



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estudi de la modulació de les vies inflammatòries NF- κ B y MAPK durant l'envelliment cerebral i efecte del tractament amb resveratrol

M^a del Camí Cañellas Comas

Grau de biologia

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 78219436R

Treball tutelat per David Moranta Mesquida
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball: resveratrol, envelliment, estrès oxidatiu, activitat antioxidant, sirtuïnes, NF- κ B, MAPK, monoamines, deteriorament cognitiu, memòria, serotonina

ÍNDEX

1. RESUM	4
2. INTRODUCCIÓ	5
2.1. ENVELLIMENT A NIVELL POBLACIONAL	5
2.2. EFECTES DE L'ENVELLIMENT SOBRE EL CERVELL	5
2.3. TEORIA DE L'ESTRÉS OXIDATIU COM A RESPONSABLE DE L'ENVELLIMENT.....	6
2.4. NEUROINFLAMACIÓ A L'ENVELLIMENT	8
2.5. TERÀPIES CONTRA L'ENVELLIMENT, EL RESVERATROL	8
3. HIPOTESI I OBJECTIUS	12
4. MATERIAL I MÈTODES	13
4.1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ	13
4.2. FÀRMACS I TRACTAMENT	13
4.3. ANÀLISI COGNITIU A RATES: PROVA RADIAL MAZE	14
4.4. DETERMINACIÓ CROMATOGRÀFICA DE MONOAMINES	14
4.5. ANÀLISI DE PROTEÏNES A MOSTRES CEREBRALS PER WESTERN BLOT..	17
5. ANÀLISI ESTADÍSTIC	22
6. RESULTATS	23
6.1. EFECTE DEL TRACTAMENT CRÒNIC AMB RESVERATROL SOBRE LA MEMÒRIA ESPACIAL	23
6.2. EFECTE DEL TRACTAMENT CRÒNIC AMB RESVERATROL SOBRE LA SÍNTESI DE MONOAMINES A L'HIPOCAMP	24
6.3. EFECTE DEL TRACTAMENT CRÒNIC AMB RESVERATROL SOBRE ELS NIVELLS DE SIRT-1, NF-κB, MEK I REK	25
7. DISCUSSIÓ	27
8. CONCLUSIONS	29
9. REFERÈNCIES	30

1. RESUM

L'augment de l'esperança de vida ens els darrers anys ha estat un gran avanç en el països desenvolupats però, a causa d'aquest augment, la població envellaix i s'incrementa la incidència de malalties associades amb l'envelliment. Entre aquestes, un deteriorament cognitiu característic i diverses malalties neurodegeneratives. Entre les estratègies que intenten reduir l'impacte de l'envelliment a l'organisme, diversos estudis demostren que els antioxidants milloren les característiques cognitives durant l'envelliment. El resveratrol és un fenol amb propietats antioxidants que es troba en diverses fruites i verdures a més, és capaç de disminuir l'estrès oxidatiu i minvar així el risc enfront el desenvolupament de malalties neurodegeneratives (Baur *et al.*, 2006). El present estudi té com a objectiu principal, profunditzar en el mecanisme molecular responsable de l'efecte neuroprotector del resveratrol sobre el deteriorament cognitiu que ocorre durant l'envelliment, centrant-se principalment, en la modulació de les vies de senyalització implicades en la neuroinflamació (p.e. NF- κ B i MAPK).

Per dur a terme l'estudi, s'analitzà el metabolisme monoaminèrgic (5-HT, DA i NA) a l'hipocamp ja que, es tracta d'una de les principals regions relacionades amb els processos de memòria i aprenentatge; i s'han vinculats aquests neurotransmissors amb la modulació d'aquests processos de memòria i aprenentatge. El procediment utilitzat es basa en la quantificació d'aquestes monoamines, a més dels precursors i metabòlits, mitjançant la tècnica HPLC. Paral·lelament s'analitzà els nivells de les proteïnes relacionades amb les vies inflamatòries a aquesta mateixa regió cerebral mitjançant la tècnica de western blot. Els resultats obtinguts es comparen amb els resultats comportamentals derivats de la prova del laberint radial, que permet avaluar la memòria espacial. Aquests mostren la disminució de 5-HT, DA i NA a mesura que ocorre l'envelliment. També s'observa com amb el resveratrol, es dona una reducció d'aquest declivi ja que, augmenta la síntesi de monoamines. Aquests resultats es correlacionen amb les proves cognitives, on trobem una millora de la memòria. En relació al mecanisme molecular, encara que s'ha relacionat l'excés d'estrès oxidatiu amb un augment en la neuroinflamació que podria ser responsable de la neurodegeneració, aquest estudi no sembla recolzar aquesta hipòtesi. A més, els resultats apunten a que l'efecte neuroprotector del resveratrol està mediat per un mecanisme dependent de SIRT1. D'aquesta forma, l'estudi confirma l'efecte neuroprotector del resveratrol sobre el deteriorament cognitiu a causa de l'envelliment i suggereix un mecanisme mediat per SIRT1.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. L'envelliment a nivell poblacional

En els darrers anys ha augmentat l'edat de la població i el nombre de persones que sofreixen malalties neurodegeneratives, la qual cosa ha estimulat a la recerca de tractaments efectius front l'envelliment. El motiu d'aquest augment ha estat el desenvolupament científic, tecnològic i sanitari que ha donat pas a un augment de la qualitat i longevitat de la vida en els països desenvolupats (entre els quals s'hi troben els països de la Unió Europea). Avui dia, el grup de persones majors de 65 anys representen un percentatge elevat de la població, concretament, un 7,6% de la població mundial total i un 15,9% de la població de països desenvolupats, i es preveu que aquests percentatges augmentin a un 16,2% i 26,6%, respectivament, en uns 40 anys (Truchado *et al.*, 2010). El canvi que suposa a nivell estructural l'augment de l'esperança de vida té repercussions a nivell econòmic, sanitari i social, ja que pot suscitar una major inversió de béns polítics en sanitat i atenció a persones majors (Truchado *et al.*, 2012).

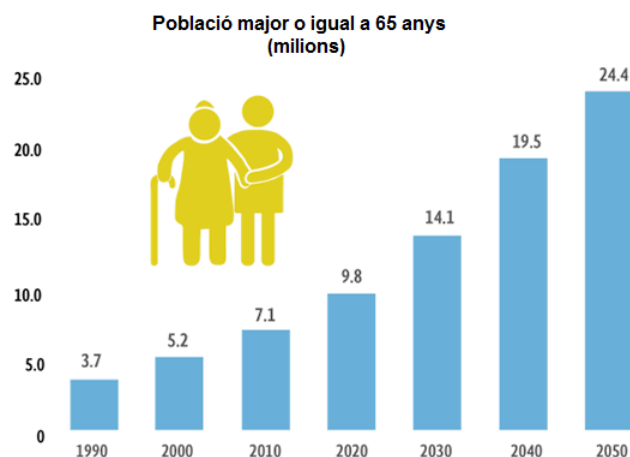


Figura 1. Augment de la població major o igual de 65 anys en els darrers anys a nivell mundial i aproximació de la creixuda en els pròxims anys. Font: Consejo Nacional de Población, CONAPO (2010).

Arreu del món, les taxes de mortalitat disminuïren a finals del segle XIX i al llarg del segle XX, però en els països desenvolupats en particular, retrocediren dràsticament després de la segona guerra mundial, gracies a la difusió de la medicina moderna.

2.2. Efectes de l'envelliment sobre el cervell

L'envelliment afecta de forma significativa a la biologia del cervell. Provoca canvis estructurals i fisiològics al cervell que indueixen distints graus de deteriorament cognitiu i fins i tot, sense la presència d'un dany neurodegeneratiu (Bishop *et al.*, 2010). L'envelliment és

un procés universal, complex, de naturalesa intrínseca i caràcter progressiu, multifactorial i amb efectes perjudicials, que suposa una progressiva pèrdua de funcionalitat i augment del risc de mort (Mandavilli *et al.*, 2002; Viña *et al.*, 2007; Strehler *et al.*, 1959). Entre d'altres coses, l'envelliment es caracteritza per una atrofia cerebral global. L'envelliment cerebral està associat a modificacions morfològiques i funcionals del Sistema Nerviós Central (SNC) com per exemple, canvis a nivell dels neurotransmissors que actuen sobre la funció neuronal i sinaptològica. A més d'alteracions del comportament i de les funcions rítmiques. Aquestes alteracions condueixen a una pèrdua de capacitat d'atenció, memòria de treball, retenció de nova informació, velocitat de processament, memòria a llarg termini i un augment de trastorns motors (Park, 2009).

Varis estudis han conclòs que durant l'envelliment de mamífers es donen alteracions en diversos sistemes de neurotransmissió del cervell, associats a la reducció del nombre de neurones (Fearnly i Lees, 1991), així com de la síntesi i concentració de neurotransmissors (Meek *et al.*, 1977; Sparks *et al.*, 1985). Els canvis estructurals desencadenats per l'envelliment engloben la disminució del tamany de les àrees cerebrals i la pèrdua d'integritat de la substància blanca que s'acompanya amb una disminució de l'activitat neuronal d'aquestes àrees (Bishop *et al.*, 2010). Per altra banda, els canvis fisiològics es caracteritzen per l'acumulació d'errors a diverses vies metabòliques, entre les quals es pot destacar una disminució de la homeòstasis del calci (Landfield i Eldrige, 1994), una pèrdua de sensibilitat de diversos sistemes de receptors (Josep *et al.*, 2000), així com canvis en els sistemes de neurotransmissió monoaminèrgica del cervell (Esteban *et al.*, 2010).

2.3. Teoria de l'estrès oxidatiu com a responsable de l'envelliment

Per tal d'entendre què és el que provoca l'envelliment i el seu desenvolupament, s'han postulat al llarg de la bibliografia científica multitud de teories, més de 300 segons una revisió de 1990 (Meldvedved, 1990). Entre la gran majoria destaquen la teoria de Pearl, que associa el procés de l'envelliment al desgast resultat del metabolisme (Pearl, 1928); la de Minot, que considera que és el preu que han de pagar els metazous per la diferenciació cel·lular (Minot, 1907); la de l'error catastròfic de Orgel, la precisió de la síntesi de proteïnes es deteriora amb l'absència de la selecció cel·lular (Orgel, 1963) i també la del límit mitòtic de Hayflick (Hayflick, 1985) i Gerschman (Gerschman, 1962). Avui dia, la més acceptada és la teoria de l'estrès oxidatiu basada en la hipòtesis de que els radicals lliures resultants de la respiració aeròbica, causen un dany oxidatiu acumulatiu a les proteïnes, lípids i ADN; així com també postula que l'ADN mitocondrial (ADNmt) és una de les dianes principals per l'atac d'aquests radicals lliures (Mandavilli *et al.*, 2002).

