia y Western blot los niveles de proteína de los genes CASP3, implicado en procesos de muerte celular.
- Analizar los niveles de citocinas proinflamatorias en roedores seniles y su relación con el estrés oxidativo y si posible modulación con antioxidantes.
- Evaluar la expresión de la vía JAK/STAT mediante inmunohistoquímica después de la administración con Resveratrol en roedores envejecidos.

Referencias

1. Abdel-Aleem, G., Khaleel, E., Mostafa, D., & Elberier, L. (2016). Neuroprotective effect of resveratrol against brain ischemia reperfusion injury in rats entails reduction of DJ-1 protein expression and activation of PI3K/Akt/GSK3b survival pathway. *Archives of physiology and biochemistry*; 122(4): 200-213.
2. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*; 105: 121-126.
3. Agadjanyan, Z. S., Dmitriev, L. F., & Dugin, S. F. (2005). A new role of phosphoglucose isomerase. Involvement of the glycolytic enzyme in aldehyde metabolism. *Biochemistry (moscow)*, 70(11), 1251-1255.
4. Aguilar-Alonso, P., Vera-López, O., Brambila-Colombres, E., Segura-Badilla, O., Avalos-López, R., Lazcano-Hernández, M., & Navarro-Cruz, A. R. (2018). Evaluation of Oxidative Stress in Cardiomyocytes during the Aging Process in Rats Treated with Resveratrol. *Oxidative medicine and cellular longevity*; 2018(1): 1-9.
5. Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences*; 75(6): 639-653.
6. Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical journal*; 357(3): 593-615.
7. Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & Federici, L. (2018). Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7(1), 1-15.
8. Altun, M., Bergman, E., Edström, E., Johnson, H., & Ulfhake, B. (2007). Behavioral impairments of the aging rat. *Physiology & behavior*; 92(5): 911-923.
9. Andersen, B., Gundersen, H., & Pakkenberg, B. (2003). Aging of the human cerebellum: A stereological study. *The Journal of Comparative Neurology*; 466(3): 356-365.
10. Aoyama, K. (2021). Glutathione in the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*; 22(9): 5010-2021.
11. Apps, R., Hawkes, R., Aoki, S., Bengtsson, F., Brown, A. M., Chen, G., & Ruigrok, T. J. (2018). Cerebellar modules and their role as operational cerebellar processing units. *The Cerebellum*; 17(5): 654-682.
12. Araujo, A. P. B., Carpi-Santos, R., & Gomes, F. C. A. (2019). The Role of Astrocytes in the Development of the Cerebellum. *The Cerebellum*; 18(6): 1017-1035.
13. Arteaga, O., Revuelta, M., Urigüen, L., Alvarez, A., Montalvo, H., & Hilario, E. (2015). Pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury and cognitive deficits induced by perinatal hypoxia-ischemia in rats. *PloS one*; 10(11): 1-25.
14. Arús, B. A., Souza, D. G., Bellaver, B., Souza, D. O., Goncalves, C. A., Quincozes-Santos, A., & Bobermin, L. D. (2017). Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. *Molecular and cellular biochemistry*; 428(1): 67-77.
15. Ataullah, A. H. M., & Naqvi, I. A. (2021). Cerebellar dysfunction. *StatPearls*: Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32965988/t>.

16. Atchley, C. (1989). A continuity theory of normal aging. *The gerontologist*; 29(2): 183-190.
17. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*; 2014(1): 1-15.
18. Bakhtyukov, A. A., Galkina, O. V., & Eshchenko, N. D. (2016). The activities of key antioxidant enzymes in the early postnatal development of rats. *Neurochemical Journal*; 10(3): 199-204.
19. Baltazar-Gaytan, E., Aguilar-Alonso, P., Brambila, E., Tendilla-Beltran, H., Vázquez-Roque, R. A., Morales-Medina, J. C., & de la Cruz, F. (2019). Increased cell number with reduced nitric oxide level and augmented superoxide dismutase activity in the anterior-pituitary region of young suicide completers. *Journal of chemical neuroanatomy*; 96(1): 7-15.
20. Barja, G., & Herrero, A. (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *The FASEB Journal*; 14(2): 312-318.
21. Bastianetto, S., Ménard, C., & Quirion, R. (2015). Neuroprotective action of resveratrol. *(BBA)-Molecular Basis of Disease*; 1852(6): 1195-1201.
