



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memoria del Trabajo de Final de Grado

Análisis del efecto neuroprotector del resveratrol durante el envejecimiento

Laura Belmonte Noguera

Grado de Biología

Año académico 2014-15

DNI del alumno: 47250788W

Trabajo tutelado por David Moranta Mesquida

Departamento de Biología



Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación

Palabras clave del trabajo:

Resveratrol, rata, estrés oxidativo, Sirtuínas, NF- κ B, envejecimiento, memoria, deterioro cognitivo, monoaminas

INDICE

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 ENVEJECIMIENTO A NIVEL POBLACIONAL.....	5
1.2 TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO.....	6
1.2.1 Teoría del estrés oxidativo.....	6
1.3 EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO A NIVEL CEREBRAL.....	8
1.4 ANTIOXIDANTES COMO TERAPIA ANTIENVEJECIMIENTO.....	9
1.4.1 Polifenoles.....	9
a. Resveratrol.....	10
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	13
3.2 FÁRMACOS Y TRATAMIENTO.....	13
3.3 PRUEBA COMPORTAMENTAL DE RADIAL MAZE.....	13
3.4 DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE MONOAMINAS.....	14
3.5 WESTERN BLOT.....	16
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON RESVERATROL SOBRE LA MEMORIA ESPACIAL.....	22
5.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON RESVERATROL SOBRE LA SÍNTESIS DE MONOAMINAS.....	22
5.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON RESVERATROL SOBRE LOS NIVELES DE SIRT-1 Y NF-κB.....	25
6. DISCUSIÓN.....	27
7. CONCLUSIONES.....	29
8. REFERENCIAS.....	30

RESUMEN

Un aumento en la esperanza de vida en la población humana se ha visto que está relacionado con el deterioro cognitivo así como la aparición de enfermedades neurodegenerativas características del envejecimiento. Compuestos polifenólicos como el resveratrol, presente en frutas y verduras, retrasa el proceso de envejecimiento a través de la capacidad de reducir el estrés oxidativo. Se ha demostrado que el resveratrol actúa como mimético de la RC activando proteínas histonas deacetilasas (Sirtuínas). Así, el presente estudio tiene como objetivo analizar en rata el efecto protector de la administración crónica del resveratrol sobre el deterioro cognitivo y sobre el declive en los sistemas monoaminérgicos que normalmente ocurre durante el envejecimiento, y analizar cómo se ven alterados los niveles de proteínas implicados en los efectos moleculares del resveratrol. Para ello, nos centraremos en las regiones del hipocampo y el estriado, que son dos regiones cerebrales importantemente implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje. El procedimiento se basa en el análisis a nivel cognitivo, observando la memoria de trabajo a través del test *radial maze*, la cuantificación de monoaminas mediante la técnica HPLC y los niveles de las proteínas SIRT1 y NF- κ B mediante *western blot*. Los resultados obtenidos corroboran la disminución de los niveles de 5-HT, DA y NA durante el envejecimiento y, se ha visto que el tratamiento crónico con resveratrol aumenta la actividad de las enzimas tirosina hidroxilasa y triptófano hidroxilasa, mejorando el sistema monoaminérgico. Estos resultados se correlacionan con la prueba cognitiva, aumentando la memoria de trabajo en ratas tratadas. A nivel molecular, se observa un incremento de los niveles de SIRT1 y una tendencia a disminuir los niveles de NF- κ B durante el tratamiento en ambas regiones cerebrales estudiadas. Así, este estudio confirma el efecto protector durante el proceso de envejecimiento del resveratrol sobre la memoria que se correlaciona con un efecto protector sobre los sistemas monoaminérgicos en hipocampo y estriado. Además, los resultados parecen indicar que este efecto protector es debido a un mecanismo dependiente de SIRT1.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Envejecimiento a nivel poblacional