La teoria de l'estrès oxidatiu a l'envelliment es basa en que els radicals lliures produïts durant la respiració aeròbica causen un dany oxidatiu que s'acumula al llarg de la vida, i que resulta una pèrdua gradual dels mecanismes homeostàtics, una interferència dels patrons normals d'expressió gènica i la conseqüent pèrdua de la capacitat funcional de la cèl·lula; tot això condueix a l'envelliment i fins i tot pot provocar la mort (Harman *et al.*, 1956). Per tant es pot dir que l'envelliment és una conseqüència de l'estrès oxidatiu que provoca dany cel·lular.

El nivell d'estrès oxidatiu d'una cèl·lula depèn de dos factors: la velocitat de generació d'oxidants i dels nivells de mecanismes de defensa antioxidant; ambdós controlats genèticament i influenciats per factors epigenètics. Durant l'envelliment el desequilibri entre les espècies reactives de l'oxigen (ERO) i la capacitat antioxidant de l'organisme és el que porta a la condició d'estrès oxidatiu (Urso y Clarkson, 2003).

L'oxigen és essencial per obtenir energia a partir del metabolisme aeròbic, però alhora és la principal font generadora de radicals lliures. Els radicals lliures són espècies químiques que presenten un nombre imparell d'electrons, de manera que algun està desaparellat (Kumar *et al.*, 2012). El concepte de radicals lliure aplicat a sistemes biològics fa referència principalment a les espècies reactives de l'oxigen (ERO), un grup de composts derivats de la reducció incompleta de l'oxigen molecular. Tot i que existeix varietat de mecanismes de formació d'aquestes molècules, la font fisiològica per excel·lència és la respiració cel·lular (Merksamer, 2013). Aquest procés normalment inclou el pas d'electrons a través de quatre complexos proteics situats a la membrana interna mitocondrial, però en algunes rares ocasions es produeix la sortida prematura dels electrons, suposant la reducció incompleta de l'oxigen molecular i generant l'anió superòxid (Murphy, 2009). Els radicals lliures són els que causen els danys als lípids de les membranes cel·lulars, proteïnes, carbohidrats i ADN (Halliwell & Gutteridge, 1999; Bendich, 1993). L'estrès oxidatiu es produeix en situacions de falta de vitamines i minerals, processos inflamatoris, deficiència del sistema immune, situacions d'exercici intens i factors ambientals que impedeixen a l'organisme controlar la reacció en cadena de les ERO.

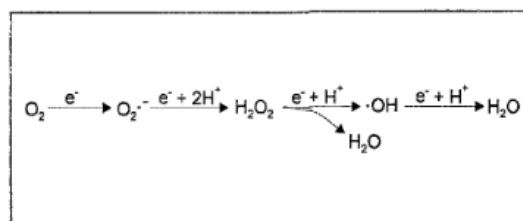


Figura 2. Esquema de la reducció univalent de l'oxigen. Font: Korc; Bidegain i Martell, 1995.

El pilar fonamental de la teoria de l'estrès oxidatiu indica que la intensitat de generació de radicals lliures en els teixits *in vivo* és menor en les espècies longeves que en aquelles que presenten major velocitat d'envelliment (Barja, 2005). A més, s'observà que amb un lleuger augment de la longevitat màxima en animals amb elevades concentracions d'antioxidants tissulars, s'incrementava l'esperança de vida mitjana (Kohn, 1971; Clapp *et al.*, 1979; Enesco *et al.*, 1980; Ledvina *et al.*, 1980; Porta *et al.*, 1980). El cervell és un dels òrgans més sensible a l'estrès oxidatiu ja que, és un dels que més oxigen necessita per la fabricació de les neurones.

2.4. Neuroinflamació a l'envelliment

La neuroinflamació és un mecanisme de defensa per protegir el sistema nerviós central (SNC) front agents infecciosos. Aquesta defensa constitueix un procés beneficiós per l'ésser que disminueix una vegada la infecció desapareix i es restaura l'homeostasi (Cristal *et al.*, 2010). Per altra banda, els processos neuroinflamatoris poden contribuir a la cascada d'aconteixements que culminen amb el dany neuronal observat en el desordre neurodegeneratiu ja que, un augment d'estrès oxidatiu provoca un augment de neuroinflamació. La via de senyalització que contribueix en la neuroinflamació és la via de les MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) (Spencer *et al.*, 2012). Esta composta per una família de proteïnes quinases (ERK, MEK, etc.) que tenen un paper fonamental en la recepció de senyals extracel·lulars i que s'activen mitjançant una cadena de fosforilacions. Per tant, les ERO són capaces d'activar aquestes vies i produir un augment de la fosforilació i posterior activació de les MAPKs. D'aquesta forma, si augmenta de manera considerable es produeix la degeneració de les neurones i el dany cerebral (Leng *et al.*, 2015).

2.5. Teràpies contra l'envelliment cerebral, el resveratrol

L'evidència científica acumulada durant les darreres dècades indica que consumir antioxidants que es troben als aliments tenen un important potencial per reduir el desenvolupament de l'envelliment cerebral (Ajith, 2015). Els antioxidants són molècules exògenes o endògenes que actuen en contra de qualsevol forma d'estrès oxidatiu i els seus efectes nocius associats en el sistema cel·lular (Lepoivre *et al.*, 1994). Els mecanismes de defensa antioxidants inclouen: eliminació d'espècies reactives d'oxigen/nitrogen o dels seus precursors, inhibició de la formació de EROS, unió d'ions metàl·lics necessaris per la catàlisi de la generació de EROS i regulació de defenses antioxidants endògenes (Yossi *et al.*, 2001).

A la nostra dieta diària ingerim milions d'antioxidants naturals com els composts fenòlics (polifenols, flavonoids i àcids fenòlics), l'ubiquinona, els carotens i vitamina C i minerals que actuen com antioxidants com seleni i zinc; que permeten la neutralització d'EROS als nostres òrgans vitals abans de que modifiquin altres estructures (Yossi *et al.*, 2001). Els antioxidants dietètics poden reduir el deteriorament cognitiu i prevenir el dany oxidatiu en el cervell en l'envelliment de les rates (Bishop *et al.*, 2010). Els polifenols són un dels tres tipus de composts fenòlics amb un gran interès a causa de la propietat antioxidant, la seva abundància en la dieta i la seva probable funció en la prevenció de diverses malalties associades amb l'estrès oxidatiu, com són el càncer, malalties cardiovascular i neurodegeneratives (Manach *et al.*, 2006). Els polifenols disminueixen l'estrès oxidatiu a través de mecanismes que inclouen la transcripció de gens que codifiquen per a les proteïnes anti-oxidants a més de contrarestar els EROS i altres oxidants (Kaspar *et al.*, 2009). Una dieta rica en polifenols pot protegir al cervell de la neurodegeneració ja que afavoreix l'envelliment saludable a través de diversos mecanismes de defensa (Frei i Higdon, 2003; Quideau *et al.*, 2011; Spencer, 2010). S'ha descobert que el consum moderat de vi redueix el risc de desenvolupar demència i que el paper protector no és causat per el contingut que té en alcohol sinó que són els polifenols de la llavor del raïm que poden reduir el risc de desenvolupar malalties neurodegeneratives (Truelsen *et al.*, 2002).

El resveratrol és un polifenol natural i potent antioxidant a la dieta. Es produït per el raïm vermell, les mores i també es troba als cacahquets (Tyihák *et al.*, 2011). A les darreres dècades, aquesta substància ha estat estudiada com a potencial agent terapèutic i preventiu de nombroses malalties. Les investigacions fetes *in vitro*, e *in vivo* han demostrat que el resvesratrol presenta propietats anti-cancerígenes, anti-inflamatories i anti-envelliment importants en el tractament de malalties cròniques i en la prevenció de l'envelliment prematur a causa de l'efecte antioxidant. S'ha observat que l'administració oral del trans-resveratrol en rates durant 28 dies indueix un increment de la massa cerebral probablement a causa del seu efecte neurotròfic, és a dir, el trans-resveratrol funcionaria en aquest cas com un factor de creixement i no com a un antioxidant (Smoliga *et al.*, 2011). En rates, el resveratrol millora la salut i prevé la mortalitat precoç associada a la obesitat però el seu mecanisme concret d'actuació és objecte de debat (Bauer *et al.*, 2010).

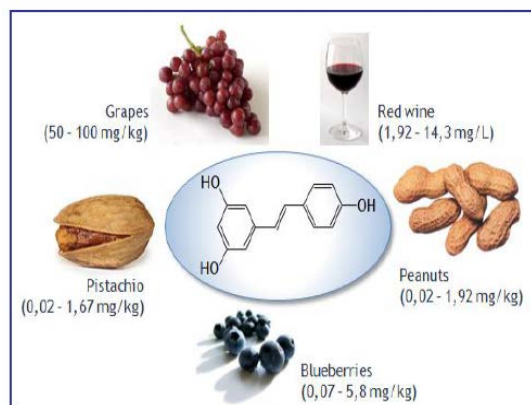


Figura 3. Estructura química del resveratrol i la seva proporció en alguns components de la dieta.

Per altra banda s'ha de tenir en compte la restricció calòrica (RC) que també retarda l'envelliment i prevé malalties neurodegeneratives, en un ampli rang d'espècies, des de llevats fins a primats. En aquest sentit el resveratrol, a més de contrarestar la formació de EROS exerceix neuroprotecció a través de la sobreexpressió de sirtuïnes, per el que fa al resveratrol, s'ha proposat com un mimètic de la RC a través d'aquest mecanisme. El règim de RC com a mecanisme per prevenir l'envelliment fou descrit per primera vegada al 1935 (McCay *et al.*, 1935).

A l'any 2000, Lin *et al.*, proposaren que les sirtuïnes (un grup d'enzims histones deacetilasses), són mediadores crítiques en la RC. Aquesta afirmació està basada en part en el descobriment de que l'activitat enzimàtica de totes les sirtuïnes és dependent del co-substrat nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD^+) (Imai *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). El NADH és un inhibidor competitiu de les sirtuïnes, per el que es va suggerir que un increment en relació $\text{NAD}^+:\text{NADH}$, provocat per un canvi en el metabolisme oxidatiu, pot derivar a un augment de l'activitat de les sirtuïnes, i per tant una disminució d'estrès oxidatiu (Lin *et al.*, 2004). Les sirtuïnes regulen la transcripció de certs gens; regulant un conjunt de proteïnes relacionades amb el metabolisme energètic i mecanismes de supervivència (com enzims que reparen el ADN, proteïnes quinasa, factors de transcripció, i coactivadors), per això juguen un paper fonamental en la longevitat. A més, s'han trobat efectes neuroprotectors tant en malalties neurològiques agudes i cròniques (com isquèmia cerebral, dany axonal, Alzheimer, Parkinson, esclerosi lateral amiotròfica, i esclerosi múltiple) (Zang *et al.*, 2011). La majoria dels efectes de resveratrol són modulats per les sirtuïnes; especialment SIRT1, per tant aclarir i conèixer els mecanismes d'actuació i regulació de SIRT1 promou un camp en la prevenció de l'envelliment (Mannari *et al.*, 2010).