22. Bernard, J., & Seidler, R. (2014). Moving forward: age effects on the cerebellum underlie cognitive and motor declines. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*; 42(1): 193-207.
23. Blanco, S., Molina, F., Castro, L., Del Moral, M., Hernandez, R., Jimenez, A., & Peinado, M. (2010). Study of the nitric oxide system in the rat cerebellum during aging. *BMC neuroscience*; 11(1): 1-14.
24. Brooks, S. P., & Dunnett, S. B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews Neuroscience*; 10(7): 519-529
25. Buckner, R. L. (2013). The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. *Neuron*; 80(3): 807-815.
26. Buffo, A., & Rossi, F. (2013). Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Progress in neurobiology*, 109, 42-63.
27. Burbank, P. M. (1986). Psychosocial theories of aging: a critical evaluation. *Advances in nursing science*.
28. Cantón, S. B. F. (2018). El proceso de envejecimiento en México, el contexto socio sanitario y sus implicaciones respecto a los incidentes adversos. *Boletín CONAMED*; 16(1): 17-23.
29. Castelhana-Carlos, M. J., & Baumans, V. (2009). The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. *Laboratory animals*; 43(4): 311-327.
30. Chehue, A., Olvera Hernandez, E. G., Cern, T. F., & Ivarez, A. (2013). The Exogenous Antioxidants. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/the-exogenous-antioxidants>.
31. Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 61(2): 192-208.

32. Chung, S., Ghelfi, M., Atkinson, J., Parker, R., Qian, J., Carlin, C., & Manor, D. (2016). Vitamin E and phosphoinositides regulate the intracellular localization of the hepatic α -tocopherol transfer protein. *Journal of Biological Chemistry*; 291(33): 17028-17039.
33. Church, R. M., Miller, M. C., Freestone, D., Chiu, C., Osgood, D. P., Machan, J. T., & Silverberg, G. D. (2014). Amyloid-beta accumulation, neurogenesis, behavior, and the age of rats. *Behavioral Neuroscience*; 128(4): 523.
34. Clarke, L. E., Liddelow, S. A., Chakraborty, C., Münch, A. E., Heiman, M., & Barres, B. A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 115(8):E1896-E1905.
35. Collin, F. (2019). Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*; 20(10): 2407.
36. Cornelius, E. A. (1972). Increased incidence of lymphomas in thymectomized mice-evidence for an immunological theory of aging. *Experientia*, 28(4), 459-459.
37. Coronel, I. R. K. (2017). El envejecimiento en México, una visión demográfica. *Pluralidad y Consenso*; 7(33): 2-23.
38. Cosme, P., Rodríguez, A. B., Espino, J., & Garrido, M. (2020). Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants*; 9(12), 1263.
39. Da Costa, J. P., Vitorino, R., Silva, G. M., Vogel, C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). A synopsis on aging-Theories, mechanisms, and future prospects. *Ageing research reviews*; 29: 90-112.
40. Dasari, S., Ganjaji, M. S., & Meriga, B. (2018). Glutathione S-transferase is a good biomarker in acrylamide induced neurotoxicity and genotoxicity. *Interdisciplinary Toxicology*; 11(2): 115-121.
41. Delgado-Garcia, J. M. (2001). Estructura y función del cerebelo. *Rev Neurol*; 33(7): 635-642.
42. Della-Penna, D., & Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol*; 57(1): 711-738.
43. Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*; 3(4): 461-491.
44. Diaz-Gerevini, G. T., Repossi, G., Dain, A., Tarres, M. C., Das, U. N., & Eynard, A. R. (2016). Beneficial action of resveratrol: how and why?. *Nutrition*; 32(2): 174-178.
45. Dickinson, D. A., & Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*; 64(5-6), 1019-1026.
46. Dinerman, J. L., Dawson, T. M., Schell, M. J., Snowman, A., & Snyder, S. H. (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 91(10): 4214-4218.
47. Dong Ch. 2013. Aging. *Korean J. Audiol*; 17(2013): 39-44.
48. Emir, U., Raatz, S., McPherson, S., Hodges, J., Torkelson, C., Tawfik, P., & Terpstra, M. (2011). Noninvasive quantification of ascorbate and glutathione concentration in the elderly human brain. *NMR in Biomedicine*; 24(7): 888-894

49. Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research*; 31(1): 47-59.