El envejecimiento de cada persona está condicionado por los efectos, generalmente nocivos, que el paso del tiempo ejerce sobre las moléculas, células, órganos y sistemas que conforman nuestro organismo (Rao & Mattson, 2001). Hace un siglo la esperanza de vida en los países desarrollados era de aproximadamente cuarenta años, actualmente está situada en torno a los 80 años. La proporción de población de 65 y más años en los países desarrollados es de un 15% y en los países en vías de desarrollo esta cifra alcanza ya valores superiores al 5% de la población total (Inés, 2009). Si al incremento de la longevidad unimos el hecho de que la población demográficamente “vieja” (de 65 y más años) está incrementando su porcentaje sobre la población total debido a la caída de la natalidad y al aumento de la esperanza de vida, veremos que este fenómeno llamado “transición demográfica” tiene como contrapartida biomédica el incremento de enfermedades y dolencias de tipo degenerativo a las cuales debe enfrentarse nuestro organismo, en general y el cerebro en particular, en las etapas finales del ciclo vital (Omran, 1983) (Figura 1).

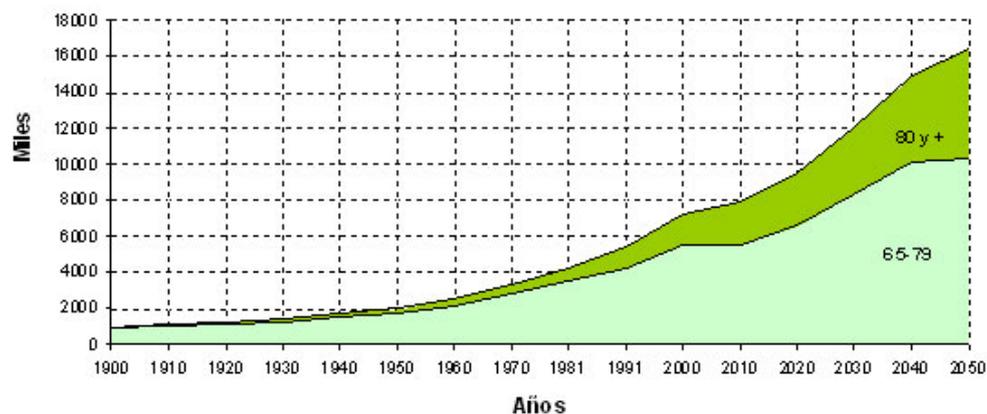


Figura 1. Evolución de la población mayor (65 y más años). España, 1900 – 2050 (miles). Fuente: INE: INEBASE *Cifras de población. Población según sexo y edad desde 1900 hasta 2001*. INE, 2004. INE: INEBASE. *Proyecciones de la población calculadas a partir del Censo de Población de 2001*. INE, 2004

El deterioro cognitivo se perfila como una de las mayores amenazas para la salud en el siglo XXI. A medida que la esperanza de vida de la población ha aumentado, también lo ha hecho a su vez el predominio del deterioro cognitivo, debido en gran parte en forma de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, el desarrollo de estas patologías relacionadas con la edad debe interpretarse y estudiarse en el contexto de la biología molecular del proceso del envejecimiento (Bishop *et al.*, 2010).

1.2 Teorías del envejecimiento

El envejecimiento es un proceso complejo y multifactorial (Mandavilli *et al.*, 2002) el cual tiene carácter intrínseco, progresivo y perjudicial caracterizado por la disminución de la función fisiológica, causando así la pérdida de mantener el medio interno del individuo (homeostasis) [Viña *et al.*, 2007].