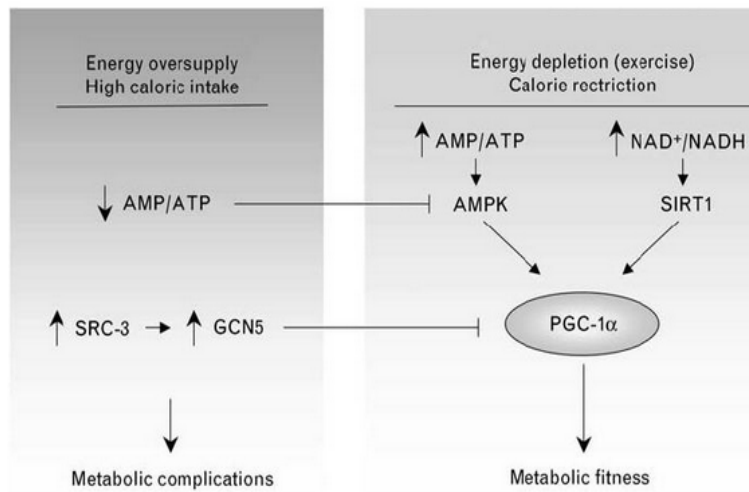


Figura 4. Quan es produeix un excés d'energia (calories) la relació AMP/ATP disminueix. En el cas contrari, durant la RC, es produeix un augment de AMP/ATP (també augmenta proporció NAD⁺:NADH) i com a conseqüència es dona l'activació de la SIRT1. Font: Cantó y Auwerx, 2009.

Pot considerar-se mimètic de la RC qualsevol component que produeixi un efecte beneficiós a través de l'activació de SIRT1. Tenint en compte aquesta definició, el resveratrol actua com un mimètic de la RC en mamífers (Baur *et al.*, 2010). Així doncs, el resveratrol aconsegueix mimetitzar altres aspectes de la RC, ja que s'activa la SIRT1 per mediar els seus efectes; com la disminució del ritme cardíac i també de la temperatura corporal ,o també perllonga la vida en animals que no sofreixen obesitat (Pearson *et al.*, 2008).

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

L'envelliment cerebral produeix un declivi cerebral i cognitiu general. Aquest deterior cognitiu es pot associar, almenys en part, amb el declivi monoaminèrgic que també s'observa durant l'envelliment a determinades regions cerebral relacionades amb aquests processos cognitius, com per exemple l'hipocamp i el cos estriat. Amb l'afany de contrarestar o retardar aquest declivi cognitiu associat amb l'envelliment, entre d'altres teràpies, s'aconsella una dieta rica amb antioxidant com la dieta mediterrànea. Entre els composts antioxidants que podem trobar a la dieta, el resveratrol ha despertat molt interès a causa del seu potencial terapèutic en front a l'envelliment. L'objectiu d'aquest treball consisteix en investigar més profundament en el potencial terapèutic del resveratrol i concretament en la protecció sobre les capacitats cognitives durant l'envelliment i relacionar-ho amb els fenòmens que s'observin a nivell cerebral, principalment sobre el sistema monoaminèrgic. A més, d'intentar conèixer el mecanisme d'acció responsable d'aquesta protecció cognitiva.

OBJECTIUS

1. Estudiar l'efecte del tractament amb resveratrol sobre el deteriorament de la memòria de treball que ocorre generalment durant l'envelliment a rates.
2. Analitzar l'efecte d'aquest tractament sobre el sistema monoaminèrgic a una regió relacionada amb els processos de memòria i aprenentatge com l'hipocamp.
3. Analitzar l'efecte d'aquest tractament sobre les proteïnes relacionades amb vies inflamatòries a l'hipocamp de rata.
4. Analitzar i interpretar els resultats obtinguts i correlació entre les dades bioquímiques i les proves cognitives.

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1. Animals d'experimentació

S'han utilitzat rates mascles Wistar joves (3 mesos; n=8) i velles (20 mesos; n=14) lliures de patògens (SPF) (Charles River, Barcelona, España). Els animals foren criats a l'estabulari de la Universitat de les Illes Balears (Tipo II, registre nºES704000000540 a la Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears), on es troben les condicions necessàries per treballar amb animals SPF. Els animals varen ser mantinguts en caixes de polipropilè translúcides individuals, amb cicles de 12h de llum/obscuritat, sota condicions controlades de temperatura (20-22°C) i humitat (50-65%). Varen rebre aigua i una dieta estàndard tipus A04 (Panlab®) *ad libitum*. Els procediments experimentals varen ser duts a terme seguint les directrius de la guia ètica del Consell Europeu (European Communities Council Directive 86/609/EEC), sent els protocols aprovats pel Comité Local Bioètic de la Universitat de les Illes Balears (UIB), Espanya.

4.2. Fàrmacs i tractament

El fàrmacs utilitzats en aquest treball han estat: resveratrol isomèric (3,4'5-trihidroxi-trans-estilè), oli de blat (vehicle que substitueix el resveratrol) i NSD-1015 (3-hidroxibenzilhidrazindihidroclorhídric), tots tres procedents de la casa comercial Sigma-Aldrich, (Madrid, Espanya). Tots els productes requerits pel processament de les mostres i execució de l'HPLC han estat obtinguts de Sigma-Aldrich.

Els tractaments crònics de les rates velles foren amb resveratrol (20 mg/kg/dia durant 30 dies; n=6) o amb l'oli de blat (1 ml/kg/dia durant 30 dies; n=8), representant així el grup control de rates velles. Les rates joves també van rebre el vehicle de dilució com les rates velles control. El tractament durà 30 dies, durant els quals es preparava diàriament la dilució del fàrmac i s'administrava via intraperitoneal entre les 8:00 i les 9:00am, ajustant i atenent al pes de l'animal i ja que, és quan es produeix el canvi de llum per tal d'evitar exposar als animals a un major estrès que pogués interferir en els resultats.

Tots els animals també reberen NSD 1015 (100 mg/kg) 30 minuts abans de ser sacrificades per decapitació. Aquesta administració fou presa per tal de mesurar l'activitat in vivo de la TPH i TH; mesurant l'acumulació de 5-HTP i la DOPA. Els cervells foren ràpidament extrets, i disseccionades en gel les diferents regions cerebrals, foren introduïdes dins nitrogen líquid i emmagatzemades a -80°C fins el dia de la seva utilització. En aquest treballs només es mostra l'anàlisi de l'hipocamp.

4.3. Anàlisi cognitiu a rates: prova *radial maze*

El *radial maze* és una prova utilitzada per a la valoració de la memòria de treball espacial. Com es pot veure a la figura 5 consisteix en un laberint (Panlab, S.L. Barcelona, Espanya) format per 8 braços (70x11cm) equidistants que s'estenen a partir d'una plataforma central octogonal (28cm de diàmetre). A l'extrem de cada braç s'hi situa un pouet amb una petita porció de menjar. El fet de que els animals hagin estat sotmesos a dejú durant les 48 hores prèvies a l'inici del test, amb lliure accés a l'aigua, actua com a reforç motivacional per tal de que els animals entrin als braços per a trobar-hi menjar.

Pel procés es seguí la versió estàndard de *radial maze*, el primer contacte dels animals amb el laberint (habitució) consistí en facilitar al subjecte l'exploració de la infraestructura durant 3 dies, 15 minuts cadascun. Per començar el test, es situar l'animal al centre de la plataforma. Durant el transcurs de la prova, s'anotaren els braços que visità i el temps transcorregut. Es donava per acabada quan ja s'havien visitat tots els 8 braços o bé quan s'arribava al temps màxim de 20 minuts. El laberint fou netejat amb etanol 95% cada vegada que es finalitzava un test per tal d'eliminar possibles olors d'animals anteriors.

Els resultats s'analitzen mitjançant un programa específic per a *radial maze*: Smart v2.5 (Panlab, S.L., Barcelona, Espanya). Cal considerar dos paràmetres: el temps necessari per a completar el laberint (amb un temps màxim de 20 minuts) i els errors comesos durant el procés, ja sigui per braços revisitats o sense visitar.

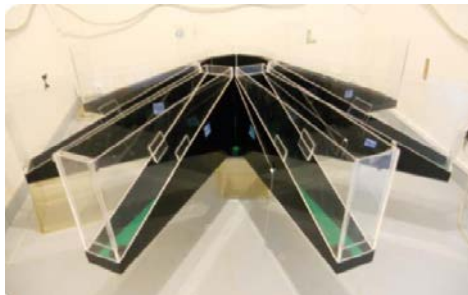


Figura 5. Laberint utilitzat per a la valoració de la memòria de treball, el *radial maze*.

4.4. Determinació cromatogràfica de la síntesis de monoamines, precursors i metabòlits *in vivo*

4.4.1. Dissecció i preparació de mostres

Després del tractament crònic amb resveratrol, les rates reberen NSD-1015 (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya) (100mg/kg, i.p.) i varen ser posteriorment sacrificades, passats 30 minuts d'aquesta administració, mitjançant decapitació; es va extreure el cervell i dissecionar els hipocamps que es varen congelar ràpidament en nitrogen líquid i van ser guardats a -80°C

fins el moment del seu processament. S'utilitzà NSD (clorhidrat de 3-hidroxibenzil-hidrazina) per tal de poder determinar l'activitat de la tirosina hidroxilasa i de la triptòfan hidroxilasa, enzims limitants de les vies metabòliques de síntesi de catecolamines i serotonina (5-HT) respectivament. NSD és un inhibidor de l'enzim L-descarboxilasa dels aminoàcids aromàtics centrals, de manera que la seva acció permet bloquejar la transformació de dopamina (DOPA) a adrenalina (DA) i noradrenalina (NA) i de 5-hidroxitriptòfan (5-HTP) a serotonina, i estudiar l'acumulació de 5-HTP i DOPA *in vivo* durant els 30 minuts previs al sacrifici (figura 6). Aquests nivells representen un indicador de la taxa de síntesi de monoamines; l'activitat dels enzims limitants en la ruta metabòlica: triptòfan hidroxilasa (TPH) i tirosina hidroxilasa (TH), respectivament.

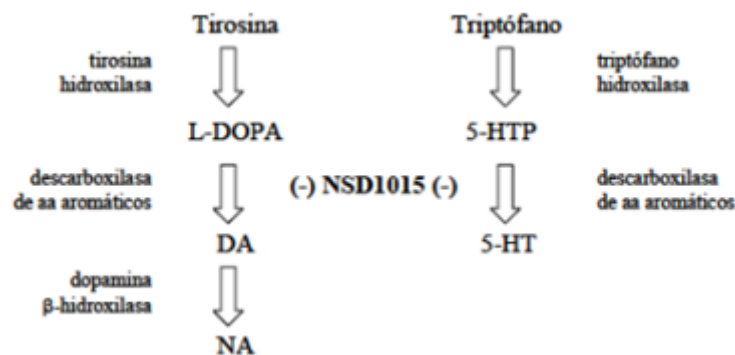


Figura 6. Esquema de la ruta de síntesi de monoamines i de l'efecte de NSD1015 en les vies de síntesi de monoamines. Font: Moranta, 2005.