50. Erdelmeier, I., Gérard, D., Yadan, J. C., Chaudière, J. (1998). Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *ChemRes Toxicol*; 11(10): 1184-94.
51. Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biology and medicine*; 11(1): 81-128.
52. Farhy-Tselnicker, I., & Allen, N. J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural development*; 13(1): 1-12
53. Farkhondeh, T., Folgado, S. L., Pourbagher-Shahri, A. M., Ashrafizadeh, M., & Samarghandian, S. (2020). The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 127: 110234.
54. Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 114-120). Academic Press.
55. Flores, G., Vázquez-Roque, R. A., & Diaz, A. (2016). Resveratrol effects on neural connectivity during aging. *Neural regeneration research*; 11(7): 1067-1068.
56. Forman, H., Fukuto, J., Miller, T., Zhang, H., Rinna, A., & Levy, S. (2008). The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Archives of biochemistry and biophysics*; 477(2): 183-195.
57. Förstermann, U., Gorsky, L. D., Pollock, J. S., Schmidt, H. H., Heller, M., & Murad, F. (1990). Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme (s) in rat brain. *Biochemical and biophysical research communications*; 168(2): 727-732.
58. Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*; 15(6): 1583-1606.
59. Galkina, O. V., Bakhtyukov, A. A., Akhmetshin, M. O., Prokopenko, V. M., & Eshchenko, N. D. (2017). The glutathione system in the subcellular fractions of developing rat brain and liver. *Neurochemical Journal*; 11(4): 266-271.
60. Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., & Borrás, C. (2015). Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*; 2015(1): 1-13.
61. García-Triana, B., García-Morales, O., Clapes-Hernández, S., Rodes-Fernández, L., & García-Piñeiro, J. C. (1995). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*; 14(1): 1-4.
62. García, R., Hernández, E., Concha, A., Pérez, C. A., García, L., Hernández, M., & Manzo, J. (2009). The cerebellum and its functions. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*; 9(1): 24-30.
63. Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*; 482(3): 419-425.

64. Ghasemi, A., Jeddi, S., & Kashfi, K. (2021). The laboratory rat: Age and body weight matter. *EXCLI journal*; 20: 1431.
65. Ghorbani, Z., Farahani, R. M., Aliaghaei, A., Khodaghali, F., Houssein Meftahi, G., Danyali, S., & Sadeghi, Y. (2018). Resveratrol protects purkinje neurons and restores muscle activity in rat model of cerebellar Ataxia. *Journal of Molecular Neuroscience*; 65(1): 35-42.
66. Goldberger, A. L., Peng, C. K., & Lipsitz, L. A. (2002). What is physiologic complexity and how does it change with aging and disease? *Neurobiology of aging*; 23(1): 23-26.
67. Gómez-Quiroz, L., & Cuevas-Bahena, D. (2008). Superóxido dismutasas. in Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas (Konigsberg, M. ed.). *El Manual Moderno*. 2008(1): 169-182.
68. González, K. D. (2015). Envejecimiento demográfico en México: análisis comparativo entre las entidades federativas. La situación demográfica de México. CDMX: *Consejo Nacional de Población*; 2015(1): 113-129.
69. Grange, P. A., Chéreau, C., Raingeaud, J., Nicco, C., Weill, B., Dupin, N., & Batteux, F. (2009). Production of superoxide anions by keratinocytes initiates P. acnes-induced inflammation of the skin. *PLoS Pathog*; 5(7):1-14.
70. Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y. R., & Bhatnagar, A. (2016). Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*, 119(5), e39-e75
71. Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., & Farina, M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*; 32(1): 169-174.
72. Gupta, S., Patchva, S. & Aggarwal, B. (2013). Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The AAPS journal*; 15(1): 195-218.
73. Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*; 41(12): 1819-1828.
74. Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
75. Hajdu, J., Wyss, S. R., & Aebi, H. (1977). Properties of Human Erythrocyte Catalases after Crosslinking with Bifunctional Reagents Symmetry of the Quaternary Structure. *European journal of biochemistry*; 80(1): 199-207.
76. Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*; 219(1): 1-10.
77. Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of the American Geriatrics Society*; 20(4): 298-301
78. Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria?. *Journal of the American Geriatrics Society*; 20(4): 145-147.
79. Hausladen, A., Gow, A. J., & Stamler, J. S. (1998). Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 95(24): 14100-14105.

80. Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., & Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive physiology*, 6(2): 603.
81. Hewlings, S., & Kalman, D. (2017). Curcumin: a review of its' effects on human health. *Foods*; 6(10): 92-103.
82. Hitier, M., Besnard, S., & Smith, P. F. (2014). Vestibular pathways involved in cognition. *Frontiers in integrative neuroscience*; 8(1): 59-66.
83. Hoogendam, Y., van der Geest, J., van der Lijn, F., van der Lugt, A., Niessen, W., Krestin, G., & Ikram, M. (2012). Determinants of cerebellar and cerebral volume in the general elderly population. *Neurobiology of aging*; 33(12): 2774-2781.
84. Ivry*, R. B., & Diener, H. C. (1991). Impaired velocity perception in patients with lesions of the cerebellum. *Journal of Cognitive Neuroscience*; 3(4): 355-366.
85. Izuo, N., Nojiri, H., Uchiyama, S., Noda, Y., Kawakami, S., Kojima, S., & Shimizu, T. (2015). Brain-specific superoxide dismutase 2 deficiency causes perinatal death with spongiform encephalopathy in mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*; 15(6): 1583-1606.
86. Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*; 72(1): 76-90.
87. Jin, K. (2010). Modern biological theories of aging. *Aging and disease*; 1(2): 72-74.
88. Johnson, A., Shokhirev, N., & Shoshitaishvili, B. (2019). Revamping the evolutionary theories of aging. *Ageing Research Reviews*; 55(2019): 1-19.
89. Johnson, J. A., El Barbary, A. I. D. A., Kornguth, S. E., Brugge, J. F., & Siegel, F. L. (1993). Glutathione S-transferase isoenzymes in rat brain neurons and glia. *Journal of Neuroscience*: 13(5): 2013-2023.
90. Kane, A. E., & Sinclair, D. A. (2019). Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 54(1), 61-83.
91. Kansal, K., Yang, Z., Fishman, A. M., Sair, H. I., Ying, S. H., Jedynek, B. M., & Onyike, C. U. (2017). Structural cerebellar correlates of cognitive and motor dysfunctions in cerebellar degeneration. *Brain*; 140(3): 707-720.
92. Kazak, L., Reyes, A., & Holt, I. J. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(10), 659-671.
93. Kenealey, J. D., Subramanian, L., Van Ginkel, P. R., Darjatmoko, S., Lindstrom, M. J., Somoza, V., & Polans, A. S. (2011). Resveratrol metabolites do not elicit early pro-apoptotic mechanisms in neuroblastoma cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9), 4979-4986.
94. Kennard, J., Brown, K., & Woodruff-Pak, D. (2013). Aging in the cerebellum and hippocampus and associated behaviors over the adult life span of CB6F1 mice. *Neuroscience*; 247(1): 335-350.
95. Kenyon, W. E. (1997). Petrophysical principles of applications of NMR logging. *The log analyst*; 38(2): 1-12.

96. Kim, D. H., Bang, E., Jung, H. J., Noh, S. G., Yu, B. P., Choi, Y. J., & Chung, H. Y. (2020). Anti-aging effects of calorie restriction (CR) and CR mimetics based on the senoinflammation concept. *Nutrients*, 12(2), 422-428.
97. Kudin, AP, Malinska, D. y Kunz, WS (2008). Sitios de generación de especies reactivas de oxígeno en homogeneizados de tejido cerebral determinados con el uso de sustratos e inhibidores respiratorios. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Bioenergética*; 1777 (7-8): 689-695.
98. Kumar, H., Lim, H., More, S., Kim, B., Koppula, S., Kim, I., & Choi, D. (2012). The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *International journal of molecular sciences*. 13(8): 10478-10504.
99. Lahir, Y. K. (2015). Lipid oxidation in biological systems: Biochemical, Biological and Biophysical aspects. *Global J Biosci Biotechnol*; 4(3): 224-233.