Hoy en día existen muchas teorías sobre el envejecimiento y según Mevdevev (1990), eran aproximadamente 300 e intentaban explicar así, cuáles eran las causas del envejecimiento (Viña *et al.*, 2007). Entre tantas teorías destacan la teoría de Minot (1907), que considera el envejecimiento celular y la muerte de los animales metazoos el resultado de la diferenciación celular (Miquel *et al.*, 1979); la del error catastrófico de Orgel, la precisión de la síntesis de proteínas se deterioraría en ausencia de selección celular (Orgel, 1963); la teoría del límite mitótico de Hayflick, la cual indica que la pérdida de capacidad mitótica supondría el envejecimiento celular (Hayflick *et al.*, 1961). Actualmente la más aceptada es la teoría de los radicales libres, primero propuesto por Harman, postulando la hipótesis de que los radicales libres producidos durante la respiración aeróbica causan daño oxidativo acumulativo a las proteínas, lípidos y ADN; proponiendo a su vez, que el ADN mitocondrial (ADNmt) es una de las diana principales para el ataque de ROS (Mandavilli *et al.* 2002).

1.2.1 Teoría del estrés oxidativo

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, hasta el punto que en las células que lo utilizan para su metabolismo, es el principal responsable de la producción de radicales libres (Avello & Suwalsky, 2006). El concepto de radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Finkel & Holbrook, 2000). En los sistemas biológicos, el término radicales libres se refiere sobre todo a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y se centra principalmente en el oxígeno. Las principales ROS son el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo ($OH\cdot$) (Figura 2). Además de las ROS, también se encuentran las especies reactivas de nitrógeno (RNS), incluyendo el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (NO_3) [Kumar *et al.*, 2012].

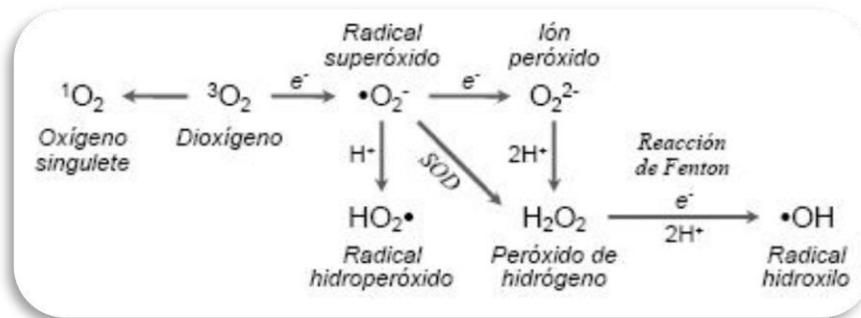


Figura 2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la reducción de oxígeno molecular (O_2). Fuente: Imlay, 2008; Gill y Tuteja, 2010.

Las mitocondrias son una importante fuente de radicales libres existiendo así, una teoría que propone que el envejecimiento es consecuencia directa de la acumulación de mtDNA dañado por las ROS durante la fosforilación oxidativa (Harman, 1972). Por lo tanto, la inhibición de un complejo mitocondrial dificultará la cadena respiratoria mitocondrial, provocando una reducción de oxígeno incompleta y generando de ese modo, anión superóxido (O_2^-) [Kushnareva *et al.*, 2002].

Los radicales libres surgen como productos intermedios en muchos procesos metabólicos, generándose como parte de un mecanismo de defensa celular contra patógenos invadidos. Por otro lado, regulan varios procesos como el metabolismo de la glucosa, el crecimiento celular, y la proliferación entre otros, o la activación de diferentes factores de transcripción (Kumar *et al.*, 2012).

La teoría del estrés oxidativo propone que los radicales libres derivados del oxígeno son responsables de los daños asociados con el envejecimiento. Lo que ocurre es que los sistemas antioxidantes no son capaces de contrarrestar todos los radicales libres generados continuamente durante la vida de la célula. Como resultado, se produce el daño oxidativo en la célula y como consecuencia, en los tejidos. Se ha podido observar como los animales viejos muestran un mayor índice de oxidación que los jóvenes y de hecho, se acumulan proteínas, ADN y lípidos oxidados, debido a una mayor tasa de producción de radicales libres (Viña *et al.*, 2007). También se ha visto como los genes que median las respuestas al estrés oxidativo y reparación de daños en el ADN constituyen la clase más grande de genes regulados positivamente en el envejecimiento de la corteza prefrontal humana (Bishop *et al.*, 2010). En el organismo existe un sistema de protección antioxidante formado por enzimas y compuestos de bajo peso molecular, como por ejemplo la enzima catalasa (CAT) [Céspedes *et al.*, 1996].