A l'hora del processament dels hipocamps, es pesaren i es col·locaren individualment en tubs frescs disposats amb 1ml de tampó d'homogeneïtzació (HClO₄ 0,4M, K₂EDTA 0,01% i Na₂S₂O₅ 0,1%). S'homogeneïtzà el contingut de cada tub amb un homogeneïtzador Ultraturraz (tipus Tp 18/10) a velocitat màxima durant 30 segons. A continuació, es centrifugaren les mostres a 40000g durant 20 minuts a 4°C (centrifuga refrigerada sèrie Biocen 22R, amb rotor Orto alresa RT222Ns 140311/01) i el sobrenedant resultant va ser filtrat amb un filtre de xeringa de tefló de 0.45µm de diàmetre de porus (Spartan-3, Sigma-Aldrich; Millex®-LH; Millipodre; Billerica, Mass, USA). Es tornaren a congelar a -80°C els sobrenedants filtrats fins al moment de la quantificació mitjançant HPLC amb detecció electroquímica.

4.4.2. Anàlisi cromatogràfic

La tècnica utilitzada en aquest treball per a mesurar els nivells de monoamines (DA, 5-HT, NA), dels seus precursors i metabòlits (DOPA, 5-HIAA –àcid 5-hidroxitriptòlic-, 5-HTP) va

ser la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase reversa i amb detecció electroquímica. Aquesta tècnica pretén separar composts químics en funció de la seva diferent afinitat per una fase mòbil i una estacionària (figura 7). La fase (mòbil) circula amb íntim contacte amb un sòlid molt porós d'elevada capacitat absorbent o un altre líquid immiscible (fase estacionària). Quan s'introdueix una mescla de substàncies (la mostra en qüestió) en la fase mòbil, cada un dels composts avança al llarg del sistema amb una velocitat diferent, depenent de l'afinitat per cada una de les fases. Això suposa que quan la mostra hagi acabat de recórrer la columna, cada una de les substàncies prèviament introduïdes al sistema eluirà amb un temps diferent, de manera que s'haurà aconseguit separar-les. Així, el mecanisme per realitzar la separació dels composts en dissolució és la retenció de cada compost en la fase estacionària durant diferents temps. Els més polars i amb menor mida són els que presenten més dificultat per dissoldre's en la columna apolar, per tant, són els primers en sortir de la columna; mentre que els que tarden més són els de menor polaritat i major mida.

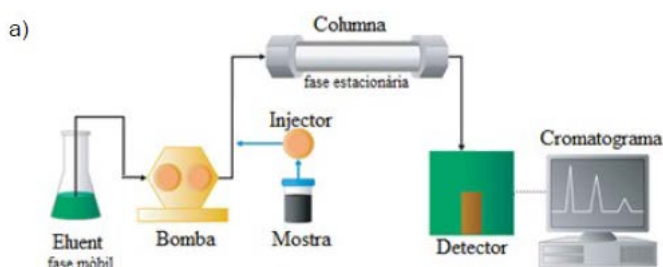


Figura 7. Esquema bàsic del funcionament i de les parts que integren el mecanisme de la tècnica (a); Aparell real utilitzat per a l'execució de l'HPLC (b)



En aquest cas es tracta d'una HPLC de fase inversa, això significa que la fase estacionària de la que disposa és Apolar. Es troba situada en una columna Spherisorb S3 ODS1 (C18; 5µm de mida de partícula, 4.6mm x 100mm; Waters), acoplada a una precolumna Tracer ODS2C18 (C18; 2-5µm de mida de partícula) (Teknokroma). Per altra banda, la fase mòbil o eluent (KH₂PO₄ 0,1 M; àcid octà sulfònic 2,1 M; K₂EDTA 0,1 M, metanol 10% (v/v) i 2mM NaCl ; i pH ajustat al rang 2,72-2,76 amb H₃PO₄ 85%) és impulsada a un flux de 0.8ml/min mitjançant una bomba de doble pistó tipus Waters 600 controller per tal de poder d'efectuar el recorregut i arribar a la columna que conté la fase estacionària.

Els composts es detectaren electroquímicament mantenint un potencial aplicat de +0.75V front a l'elèctrode de referència *in situ* (Ag/AgCl) mitjançant un detector electroquímic (Waters 2465 Electrochemical Detector). La corrent produïda va ser captada per un ordinador PC gràcies al software Empower Pro de Waters®, a través d'una interfase tipus WAT busSAT/IN Module (Waters). Es realitzà una corba estàndard per a cada compost a estudiar a partir de patrons externs (estàndards). Posteriorment, s'analitzaren les mostres i, mitjançant el software s'obtingueren unes corbes que interpolades al pic de la corba estàndard a la mostra, permeteren obtenir les concentracions de NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HTP, 5-HIAA, HVA, 5-HT.

4.5. Anàlisi de proteïnes a mostres cerebrals per Western Blot

4.5.1. Preparació de la mostra

Per a la immunodetecció dels nivells de les diferents proteïnes a estudiar, un dels hipocamps (100-150 mg) obtingut després dels tractaments crònics s'homogeneïtzà amb un homogeneïtzador Ultraturrax a màxima velocitat, en una proporció 1:15 pes/volum de tampó d'homogeneïtzació (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 2% SDS), que portava una mescla d'inhibidors de proteases i de fosfatases (*Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail*, nombre de catàleg 78443, de la casa comercial Life Technologies). A continuació, les mostres foren sonicades 2 vegades durant 10 seg a màxima potència amb un sonicador digital (model 450 de la casa comercial Branson). Una alíquota de l'homogeneïtzat (50 µl) es va utilitzar a la determinació del contingut proteic segons el mètode de l'àcid biciconínic (BCA). La resta fou diluïda 1:1 amb tampó de càrrega (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1,5% SDS; 10% glicerol; 2,5% 2-mercaptoetanol; 0,1% blau de bromofenol) i, finalment es desnaturalitzà incubant a 95°C durant 5 min. La preparació de les mostres es va dur a terme en tandes de 10 mostres, controlant en tot moment el temps de processament per no sobrepassar el temps de 1 hora i mantenint les mostres a 4°C durant tot el procediment.

4.5.2. Determinació del contingut proteic de les mostres mitjançant el mètode de l'àcid biciconínic (BCA)

A causa de la presència del detergent al tampó, la determinació del contingut proteic es va dur a terme utilitzant el mètode de l'àcid biciconínic que és compatible amb una concentració de fins a 1% de SDS (Smith y cols., 1985). Les proteïnes reaccionen a través de l'enllaç peptídic amb l'ió de coure, d'aquesta manera queda l'ió reduït a causa del medi alcalí (reacció de Biuret). Dues molècules d'àcid biciconínic reaccionen amb una molècula de coure reduïda per donar una coloració púrpura al medi. Aquest complex soluble en aigua

posseeix un màxim d'absorbància a una longitud d'ona de 562 nm. En un tub d'assaig, es varen diluir 5 µl de mostra amb aigua bidestil·lada fins a completar un volum de 100 µl. Paral·lelament es realitzà una corba patró, a partir d'una dissolució coneguda d'albúmina bovina (2 µg/µl), l'interval de concentració de la qual fou de 0,05 a 0,7 µg/µl en un volum total de 100 µl d'aigua bidestil·lada.

Les mostres es processaren per triplicat i la recta patró per duplicat. A continuació, s'afegiren, tant a les mostres com a la recta patró, 2 ml de reactiu BCA (Pierce, U.S.A) compost per 50 volums de reactiu A i un volum de B. Després de la seva agitació, s'incubaren a 37°C durant 30 min i posteriorment, es deixaren reposar a temperatura ambient. Els valors d'absorbància es mesuraren en un espectrofotòmetre (BioPhotometer, Eppendor, Hamburg, Alemanya) a 562 nm. Aquest espectrofotòmetre proporciona automàticament els valors proteics de les mostres quan extrapolem les seves absorbàncies amb les de la recta patró mitjançant una regressió lineal.

4.5.3. Electroforesi

Per la separació de les proteïnes es va utilitzar la tècnica d'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli, 1970). Els gels de poliacrilamida són suports que eviten la convecció i minimitzen la difusió, a més de participar en el procés de separació de mostres. L'SDS ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2 = \text{SO}_3\text{Na}^+$) interacciona amb la gran majoria de les proteïnes per absorció no específica, formant complexos. Debut a la càrrega negativa que proporciona cada molècula de SDS, les càrregues pròpies de les proteïnes queden emmascarades, i els complexos proteïna/SDS es carreguen de forma uniforme. La mobilitat electroforètica en aquestes condicions de desnaturalització, és troba en funció de la massa molecular de cada proteïna debut a que la càrrega és uniforme per tots els complexos proteïna/SDS. El pes molecular de la proteïna es pot determinar comparant la seva mobilitat electroforètica amb estàndards o control de pes molecular conegut.

Es varen utilitzar gels amb sistemes de tamponament discontinu en els quals es pot diferenciar dues zones: un gel de concentració de mostres (*Stucking*) compost per 4% d'acrilamida-bisacrilamida, 166 mM Tris-HCL, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,2% persulfat amònic i 0,08% N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED); i un gel de resolució o separació (*Running*) compost per un 8% d'acrilamida-bisacrilamida; 0,75 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05% persulfat amònic i 0,05% TEMED. En els gels, es carregaren de 5 a 20 µl de

mostra, carregant un volum final de 40mg/ml de proteïnes en cada mostra. També es carregaren 3 pouets amb un *pool* de 20 µl format per la mescla de diferents mostres d'escorça parietal. Carregant el mateix volum de *pool* als diferents pouets tindrem la mateixa quantitat de proteïna als diferents gels, que ens permetrà fer una comparació d'aquesta una vegada haguem normalitzat els valors de les mostres de cada gel. S'utilitzaren pintes de 15 pouets, on es carregaren mostres en tots els pouets excepte en els dos corresponents als extrems. En cada gel es carregaren 5 µl del marcador PiNK Prestained Protein Ladder (de la casa comercial NIPPON Genetica) constituït per proteïnes pretenyides amb blau de bromofenol que conté un rang de pesos moleculars entre 14 i 175 kDa.

Una vegada les mostres foren carregades en el gel, es varen sotmetre a una corrent continua de 80 volts, i una vegada dins el gel de resolució la intensitat de la corrent es va augmentar fins a 110 volts. El temps aproximat d'electroforesi fou d'uns 120 minuts, encara que depèn del pes molecular de la proteïna que s'estudia. El tampó d'electroforesi en el qual es troben immersos els gels estava compost per: 0,3% Tris base; 1,44% glicina; 0,1% de SDS, i el pH del tampó era de 8,5-8,6.

4.5.4. Electrotransferència (Western Blot)

Després de la electroforesi, les proteïnes foren transferides a una membrana de nitrocel·lulosa amb un diàmetre de porus de 0,45 µm, aplicant un camp elèctric perpendicular al pla del gel, conegut com a *western blot*. Una vegada les proteïnes han passat a la membrana, per identificar-les s'utilitzaren diferents anticossos, tècnica coneguda com *immunoblotting*. Aquesta tècnica es basa en la capacitat que posseeixen els anticossos en reconèixer de forma específica determinades proteïnes que actuen com antígens.