100. Lamarão-Vieira, K., Pamplona-Santos, D., Nascimento, P., Corrêa, M., Bittencourt, L., Dos Santos, S., & Lima, R. (2019). Physical exercise attenuates oxidative stress and morphofunctional cerebellar damages induced by the ethanol binge drinking paradigm from adolescence to adulthood in rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*; 2019(1): 1-15.
101. Legakis JE, Koepke JI, Jedeszko C, Barlaskar F, Terlecky LJ, Edwards HJ, Walton PA and Terlecky SR (2002) Peroxisome senescence in human fibroblasts. *Mol Biol Cell* 13, 4243-4255.
102. Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity*; 46(6): 957-967.
103. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*. 13(1): 757-772.
104. Lin, M. T., & Beal, M. F. (2003). The oxidative damage theory of aging. *Clinical Neuroscience Research*; 2(5-6): 305-315.
105. Lin, Y., Kunnumakkara, A., Nair, A., Merritt, W., Han, L., Armaiz-Pena, G., & Aggarwal, B. (2007). Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor- κ B pathway. *Clinical Cancer Research*; 13(11): 3423-3430.
106. Lisberger, S. G. (2020). The rules of cerebellar learning: around the Ito hypothesis. *Neuroscience*; 2020(1): 1-16.
107. López, L., Ortega, A., & Lozada, J. (2015). Modificaciones enzimáticas de compuestos fenólicos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*; 9(1): 5-14.
108. Lowsky, D. J., Olshansky, S. J., Bhattacharya, J., & Goldman, D. P. (2014). Heterogeneity in healthy aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 69(6), 640-649.
109. Lueptow, L. M. (2017). Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *JoVE*; 2016(126): 1-9.
110. Mañon-Rossi, W., Garrido, G., & Nuñez-Selles, A. (2016). Biomarkers of oxidative stress in antioxidant therapy. *J Pharm Pharmacogn Res*; 4(2): 62-83.
111. Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*; 47(3): 469-474.

112. Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; 424(1-2): 83-95.
113. Matias, I., Morgado, J., & Gomes, F. C. A. (2019). Astrocyte heterogeneity: impact to brain aging and disease. *Frontiers in aging neuroscience*; 59: 1-10.
114. Matsuda, S., Nakagawa, Y., Tsuji, A., Kitagishi, Y., Nakanishi, A., & Murai, T. (2018). Implications of PI3K/AKT/PTEN signaling on superoxide dismutases expression and in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Diseases*; 6(2): 1-28.
115. McCann, S. M. (1997). The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Experimental gerontology*. 32(4-5): 431-440.
116. McCay, C., Crowell, M., & Maynard, L. (1935). The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size. *The Journal of Nutrition*; 10(1): 63-79.
117. McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 65-77.
118. Meng, Z., Li, J., Zhao, H., Liu, H., Zhang, G., Wang, L., & Wang, X. (2015). Resveratrol relieves ischemia-induced oxidative stress in the hippocampus by activating SIRT1. *Experimental and therapeutic medicine*; 10(2): 525-530.
119. Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*; 93(3): 421-443.
120. Miller, V. M., Lawrence, D. A., Mondal, T. K., & Seegal, R. F. (2009). Reduced glutathione is highly expressed in white matter and neurons in the unperturbed mouse brain—implications for oxidative stress associated with neurodegeneration. *Brain research*: 1276(1): 22-30.
121. Miranda, C., Ela, M., Hernández Lantigua, I., & Llópez Janer, N. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*; 15(2): 1-10.
122. Misrani, A., Tabassum, S., & Yang, L. (2021). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*; 2021(1): 13, 57.
123. Mitchell, Delville C, Konstantopedos P. 2015. The effects of graded levels of calorie restriction: II. Impact of short-term calorie and protein restriction on circulating hormone levels, glucose homeostasis and oxidative stress in male C57BL/6 mice. *Oncotarget*; 6(27): 23213-23237.
124. Mohamed, E. A., & Sayed, W. M. (2020). Implication of JAK1/STAT3/SOCS3 pathway in aging of cerebellum of male rat: histological and molecular study. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
125. Monserrat Hernández-Hernández, E., Serrano-García, C., Antonio Vázquez-Roque, R., Díaz, A., Monroy, E., Rodríguez-Moreno, A., & Flores, G. (2016). Chronic administration of resveratrol prevents morphological changes in prefrontal cortex and hippocampus of aged rats. *Synapse*, 70(5), 206-217.