1.3 Efectos del envejecimiento a nivel cerebral

El envejecimiento se acompaña de cambios estructurales y neurofisiológicos en el cerebro, junto con diversos grados en el deterioro cognitivo (Bishop *et al.*, 2010). Estos cambios se pueden manifestar en alteraciones cognitivas y motoras. Entre las alteraciones cognitivas se incluye la disminución de la velocidad de procesamiento, capacidad de memoria de trabajo y memoria a largo plazo, no viéndose alterada ni la memoria implícita ni el almacenamiento de conocimientos (Park D.C. & Reuter-Lorenz P., 2009). En cambio, las alteraciones motoras se caracterizan por la pérdida del equilibrio, coordinación e integración sensorial motriz (Joseph *et al.*, 1988).

El cerebro es un órgano particularmente vulnerable al estrés oxidativo (Figura 3). Esto se debe a que presenta una elevada tasa de actividad (requiere aproximadamente el 20% del total de oxígeno usado en seres humanos) pero, en proporción, no tiene más antioxidantes que otros órganos. Además, contiene grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, que son altamente susceptibles a la peroxidación, y Fe y Ascorbato, los cuales son importantes para la peroxidación lipídica (Floyd y Hensley, 2002; Mariani *et al.*, 2005).

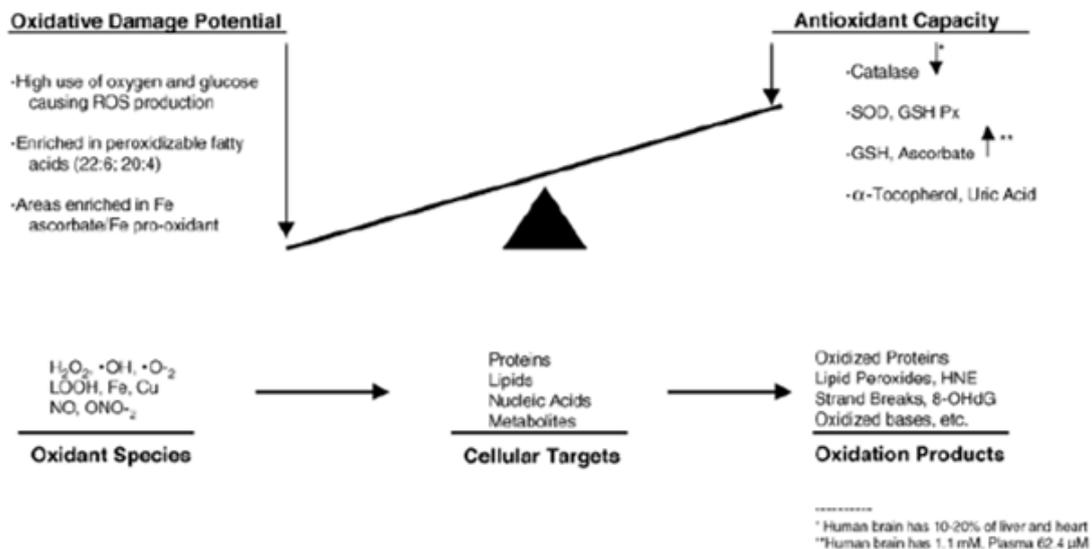


Figura 3. Riesgo de daño oxidativo en el cerebro. Fuente: Floyd y Hensley, 2002

Esta teoría sugiere una intervención terapéutica: la administración de antioxidantes como el resveratrol, los cuales podrían retrasar el daño asociado a la edad (Viña *et al.*, 2007). Si las especies reactivas de oxígeno son la principal causa de los procesos de envejecimiento, los antioxidantes pueden reducir sus niveles, ralentizando los procesos de envejecimiento y aumentando la calidad de vida (Lee *et al.*, 2004).