Per a realitzar la electrotransferència, el gel i la membrana de nitrocel·lulosa es col·loquen entre un conjunt de fulles de paper de filtre (3MM Whatman) i esponges, juntament subjectades amb una armadura de plàstic i submergit en el tampó de transferència (25 mM Tris-HCl, ph 8,4; 60 mM glicina; 20% metanol). El procés de transferència es realitzà a 10 volts durant 45 min. (Figura 9)

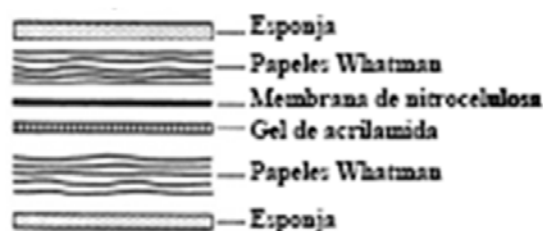


Figura 8. Esquema representatiu dels elements de l'electrotransferència (Western Blot).

Una vegada passat el temps, les membranes de nitrocel·lulosa foren incubades durant una hora a temperatura ambient en una solució bloquejadora la qual conté tampó TBS (5% llet en pols desnatada i 0,1% Tween 20, monolaureato de polioxietilensorbitan). Les proteïnes de la solució bloquejadora s'han d'unir inespecíficament a totes les porcions de membrana que no s'han absorbit proteïnes del gel, evitant així la unió inespecífica dels anticossos a la membrana i incrementa la probabilitat de que sols s'uneixin als seus respectius antígens.

Després del bloqueig, les membranes de nitrocel·lulosa foren incubades durant 13-16 hores, a 4 °C amb una suau i contínua agitació, amb l'anticòs primari contra les formes fosforilades de cada proteïna analitzada. Es repeteix el mateix procés per les proteïnes totals. Els anticossos primaris utilitzats foren els següents, ordenats alfabèticament:

- **Anti-SIRT1:** anticòs policlonal (IgG de conill) contra la proteïna de 110 kDa SIRT1. Aquest anticòs s'uneix als aminoàcids 1-131 de ratolí de SIRT1. Així com detecta una altra banda de 75 kDa que correspon a SIRT1 75 kDa. Aquest anticòs fou subministrat per la casa comercial Millipore (USA), nombre de referència: 07-131 (Lot. 2428681).
- **p-ERK (p-p44/42; p-MAPK; p- Erk1/2) / ERK (p44/42; MAPK; Erk1/2):** anticòs monoclonal (IgG de conill) contra la proteïna de 42 i 44 kDa p-p44/42, així com l'anticòs monoclonal (IgG de conill) contra la proteïna total p44/42. Aquest anticòs fou adquirit a la casa comercial Cell Signaling (USA), nombre de referència de ERK total: 9102S (Lot. 18); i nombre de referència de ERK fosforilada: 9101S (Lot. 9101S).
- **p-MEK (1/2)/MEK (1/2):** anticòs policlonal (IgG de conill) contra la proteïna total MEK (1/2). Els anticossos monoclonals es produeixen mitjançant la immunització d'animals amb un pèptid sintètic que correspon a la seqüència MEK1/2 d'humans. Aquest anticòs fou adquirit amb un pèptid sintètic corresponent a la seqüència MEK1/2 d'humans. Aquest anticòs fou adquirit a la casa comercial Cell Signaling (USA), nombre de referència de MEK total: Sc-372 (Lot. 19); i nombre de referència de MEK fosforilada: 9122 (Lot. 10).
- **p-NF-κB (p-p65) / NF-κB (p65):** anticòs policlonal (IgG de conill) contra la proteïna de 65 kDa p-NF-κB (p-p65), que reconeix la serina (ser 276); així com també l'anticòs policlonal (IgG de conill) contra la proteïna total NF-κB (ser 276). Aquest anticòs fou subministrat per la casa comercial Santa Cruz (USA), nombre de referència de NF-κB total: Sc-372 (Lot. L1610); i nombre de referència de NF-κB fosforilada: Sc-101749 (Lot.C3012).

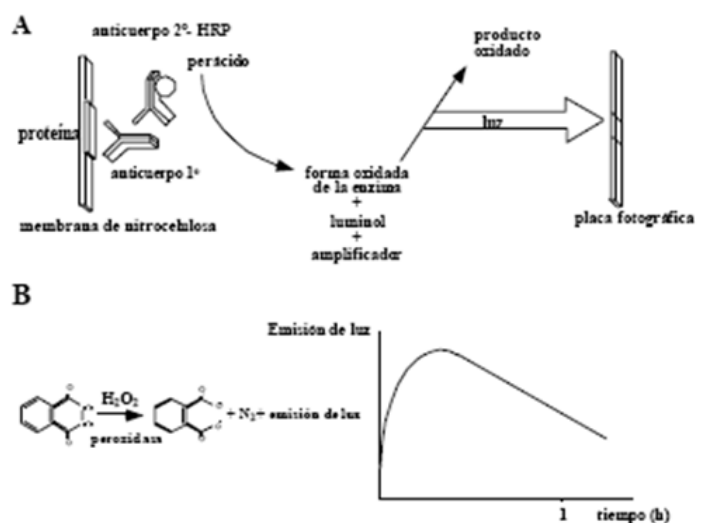
- **α -Tubulina:** anticòs monoclonal (isotip IgG1 de ratolí) contra la proteïna de 55 kDa α -Tubulina. Aquest anticòs deriva de la hibridoma B-5-1-2 produït per la fusió de cèl·lules de mieloma i esplenocits, a un ratolí immunitzat. La tubulina té un pes molecular de 50 kDa. Aquest anticòs fou subministrat per Sigma Aldrich, nombre de referència: PA186602 (Lot. PJ1886651).

Després de diversos rentats de les membranes (3 de 5 min) amb tampó TBS, s'incubaren amb l'anticòs secundari, que reconeix de forma específica a l'anticòs primari utilitzat, durant 2 hores. L'anticòs secundari (anti-mouse) està conjugat amb l'enzim peroxidasa de ràvec. L'anticòs secundari fou subministrat per Cell Signaling (USA), nombre de referència: 1858413 (Lot. HA102346).

4.5.5. Sistema de detecció

La immunoreactivitat fou detectada mitjançant un sistema de quimioluminescència amplificada. S'utilitzaren reactius de revelat composts per luminol i àcid cumàric present en dues solucions: Solució 1: 2.5 mM luminol, 0.4 mM àcid p-cumàric, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5). Solució 2: 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 0.2 mM H_2O_2 . Es combinen ambdues solucions en una proporció 1:1. L'enzim peroxidasa unida a l'anticòs secundari, catalitza l'oxidació del luminol en presència de peròxid d'hidrogen (Figura 10,a). Després de l'oxidació, emet una senyal quimioluminescent que arriba a la màxima intensitat entre els 5-20 primers minuts. A partir d'aquest moment, comença a descendir tenint una semivida d'emissió d'uns 60 min (Figura 10, b).

Figura 9. Sistema de detecció de proteïnes per quimioluminescència utilitzant el sistema ECL. A) les membranes de nitrocel·lulosa són incubades primer amb l'anticòs primari y a continuació amb anticòs secundari conjugat amb l'enzim peroxidasa. La llum emesa per quimioluminescència és detectada quan incubam les membranes amb els reactius comercials i amb un aparell informàtic. B) Reacció d'oxidació del luminol per acció del peròxid d'hidrogen catalitzat per la peroxidasa.



La mescla del revelat (800 µl S1 + 800 µl S2) es va repartir sobre les membranes i es va incubà durant 1 minut. Posteriorment, s'analitzà l'emissió de llum per part de les membranes mitjançant un sistema de captura d'imatges per quimioluminescència *GeneGnome XRQ* (*Syngene*). El temps d'exposició de les membranes fou diferent segons la proteïna que s'analitzava i els anticossos utilitzats (entre 1 i 20 minuts).

4.5.6. Quantificació fotodensimètrica

L'anàlisi de les imatges fou realitzat amb un programa de domini públic *NIH Image program*, desenvolupat per U.S. National Institutes of Health i accessible de forma gratuïta a la pàgina web <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>. D'aquesta forma s'obtenen els valors de densitat òptica integrada (DOI) que resulta de la suma dels píxels que forma la franja immunoreactiva. Un píxel és un punt definit per les coordenades (x, y, x), on (x) i (y) són els eixos perpendiculars que situen al punt a un pla, i (z) és l'eix perpendicular al pla que representa la intensitat del punt dins una escala de grisos de 256 tonalitats.

La quantificació de cada mostra es va realitzar un mínim de 3 vegades en diferents gels, cada gel carregat amb diferents mostres cerebrals de rata control o tractades amb el fàrmac. El valor de cada mostra a cada gel fou corregida pel valor de densitat integrada dels 3 pouets del *pool* carregats (20 µl). Finalment, es calculà la variació de la immunoreactivitat de cada rata sotmesa a cada tractament específic respecta a les mostres control (100%) en diferents gels. I s'utilitzà el valor mitjà per l'estimació final.

5. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Per fer l'anàlisi estadístic dels resultats s'emprà el software GraphPad Prism 5, per fer l'anàlisi de la variança s'utilitzà el test d'una via ANOVA seguit d'un test per analitzar la diferència de cada grup dos a dos, així com les gràfiques corresponents. S'ha considerat estadísticament significatiu un nivell mínim de probabilitat inferior a 0,05 ($p < 0,05$) i els resultats s'han expressat com a mitjana \pm error estàndard.

6. RESULTATS

En aquest estudi es realitzà un tractament crònic amb resveratrol que consistia en una administració diària (dosis i.o.) als animals vells. L'objectiu principal de l'estudi fou analitzar l'efecte protector de l'administració exògena de resveratrol en rates en ple declivi o envelliment cerebral i correlacionar el descens cognitiu relacionat amb l'edat i amb els resultats moleculars. Els animals foren pesats cada dia abans de l'administració de resveratrol i es mesurà la quantitat de menjar consumit diàriament. El primer que s'observa és que el tractament no va provocar un canvi significatiu al pes corporal de les rates per tant, el tractament amb resveratrol no altera la ingesta dels animals (dades no mostrades). A continuació s'expliquen els resultats obtinguts a partir de les proves cognitives, bioquímiques i moleculars.

6.1. Efecte del tractament crònic amb resveratrol sobre la memòria espacial

Per analitzar l'efecte neuroprotector a nivell comportamental es valorà la memòria de treball espacial mitjançant el laberint radial. Aquest aparell és un laberint de 8 braços equidistants als quals les rates hauran d'anar per aconseguir les 8 porcions de menjar. Els dos paràmetres analitzats són el temps en que les rates completen la prova comportamental i el nombre d'errors comesos.