126. Montano, M. (2014). Translational models, methods and concepts in studies of muscle tissue repair. *Translational biology in medicine*. Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Cambridge, 103-128.

127. Monteverde, M., & Novak, B. (2008). Obesidad y Esperanza de vida en México. *Población y Salud en Mesoamérica*; 6(1): 1-13.
128. Morris, M. C. (2009). The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence. *European Journal of Neurology*; 16(1): 1-7.
129. Morton, S. & Bastian, A. (2004). Cerebellar control of balance and locomotion. *The neuroscientist*; 10(3): 247-259.
130. Nair, V., O'Neil, CL y Wang, PG (2001). Malondialdehído. *Enciclopedia de Reactivos para Síntesis Orgánica*. 1-3.
131. Najac, M., & Raman, I. M. (2015). Integration of Purkinje cell inhibition by cerebellar nucleo-olivary neurons. *Journal of Neuroscience*; 35(2): 544-549.
132. Nakamura, T., & Lipton, S. A. (2020). Nitric oxide-dependent protein post-translational modifications impair mitochondrial function and metabolism to contribute to neurodegenerative diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*; 32(12): 817-833.
133. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*; 2019(1): 1-19.
134. Navarro-Cruz, A. R., Ramírez y Ayala, R., Ochoa-Velasco, C., Brambila-Colombres, E., Avila-Sosa, R., Pérez-Fernández, S., & Aguilar-Alonso, P. (2017). Effect of chronic administration of resveratrol on cognitive performance during aging process in rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*; 2017(1): 1-8.
135. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications*; 338(1): 668-676.
136. Nistiar, F., Racz, O., Lukacinova, A., Hubkova, B., Novakova, J., Lovasova, E., & Sedlakova, E. (2012). Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment. *Journal of Environmental Science and Health*; 47(9): 1224-1233.
137. NOM (1999). 062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México, DF: *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*.
138. OMS. (2018). Envejecimiento y salud. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/envejecimiento-y-salud>.
139. Palmer, A. L., & Ousman, S. S. (2018). Astrocytes and aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*; 337-342.
140. Pannu, N., & Bhatnagar, A. (2019). Resveratrol: From enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 109(1): 2237-2251.
141. Pedersen, W. A., Cashman, N. R., & Mattson, M. P. (1999). The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells. *Experimental neurology*; 155(1): 1-10.
142. Pekny, M., & Pekna, M. (2016). Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*; 1862(3): 483-491.

143. Perrone, D., Fuggetta, M. P., Ardito, F., Cottarelli, A., De Filippis, A., Ravagnan, G., & Lo Muzio, L. (2017). Resveratrol (3, 5, 4'-trihydroxystilbene) and its properties in oral diseases. *Experimental and therapeutic medicine*, 14(1), 3-9.
144. Peters, J., & van der Smagt, P. (2002). Searching a scalable approach to cerebellar based control. *Applied intelligence*, 17(1), 11-33.
145. Peters, R. (2006). Ageing and the brain. *Postgraduate medical journal*; 82(964): 84-88.
146. Peterson, C., Johannsen, D., & Ravussin, E. (2012). Skeletal muscle mitochondria and aging: a review. *Journal of aging research*; 1(2012): 1-10.
147. Phelan, E. A., Mahoney, J. E., Voit, J. C., & Stevens, J. A. (2015). Assessment and management of fall risk in primary care settings. *Medical Clinics*; 99(2): 281-293.
148. Picón-Pagès, P., Garcia-Buendia, J., & Muñoz, F. J. (2019). Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*; 1865(8): 1949-1967.
149. Planas, J. M., Alfaras, I., Colom, H., & Juan, M. E. (2012). The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527(2), 67-73.
150. Potokar, M., Morita, M., Wiche, G., & Jorgačevski, J. (2020). The diversity of intermediate filaments in astrocytes. *Cells*, 9(7), 1604.
151. Prestori, F., Mapelli, L., & D'Angelo, E. (2019). Diverse neuron properties and complex network dynamics in the cerebellar cortical inhibitory circuit. *Frontiers in molecular neuroscience*; 12(1): 267-273.
152. Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2007). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature protocols*; 1(6): 3159-3165.
153. Rajput, VD, Singh, RK, Verma, KK, Sharma, L., Quiroz-Figueroa, FR, Meena, M., & Mandzhieva, S. (2021). Desarrollos recientes en el mecanismo de defensa antioxidante enzimático en plantas con especial referencia al estrés abiótico. *Biología*; 10 (4): 267-273.
154. Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, 113(3), 189-207.
155. Rege, S., Geetha, T., Griffin, G., Broderick, T., & Babu, J. (2014). Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Frontiers in aging neuroscience*; 6(1): 1-12.
156. Repetto, M., Semprine, J., & Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. *Lipid peroxidation*; 1: 3-30.
157. Robillard, K. N., Lee, K. M., Chiu, K. B., & MacLean, A. G. (2016). Glial cell morphological and density changes through the lifespan of rhesus macaques. *Brain, behavior, and immunity*; 55: 60-69.
158. Rogers, N. M., Seeger, F., Garcin, E. D., Roberts, D. D., & Isenberg, J. S. (2014). Regulation of soluble guanylate cyclase by extracellular matrix thrombospondins: implications for blood flow. *Frontiers in physiology*; 5(1): 134-145.

159. Rossi, W. M., Garrido, G., & Sellés, A. J. N. (2016). Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 4(2): 62-83.
160. Sahebkar, A., Serban, M. C., Ursoniu, S., & Banach, M. (2015). Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of functional foods*; 18(1): 898-909.
161. Salehi, B., Mishra, A., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., & Sharifi, J. (2018). Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. *Biomedicines*; 6(3): 1-20.
162. Saraswat K. & Rizvi S. 2017. Novel strategies for anti-aging drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*;12(9): 955-966.
163. Sarubbo, F., Ramis, M., Aparicio, S., Ruiz, L., Esteban, S., Miralles, A., & Moranta, D. (2015). Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats. *Age*; 37(3): 1-11.
164. Schaur, R. J. (2003). Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular aspects of medicine*; 24(4-5): 149-159.
165. Schmähmann, J. D. (1997). The cerebellum and cognition. Academic Press
166. Sedmak, J. J., Grossberg, E. (1977). A Rapid, Sensitive, and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry*; 79(1-2): 544-552.
167. Seo, A. Y., Joseph, A. M., Dutta, D., Hwang, J. C., Aris, J. P., & Leeuwenburgh, C. (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Journal of cell science*; 123(15): 2533-2542.
168. Sergides, C., Chirilă, M., Silvestro, L., Pitta, D., & Pittas, A. (2016). Bioavailability and safety study of resveratrol 500 mg tablets in healthy male and female volunteers. *Experimental and therapeutic medicine*; 11(1): 164-170.
169. Shoeb, M., H Ansari, N., K Srivastava, S., & V Ramana, K. (2014). 4-Hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases. *Current medicinal chemistry*; 21(2): 230-237.
170. Si, H., & Liu, D. (2014). Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(6), 581-591.
171. Singh, P., Demmitt, A., Nath, D., & Brunet, A. (2019). The genetics of aging: a vertebrate perspective. *Cell*; 177(1): 200-220.
172. Singh, R. (2020). Cerebellum: Its Anatomy, Functions and Diseases. In *Neurodegenerative Diseases-Molecular Mechanisms and Current Therapeutic Approaches*. *IntechOpen*; 2020: 21-15.
173. Siu, G. M., & Draper, H. H. (1982). Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids*, 17(5), 349-357.
174. Smith, I. K., Vierheller, T. L., & Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical biochemistry*; 175(2): 408-413.
175. Smoliga, J. M., & Blanchard, O. (2014). Enhancing the delivery of resveratrol in humans: if low bioavailability is the problem, what is the solution?. *Molecules*, 19(11), 17154-17172.

176. Sohal, R. S. (1986). The Rate of Living Theory: A Contemporary Interpretation. *Insect Aging*, 23-44.
177. Son, D., Park, W., & Lee, Y. 2019. Recent Advances in Anti-Aging Medicine. *Korean journal of family medicine*; 40(5): 289-296.