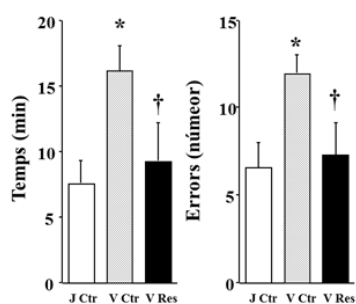


Figura 10. Prova de memòria de treball en rates velles mitjançant el Test de Radial Maze. Les barres representen (mitjana \pm SEM) el temps que tarda en completar el treball (gràfic de l'esquerra) i el nombre total d'errors (suma dels braços no visitats i revisitats, gràfic de la dreta). El test estadístic utilitzat fou el d'una via ANOVA seguit del test de Scheffe o Fisher: * $p \leq 0.05$, quan es compara amb el grup de rates control joves; † $p \leq 0.05$, quan es compara amb el grup de rates control velles.

Inicialment s'observa que les rates velles cometen el doble de nombre d'errors que els individus joves debut al declivi cerebral. A més, en comparació amb els individus joves, les rates velles tarden més del doble de temps per completar els assajos. Amb el tractament crònic amb resveratrol s'ha aconseguit que les rates velles disminueixin el nombre d'errors. Per altra banda, també es mostra com les rates velles tractades amb resveratrol tenen major memòria espacial que les rates velles control, ja que tarden menys en completar el test.

Cal dir que l'oli de blat utilitzat com a vehicle, no va afectar als paràmetres de la prova experimental de cap dels individus ja que, s'utilitzava per diluir el fàrmac dels individus tractats i aquests no mostraven cap tipus de canvi (dades no mostrades). Finalment, aquests resultats mostren que el tractament crònic amb resveratrol ha produït un augment de la capacitat cognitiva que normalment es redueix com a conseqüència de l'envelliment.

6.2. Efecte del tractament crònic amb resveratrol sobre la síntesi de monoamines a l'hipocamp

Als mateixos animals de l'apart anterior, s'analitzà també l'efecte del resveratrol sobre les monoamines seleccionades (DA, 5-HT i NA) a més dels seus precursors i metabòlits que es troben a l'hipocamp, que és una regió cerebral molt important en el procés de la memòria i aprenentatge. El sistema monoaminèrgic i dopaminèrgic de l'hipocamp es veuen afectats amb l'envelliment, ja que a mesura que es produeix el dany cerebral disminueix la capacitat de síntesi de les monoamines (Morago, 2015).

Aquesta regió és rica en terminals nervioses noradrenèrgiques i serotoninèrgiques. La síntesi de serotonina (5-HT) es mesurà en relació a l'acumulació del seu precursor (5-HTP, 5-hidroxitriptamina), passats 30 min després de la inhibició de l'enzim descarboxilasa amb NSD 1015. L'acumulació de 5-HTP indica el nivell d'activitat de l'enzim limitant triptòfan hidroxilasa.

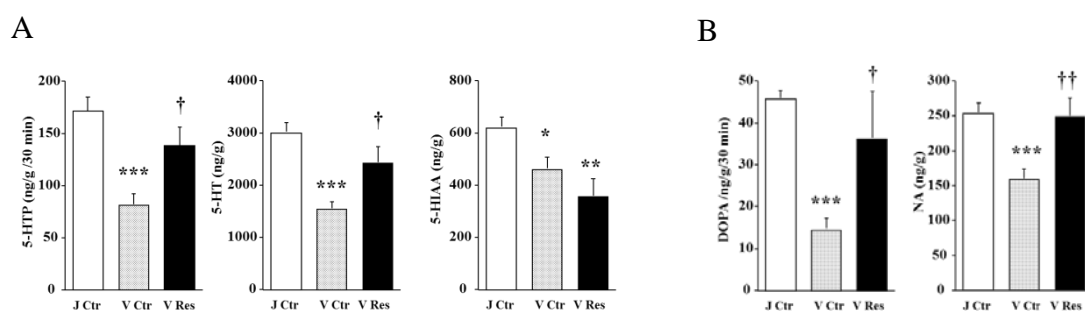


Figura 11. Efecte del tractament crònic del trans-resveratrol en el sistema serotoninèrgic i catecolaminèrgic a l'hipocamp. Les barres representen en ng/g de teixit (mitjana \pm SEM) (A) l'acumulació de 5-HTP (durant 30 min després de la inhibició de la descarboxilasa amb NSD 1015), contingut tissular de 5-HT i els nivells de metabòlits de la 5-HT, el 5-HIAA; (B) així com l'acumulació de DOPA (durant 30 min després de la inhibició de la descarboxilasa amb NSD 1015), contingut tissular de NA. El test estadístic utilitzat fou el de ANOVA de una via seguit del test de Newman: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ quan es compara amb el grup de rates control joves; † $p \leq 0.05$, †† $p \leq 0.05$ quan es compara amb el grup de rates control velles.

Els resultats mostren que la síntesi de serotonina en rates velles disminueix i el tractament amb resveratrol fa que la síntesi augmenti als nivells de les rates joves. Per altra banda, en el sistema catecolaminèrgic, a l'hipocamp no hi ha terminals de neurones dopaminèrgiques, només n'hi ha de noradrenèrgiques, per aquest motiu tota la DOPA acumulada va destinada a la síntesi de noradrenalina i per tant; indicaria síntesi de NA. Aquesta síntesi de NA disminueix amb l'edat i s'ha observat una disminució de l'acumulació de DOPA en rates velles. Amb l'administració de resveratrol, les rates velles augmenten significativament la síntesi de NA. L'augment que es veu de DOPA podria ser debut en resposta a la major activitat de síntesi per protecció del resveratrol front el dany oxidatiu d'aquest enzim; però

també podria ser a causa d'una reducció a la mort neuronal. En el cas de les catecolamines no es pot mesurar la quantitat de metabòlits de NA perquè amb el mètode HPLC no es poden detectar. Si els metabòlits de NA augmenten pot ser per diverses raons, la més probable és debut a l'alliberació de NA, és a dir, a un augment de neurotransmissió noradrenèrgica.

6.3. Efecte del tractament crònic amb resveratrol sobre els nivells de SIRT1, NF-κB, MEK i REK

L'efecte protector observat per el resveratrol pot ser perquè contraresta l'estrès oxidatiu a nivell cerebral; aquest estrès oxidatiu pot produir un augment de la neuroinflamació que pot ser la responsable, almenys en part, de la mort neuronal i conseqüentment del declivi monoaminèrgic i cognitiu durant l'envelliment.

Per comprovar aquesta hipòtesi sobre el mecanisme d'acció del resveratrol s'analitzà per Western Blot els nivells de proteïnes implicades en vies de senyalització relacionades amb la resposta inflamatòria a l'hipocamp d'aquests animals. Concretament, es va analitzar la proteïna NF-κB i la via de les MPAK de ERK que s'activen quan es produeixen estímuls inflamatoris.

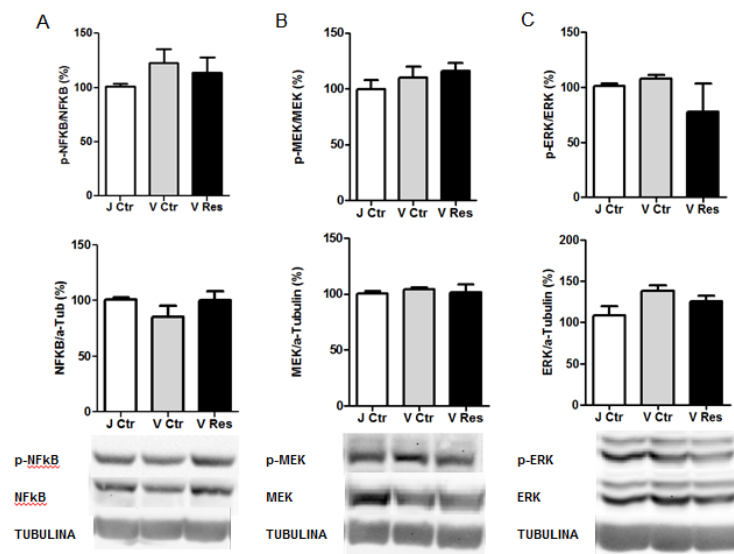


Figura 12. Efectes de l'envelliment i del tractament crònic amb resveratrol sobre els nivells de la proteïna NF-κB, ERK i MEK i les seves formes fosforilades a l'hipocamp de rata. A la figura es mostra el gràfic de les proteïnes NF-κB (A), MEK (B) i ERK (C). A cada una es mostra la proporció de forma fosforilada respecte el total (gràfica superior), el nivell total respecte tubulina (gràfica inferior) A sota es mostren els westerns blots representatius de les dades mostrades a les gràfiques. Els valors (mitjana ± SEM) són expressats com el percentatge

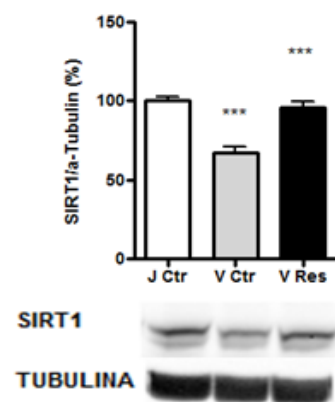
relatiu del grup control de rates joves (J Ctr), el grup control de rates velles (V Ctr) o el grup de rates tractades amb resveratrol (V Res). n = 5-9 animals per grup. El test estadístic utilitzat fou el de ANOVA de una via seguit del test de *Newman-Keuls*. Davall cada gràfic es mostra un immunoblot representatiu de les dades no mostrades.

En els resultats s'observa que les proteïnes relacionades amb la inflamació tendeixen a augmentar a mesura que progressa l'envelliment. Les rates velles control tenen les proteïnes incrementades en comparació a les rates joves. S'observa com el tractament

crònic amb resveratrol ha afectat a les 3 proteïnes, NF-Kb, ERK i MEK. En el cas del Factor de transcripció nuclear (NF-Kb) amb el resveratrol s'ha produït una disminució no significativa de la proteïna.

Els nivells de proteïna ERK tendeixen a créixer ja que, tant en individus vells com en individus tractats s'observa un lleuger augment de la proteïna respecte els individus joves. Aquest augment de la proteïna total pot ser debut a que l'envelliment o en el cas del resveratrol; el tractament, ha produït un canvi adaptatiu que dur a un augment de l'expressió de proteïna; i si això es dur a terme és perquè a que les vies de senyalització inflamatòria es troben alterades en les condicions establertes. En el cas de la proporció de la proteïna fosforilada; es veu l'augment en rates velles i probablement hi hagués augment en les rates tractades debut a l'augment de la neuroinflamació. Com que no s'observen canvis molt clars sobre les diferents proteïnes relacionades amb la neuroinflamació ni durant l'envelliment ni pel tractament amb resveratrol, ens plantejarem altres possibilitats per explicar els efectes del resveratrol. Com que s'ha descrit que el resveratrol també actua a través del receptor de sirtuïnes, analitzarem els nivells d'aquestes proteïnes a l'hipocamp d'aquests animals. A la figura 5 es mostren els resultats dels nivells de SIRT1.

Figura 13. Efectes de l'envelliment i del tractament crònic amb resveratrol sobre els nivells de la proteïna SIRT1. Anàlisi densitomètric quantitatiu de l'expressió de la proteïna SIRT1 a l'hipocamp. Els nivells de SIRT1 es normalitzaren amb α -Tubulina. Els valors (mitjana \pm SEM) són expressats com el percentatge relatiu del grup control de rates joves (J Ctr), el grup control de rates velles (V Ctr) o el grup de rates tractades amb resveratrol (V Res). $n = 5-9$ animals per grup. El test estadístic utilitzat fou el de ANOVA de una via seguit del test de *Newman-Keuls*: *** $p \leq 0.001$ quan es compara amb el grup de rates control joves i velles. A la part inferior del gràfic es troba un immunoblot representatiu de l'efecte del tractament sobre la immunodensitat de la proteïna SIRT1 i α -Tubulina de l'hipocamp de rata (dades no mostrades).



Els resultats mostren que en rates velles control disminueix de forma significativa el nivell de SIRT1 a causa de l'envelliment. El tractament crònic amb resveratrol ha provocat un canvi molt significatiu, ja que als individus vells tractats amb l'antioxidant no es produeix una reducció tan marcada o es produeix un augment del nivells de SIRT1, els quals tornen a nivells semblants als de rates joves. Aquests resultats semblen apuntar a un efecte protector a nivell cerebral del resveratrol mediat per SIRT1, més que a un efecte de contrarestar l'estrès oxidatiu i/o la neuroinflamació.

7. DISCUSSIÓ

Una de les conseqüències de l'envelliment és el dèficit cognitiu que es manifesta, per exemple, en el deteriorament de l'aprenentatge (Forster *et al.*, 1994). Aquest declivi és debut en part a la reducció de neurones monoaminèrgiques i/o neurotransmissors monoaminèrgics a diferents regions del cervell, entre les quals es troba l'hipocamp ja que; és una regió cerebral involucrada en la regulació del processament de la memòria en adults (González-Burgos *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2008). Es va decidir analitzar l'efecte del tractament crònic amb resveratrol perquè s'ha descrit que té la capacitat de disminuir l'estrès oxidatiu i d'aquesta forma minvar el risc enfront el desenvolupament de malalties neurodegeneratives. La suplementació amb antioxidants als animals en la dieta fa que millori la resposta immune i disminueixi l'estrès oxidatiu, generant una major resistència a malalties infeccioses i degeneratives (Chew, 1995; Roedor, 1995).

El laberint radial ens permet analitzar a rates la capacitat cognitiva dels individus a les diferents condicions analitzades. Els resultats obtinguts en la prova de memòria espacial confirmen el deteriorament de la memòria durant l'envelliment i demostren una millora de la memòria de treball als animals vells per el tractament amb resveratrol, ja que produeix una disminució del temps necessari per completar el test i una reducció d'error a aquestes rates tractades amb resveratrol.

La memòria implica el sistema monoaminèrgic (Esteban, 2010). Amb l'edat es dona una reducció de la neurotransmissió monoaminèrgica del cervell (Esteban *et al.*, 2010) i aquesta reducció podria ser responsable del declivi cognitiu observat. S'ha estudiat el sistema serotoninèrgic a l'hipocamp perquè constitueix una de les terminacions aferents d'aquesta regió (Nestler *et al.*, 2001). El pas limitant a la ruta de síntesi de la 5-HT és la hidroxilació del triptòfan mitjançant la triptòfan hidroxilasa (Strüder *et al.*, 2001). Per tant, una disminució de la seva activitat o quantitat es veu reflectida en una conseqüent reducció dels nivells de serotonina, tal com passa en rates envellides (Esteban *et al.*, 2010). En el nostre estudi, s'ha observat un canvi en l'acumulació de 5-HTP, que es correspon amb l'augment de la producció de serotonina als individus tractats amb resveratrol respecte als individus control vells. Aquest augment de serotonina suggereix que el resveratrol ha contribuït positivament a reduir el declivi serotoninèrgic a l'hipocamp associat amb l'envelliment.

Per altra banda, s'han estudiat els nivells de NA i del seu precursor, la DOPA ja que, diversos estudis demostren que la dopamina desenvolupa un paper important en els canvis sinàptics observats en els estats d'aprenentatge i memòria (García *et al.*, 2005). En els

resultats s'observen la gran diferència entre els nivells de precursor DOPA entre les rates joves control i les velles control, el que significa una reducció en la síntesi de noradrenalina durant l'envelliment. El tractament crònic amb resveratrol ha produït un augment de la DOPA significatiu a l'hipocamp. Per tant, el resveratrol també ha contribuït a reduir el declivi noradrenèrgic que ocorre durant l'envelliment a l'hipocamp. Aquest efecte protector del resveratrol podria ser debut, almenys en part, a l'efecte antioxidant del resveratrol. Alhora, aquest efecte antioxidant podria disminuir la neuroinflamació produïda per l'envelliment, per aquest motiu en aquest estudi s'estudiaren les molècules implicades amb la resposta inflamatòria del cervell. Les vies de senyalització inflamatòries concretes estudiades a aquest treball són NF- κ B i la via ERK de les MAPK. Diversos reguladors dels processos inflamatoris depenen de NF- κ B. El factor nuclear kappa (NF- κ B) es tracta d'una proteïna que pertany als factors de transcripció i participa en la resposta immune e inflamatòria així com en el desenvolupament, formació, progressió i apoptosi de tumors (Hayden, 2004). Normalment el trobem al citoplasma de forma inactiva unit a proteïnes inhibidores (Beinke, 2004). Una vegada aquestes són fosforilades per diferents estímuls com l'estrès oxidatiu de l'envelliment, alliberen el factor de transcripció; el qual és traslladat al nucli on regula la transcripció dels gens diana (Gloire 2006). La resposta inflamatòria implica l'activació de les MAPK, proteïnes quinases activades per mitògens. Aquestes responen enfront de canvis osmòtics, citoquines inflamatòries i altres agressions (Nebreda i Porras, 2000).

No trobem canvis significatius en les vies de senyalització NF- κ B i MAPK de rates velles respecte les rates joves. Sí que s'observa una tendència a augmentar a rates velles tan NF- κ B com de MEK i ERK. Principalment de les formes fosforilades, però també a la ERK total; encara que cap d'aquestes diferències són significatives. Aquests augments anirien a favor d'un augment d'inflamació a l'hipocamp de rates durant l'envelliment. I a més, sembla que el resveratrol redueix aquests increments, el que podria indicar una reducció de la neuroinflamació per tractament amb resveratrol. De totes formes, els resultats del present treball no mostren que les vies inflamatòries no es vegin afectades de manera important. Per aquest motiu, estudiarem l'efecte del resveratrol sobre el receptor SIRT1.

S'ha demostrat a altres estudis que el resveratrol en petites quantitats, activa i augmenta l'activitat de SIRT1 (Cascales, 2009). La SIRT-1 és una proteïna altament relacionada amb l'envelliment, i alguns estudis han demostrat que podria ser un punt diana pel tractament d'algunes malalties associades amb l'envelliment, com l'Alzheimer (Donoso, 2009). Les sirtuïnes pertanyen a un grup de desacetilases d'histones i, com diu el seu nom, tenen la funció d'eliminar grups acetil del residu de lisina. Això permet una descompactació de les regions de cromatina i dona lloc al procés transcripcional i per tant, a l'expressió gènica

(Guarente, 2007). D'aquesta forma també s'ha descrit que participa en l'allargament dels telòmers i protegeix la integritat del genoma durant la reprogramació cel·lular (De Bonis *et al.*, 2014). La SIRT1 en forma activa, regula la transcripció gènica i manté l'estabilitat del DNA. El resveratrol afecta a l'expressió de SIRT1, i s'ha descrit que incrementa la l'activitat d'aquest sistema (Guarente, 2007). Els resultats d'aquest estudi mostren que durant l'envelliment el nivell de SIRT1 es redueix molt significativament a l'hipocamp i el tractament amb resveratrol induïx un augment significatiu dels nivells de SIRT1 a aquests animals vells. Finalment, cal dir que veient els resultats obtinguts sobre els nivells de SIRT1 i tenint en compte que l'activació d'aquest receptor afecte principalment a la modificació per acetilació del NF- κ B, i això pot modular l'activitat d'aquesta proteïna (Salminen *et al.*,2008); seria molt interessant analitzar el nivells d'aquesta forma acetilada del NF- κ B per veure si estan alterats durant l'envelliment i si el tractament amb resveratrol també els afecta.

8. CONCLUSIONS

- a. L'envelliment de les rates causa una disminució en la memòria de treballs que es correlaciona amb un declivi dels sistemes monoaminèrgics a l'hipocamp. El tractament crònic amb resveratrol suposa una millora de la memòria de treball de rates velles.
- b. Que també es correlaciona amb un increment significatiu tant del sistema serotoninèrgic com al sistema noradrenèrgic a l'hipocamp d'aquests animals.
- c. No s'observa un canvi significatiu durant l'envelliment a les proteïnes analitzades relacionades amb les senyals neuroinflamatores a l'hipocamp de rata; en canvi, sí s'observa una reducció significativa als nivells de SIRT1.
- d. El tractament amb resveratrol produeix un augment dels nivells de SIRT1 que tornen a nivells propis de rates joves.
- e. La correlació entre els resultats a nivell cognitiu i bioquímic, mostren un efecte neuroprotector del resveratrol sobre la memòria de treball i sobre els sistemes monoaminèrgics de l'hipocamp i, suggereixen un mecanisme mediat per SIRT1.