178. Sun, N., Youle, R. J., & Finkel, T. (2016). The mitochondrial basis of aging. *Molecular cell*, 61(5), 654-666.
179. Svingen, B. A., Buege, J. A., O'Neal, F. O., & Aust, S. D. (1979). The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*; 254(13): 5892-5899.
180. Tan, B., Norhaizan, M., Liew, W., & Sulaiman Rahman, H. (2018). Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in pharmacology*; 9(1): 1162-1170.
181. Tejero, J., Shiva, S., & Gladwin, M. T. (2019). Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiological reviews*; 99(1): 311-379.
182. Thier, P., Dicke, P. W., Haas, R., & Barash, S. (2000). Encoding of movement time by populations of cerebellar Purkinje cells. *Nature*; 405(6782): 72-76.
183. Thompson, A. M., Martin, K. A., & Rzedzic, E. M. (2014). Resveratrol induces vascular smooth muscle cell differentiation through stimulation of SirT1 and AMPK. *PloS one*, 9(1), e85495.
184. Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*; 27(3): 502-522.
185. Titorenko VI and Terlecky SR (2011) Peroxisome metabolism and cellular aging. *Traffic* 12, 252-259.
186. Tsikas, D. (2006). 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. *Journal of Chromatography B*; 851(1): 51-70.
187. Tung, V., Burton, T., Dababneh, E., Quail, S., & Camp, A. (2014). Behavioral assessment of the aging mouse vestibular system. *JoVE*; 2014(89): e51605.
188. Tyszkiewicz, C., Pardo, I. D., Ritenour, H. N., Liu, C. N., & Somps, C. (2021). Increases in GFAP immunoreactive astrocytes in the cerebellar molecular layer of young adult CBA/J mice. *Laboratory Animal Research*; 37(1): 1-8.
189. Vainshtein, B. K., Melik-Adamyanyan, W. R., Barynin, V. V., Vagin, A. A., & Grebenko, A. I. (1981). Three-dimensional structure of the enzyme catalase. *Nature*; 293(5831): 411-421.
190. Van Heemst, D. (2010). Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging and disease*; 1(2): 147-157.
191. Velásquez, L. J., Vasquez, A., & Marín, C. (2014). S-nitrosilación de proteínas: Implicancias en la Biología Molecular del Cáncer. *Pharmacología*; 1(2): 84-92.
192. Vitale, G., Salvioli, S., & Franceschi, C. (2013). Oxidative stress and the ageing endocrine system. *Nature Reviews Endocrinology*; 9(4): 228-240.
193. Voogd, J., & Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends in cognitive sciences*; 2(9): 307-313.

194. Wallace, J., Krauter, E., & Campbell, B. (1980). Motor and Reflexive Behavior in the Aging Rat. *Journal of Gerontology*; 35(3): 364-370.
195. Wang, C., Liu, X., Zhang, M., Shao, H., Zhang, M., Wang, X. Li, H. (2019). Efficient Enzyme-Assisted Extraction and Conversion of Polydatin to Resveratrol from *Polygonum cuspidatum* Using Thermostable Cellulase and Immobilized β -Glucosidase. *Frontiers in microbiology*; 10: 445-456.
196. Weinert T. & Timiras S. 2003. Invited review: theories of aging. *J Appl Physio*; 2003(95): 1706-1716.
197. Wilkinson, H., & Hardman, M. (2020). Senescence in Wound Repair: Emerging Strategies to Target Chronic Healing Wounds. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*; 8(1): 1-13.
198. Wolff, M., & Vann, S. D. (2019). The cognitive thalamus as a gateway to mental representations. *Journal of Neuroscience*; 39(1): 3-14.
199. Wolfle, T. L., Rozmariek, C. M., & Grossblatt, M.(1996). Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. National Research Council. National Academy of Sciences. 1996(1): 1-146.
200. Woodruff-Pak, D., Foy, M., Akopian, G., Lee, K., Zach, J., Nguyen, K. & Thompson, R. (2010). Differential effects and rates of normal aging in cerebellum and hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 107(4): 1624-1629.
201. Zhang, X. Y., Wang, J. J., & Zhu, J. N. (2016). Cerebellar fastigial nucleus: from anatomic construction to physiological functions. *Cerebellum & ataxias*; 3(1): 1-10.