9. REFERÈNCIES

- **Ajith, T., Padmajanair, G.** (2015). Mitochondrial pharmaceuticals: A new therapeutic strategy to ameliorate oxidative stress in Alzheimer's disease. *Curr Aging Sci*.
- **Barja, G.** (2005). Relación entre el estrés oxidativo mitocondrial y la velocidad del envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 40:243-9
- **Baur, J.A., Sinclair, D.A.** (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov*. 5, 493–506.
- **Baur, J.A.** (2010) Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. *Mechan of Ageing and Develop*. 131: 261–269
- **Beinke, G.; Ley, S.** (2004) Functions of NF-kB1 and NF-kB2 in immune cell biology. *Biochem*. 382: 393-409.
- **Bishop, S., Duncan, J., Lawrence, A.** (2004) State Anxiety Modulation of the Amygdala Response to Unattended Threat-Related Stimuli. *J Neurosci*. 24(46):10364-10368
- **Bishop, A., Guarente, L.** (2007) Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 447, 545-549
- **Bishop N.A., Tao L., Yankner B.A.** (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 464: 529–53
- **Cantó, C., Auwerx, J.** (2009) Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends Endocrinol Metab*. 20 (7): 325-331
- **Cascales, M.** (2009). Dieta hipocalórica y longevidad. *Anales Real Acad Nac de Farm*. 75 (2): 273-301
- **Clapp, N.K., Satterfield, L.C., Bowles, N.D.** (1979) Effects of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) on mortality in BALB/c mice. *J Gerontol*. 34: 497-501.
- **Cook, D., Kesner, R.P.** (1988) Caudate nucleus and memory for egocentric localization. *Behav. Neural Biol*. 49:332–343.
- **De Bonis, M., Ortega, S., Blasco, M.** (2014). SIRT1 Is Necessary for Proficient Telomere Elongation and Genomic Stability of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2(5): 690–706
- **Donoso, A.; Delgado, C.** (2009) Prevention and treatment of Alzheimer disease. *Rev. méd. Chil*. 137: 289-295
- **Enesco, HE., Verdone-Smith, C.** (1980) α -Tocopherol increases lifespan in the rotifer *Philodina*. *Exp Gerontol*.15:335-8.
- **Esteban S., Garau C., Aparicio S., Moranta D., Barceló P., Fernández-Tresguerres J.A., Rial R.,** (2010). Improving Effects of Long-Term Growth Hormone Treatment on Monoaminergic Neurotransmission and Related Behavioral Tests in Aged Rats. *Rejuvenation Research*. 1-11
- **Fearnley, J. M., Lees, A. J.** (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra 37 regional selectivity. *Brain*. 114: 2283-2301
- **Finkel, T.** (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol*. 15:247–254.
- **Fisher, W., Chen, K.S., Gage, F.H., Bjorklund, A.** (1992) Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rat during aging. *Neurobiol Aging* 13: 9-23.
- **Forster M.J., Dubey A., Dawson K.M., Stutts W.A., Lal H., Sohal R.S.** (1994) Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:4765-4769.
- **Frei, B.; Higdon, J.V.** (2003) Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr*. 133 (10): 3275-3284.
- **Friedman P., Kappelman A., Kaufman S.** (1972). Partial purification and characterization of tryptophan hydroxylase from rabbit hindbrain. *J Biol Chem*. 247:4165-4273.
- **García, F., Pedraza, C., Navarro, J.** (2005) Implicación de la dopamina en los procesos cognitivos del aprendizaje y la memoria. *Psic.Bio*. 12(6)
- **Gerschman, R.** (1962). Man's dependence on the earthly atmosphere. Proc 1st Symp Submarine and Space Medicine. *MacMillan: New York*. P. 475.
- **Gilgun-Sherki, Y.; Melamed, E.; Offen, D.** (2004) The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. *J Neurol*. 251: 261-268
- **Gilgun-Sherki, Y.; Rosenbaun, Z.; Melamed, E.; Offen, D.** (2002) Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol reviews*. 54 (2): 2171-284
- **Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J.** (2006) NF-kB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol*. 72: 1493-1505
- **Gonzalez-Burgos, I., Feria-Velasco, A.** (2008). Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res*. 172:603-623
- **Guarente, L.** (2007) Sirtuins aging and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant. Biol*. 72: 483-488
- **Guinzberg, R., Ortega, M., Díaz, A., Cobos, M., Huerta, M.** (2005) Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Rev cien y techno América*. 30(12): 728-734
- **Halliwell, B.** (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 97 (6): 1634–1658.
- **Harman, D.** (1956) A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 11:298-300.
- **Harman, D.** (1972) The biologic clock: The mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc*. 20:145–147.
- **Harman, D.** (1993) Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Aging*. 3:60-80

- **Hayflick, L.** (1985). Theories of biological aging. *Exp Gerontol.* 20:145-59.
- **Hayden, S.; Ghosh, S.** (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18: 2195-2224
- **Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., Guarente, L.,** (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795–800.
- **Ingram, D.K., Zhu, M., Mamczarz, J., Zou, S., Lane, M.A., Roth, G.S., deCabo, R.,** (2006) Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell.* 5, 97–108.
- **Joseph, J.A., Dalton, T.K., Hunt, W.A.** (1988). Age-related decrements in the muscarinic enhancement of K⁺-evoked release of endogenous striatal dopamine: an indicator of altered cholinergic-dopaminergic reciprocal inhibitory control in senescence. *Brain Res.* 454:140-148
- **Kohn, RR.** (1971) Effect of antioxidants on life-span of C57BL mice. *J Gerontol.* 26:378-80.
- **Korc, I.; Bidegain, M.; Martell, M.** (1995) Radicales libres. *Rev Med.* 11: 121-135
- **Kumar, H., Lim, H-W., More, S.V., Kim, B-W., Koppula, S., Kim, I.S, Choi, D-K.** (2012) The Role of Free Radicals in the Aging Brain and Parkinson's Disease: Convergence and Parallelism. *Intern J of Molec Sci.* 13:10478-10504
- **Landfield, P.W., Eldridge, J.C.** (1994). Evolving aspects of the glucocorticoid hypothesis of brain aging: hormonal modulation of neuronal calcium homeostasis. *Neurobiol Aging.* 15:579-588.
- **Ledvina, M., Hodánová, M.** (1980). The effect of simultaneous administration of tocopherol and sunflower oil on the life-span of female mice. *Exp Gerontol.* 15:67-71.
- **Lee, E., Oh, E., Joohyun, L., Donggeun, S., Juneyoung, L.**(2004) Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicol Sci.* 81:121-32.
- **Lee, E.S., Lee, H.E., Shin, J.Y., Yoon, S., Moon, J.O..** (2003) The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *J Pharm. Pharmacol.* 55:1169–1174.
- **Leng, Y., Zhong, S.** (2015) The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling components in the fungal development, stress response and virulence of the fungal cereal pathogen *bipolaris sorokiniana*. *Plos One.*10(5): 0128291
- **Lin, M.T., Beal, M.F.** (2006). Alzheimer's APP mangles mitochondria. *Nat. Med.* 12:1241–1243.
- **Lin, S.J., Ford, E., Haigis, M., Liszt, G., Guarente, L.,** (2004). Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev.* 18, 12–16.
- **Liochev, S.I.** (2013) Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic. Biol. Med.* 60:1-4
- **Felgines, C., Texier, O., Morand, C., Manach, C., Scalbert, A., Régerat, F., Rémésy, C.** (2000) Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279(6):G1148-54.
- **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L.** (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79:727– 47.
- **Mandavilli, B.S., Santos, J.H., Van Houten, B.** (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat. Res.* 509: 127–151.
- **McCay, C.M., Crowell, M.F., Maynard, L.A.,** (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J. Nutr.* 10, 63–79.
- **Medvedev, Z.A.** (1990). An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev.*65:375-98.
- **Meek, J., Bertilsson, L., Cheney, D., Zsilla, G., Costa, E.** (1977). Aging-induced changes in acetylcholine and serotonin content of discrete brain nuclei. *J Gerontol.* 32:129-131
- **Miller, J.; Brzezinska-Slebozinska, E.; Madsen, F.** (1993) Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sc,* 76 (9): 2812-23
- **Minot, C.S.** (1097). The problem of age, growth and age. *Pop Sci Monthly.* 71:509-27.
- **Morago, I.** (2005) Psicología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev. Neurol.* 40 (5): 289-297
- **Moranta, D.** (2005) Efectos conductuales y modulación de la síntesis de monoaminas y de la vía de quinasas mitógenicas en cerebro de rata tras tratamientos con cannabinoides y etanol. *Tesis Doctoral.*
- **Nebreda, A., Porras, A.** (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci.* 25 (6): 257-260
- **Orgel, LE.** (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 49:517-21.
- **Park, D.C. i Reuter-Lorenz, P.** (2009) The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol.* 60:173-196
- **Pearl, R.** (1928). The rate of living. *Univ of London Press.* 50
- **Pearson, J.; Baur, A. Lewis, K.; Peshkin, L. et al.** (2008) Resveratrol delays Age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell metabolism.* 8(2): 157-168
- **Porta, E.A., Joun, N.S., Nitta, R.T.** (1980) Effects of the type of dietary fat at two levels of vitamin E in Wistar male rats during development and aging. I. Lifespan, serum biochemical parameters and pathological changes. *Mech Ageing Dev.* 13:1-39
- **Reese, T.; Karnovsky, M.** (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J of cell bio.* 34 (1): 207-217
- **Ritz, B.W., Aktan, I., Nogusa, S., Gardner, E.M.,** (2008) Energy restriction impairs natural killer cell function and increases the severity of influenza infection in young adult male C57BL/6 mice. *J. Nutr.* 138, 2269–2275

- **Salech, M.; Jara, R.; Michea, L.** (2012) Cambios fisiológicos asociados al envejecimiento. *Rev Med Clin de Condes.* 23 (1): 19-29
- **Salminen, A., Kauppinen, A., Suuronen, T., Kaarnirante, K.** (2008) SIRT1 longevity factor suppresses NF- κ B –driven immune responses: regulation of aging via NF- κ B acetylation? *Bioessays.* 29: 939-942
- **Smoliga, J.M., Baur, J.A., Hausenblas, H.A.** (2011) Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res* 55(8):1129-41.
- **Sparks D., Markesbery W. and Slevin J.** (1985). Age-associated alteration of serotonergic synaptic. *Neurobiol Aging.* 6:213-217.
- **Spencer, J., Vafeiadou, K., Williams, R., Vauzour, D.** (2012) Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Molec Asp of Med.* 33: 83-97
- **Staats, A.; Colby, D.** (1987) Regional differences in microsomal lipid peroxidation and antioxidant levels in the guinea pig adrenal cortex. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 28: 637-642.
- **Strehler ,B.L., Mark, D.D., Mildvan, A.S.** (1959). GEE MV: Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium. *J Gerontol.* 14:430-439
- **Strüder, H.K., Weicker, H.** (2001). Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance. Part I. *Int J Sports Med.* 22:467–481
- **Tarragon, E., Lopez, L., Ros-Bernal, F., Yuste, J.E., Ortiz-Cullera, V., Martin, E., Schenker, E., Aujard, F., Bordet, R., Richardson, J.C., Herrero, M.T.** (2012). The Radial Arm Maze (RAM) for the Evaluation of Working and Reference Memory Deficits in the Diurnal Rodent *Octodon degus.* *Proceedings of Measuring Behavior.* P98-100.
- **Timiras, P.S., Hudson, D.B., Miller, C.** (1982). Developing and aging brain serotonergic systems. In: The aging brain: cellular and molecular mechanisms of aging in the central nervous system. *Raven Press, New York,* 20:173-184.
- **Tyihák, E., Király-Véghely, Z., Móricz, A.M.** (2011) Multiple beneficial effects of resveratrol and their chemical-biochemical basis. *Nat Prod Commun.* 6(5):631-8.
- **Urso, M., Clarkson, P.M.** (2003) Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol.* 189:41-54.
- **Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160:1–40.
- **Vasken, K., Hiren, M., Stanley, R., Jagadeesh, R.** (2013) Aging is associated with altered inflammatory, arachidonic acid cascade, and synaptic markers, influenced by epigenetic modifications, in the human frontal cortex. *J Neurochem.* 125 (1): 63-73
- **Venero, J.L., Machado, A., Cano, J.** (1991) Turnover of dopamine and serotonin and their metabolites in the striatum of aged rats. *J Neurochem* 56: 1940-1948.
- **Viña, J., Borrás, C., Miquel, J.,** (2007). Theories of ageing. *IUBMB Life.* 59:249-254
- **Zorov, D.** (1996). Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: a strategy of how to fight these. *Biochim Biophys Acta.* 1275: 10-15