1.4 Antioxidantes como terapia antienvjecimiento

Los antioxidantes son moléculas exógenas o endógenas que actúan en contra de cualquier forma de estrés oxidativo y sus efectos nocivos asociados en el sistema celular (Lepoivre *et al.*, 1994). Los mecanismos de defensa antioxidantes incluyen: eliminación de O₂, barrido de especies reactivas de oxígeno / nitrógeno o sus precursores, inhibición de la formación de ROS, unión de iones metálicos necesarios para la catálisis de la generación de ROS y regulación de las defensas antioxidantes endógenas (Yossi *et al.*, 2001). La eficacia protectora de antioxidantes depende del tipo de ROS que se genera, el lugar de generación (barreras corporales tales como la barrera hematoencefálica) y la gravedad de los daños. La barrera hematoencefálica es una barrera endotelial presente en los capilares a través del cerebro la cual reduce la permeabilidad de la mayoría de los antioxidantes. El cerebro necesita de esta barrera que separa de la sangre, para permitir el control riguroso del microambiente del cerebro que es necesario para la señalización neuronal compleja (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Reese & Karnovsky, 1967). La defensa de antioxidantes enzimática incluye la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa y superóxido dismutasa (SOD) [Vijay *et al.*, 2011]. Una de las enzimas principales es la catalasa, la cual interviene en la protección y el mantenimiento del balance oxidante / antioxidante (Céspedes *et al.*, 1996). La sobreexpresión dirigida de esta enzima en la mitocondria, es suficiente para extender la vida útil del ratón (Schriner *et al.*, 2005).

En nuestra dieta diaria ingerimos millones de antioxidantes naturales en forma de flavonoides y compuestos fenólicos, ácido lipoico (ácido tióctico), ubiquinona y idebenona, caroteno y la vitamina C como suplementos metabólicos manteniendo así, nuestros órganos vitales libres de especies reactivas de oxígeno (Yossi *et al.*, 2001). Los antioxidantes dietéticos pueden suprimir muchos cambios en la expresión de genes relacionados con la edad en el cerebro del ratón, pueden reducir el deterioro cognitivo y prevenir el daño oxidativo en el cerebro en el envejecimiento de las ratas (Bishop *et al.*, 2010).

1.4.1 Polifenoles

Los polifenoles son un tipo de compuestos fenólicos antioxidantes los cuales son de gran interés debido a su propiedad antioxidante, su abundancia en la dieta y su probable función en la prevención de diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como son el cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Manach *et al.*, 2004). Los polifenoles atenúan el estrés oxidativo a través de mecanismos que incluyen la transcripción de genes que codifican para las proteínas anti-oxidantes (Kaspar *et al.*, 2009). La investigación básica en una variedad de modelos animales ha demostrado que los

polifenoles ejercen una diversidad de beneficios para la salud mediante la activación de vías intracelulares, muchos de los cuales son los mismos que los activados por la restricción calórica (RC) (Catalgol *et al.*, 2012; Wood *et al.*, 2004).

Una dieta rica en polifenoles puede proteger al cerebro de la neurodegeneración al favorecer un envejecimiento saludable a través de diversos mecanismos (Frei & Higdon, 2003; Quideau *et al.*, 2011; Spencer, 2010). Se ha descubierto que el consumo moderado de vino reduce el riesgo de desarrollar demencia y que el papel protector no es causado por el contenido de éste en alcohol (Truelsen *et al.*, 2002), sino que son los polifenoles de la semilla de la uva los que pueden reducir el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas.

Dentro de los polifenoles, los flavonoides son el grupo con una mayor actividad antioxidante (Lee *et al.*, 2004), pero también podemos destacar otro grupo como son los estilbenos. Un ejemplo de estos es el resveratrol, el cual presenta una elevada actividad antioxidante actuando de manera beneficiosa sobre las enfermedades neurodegenerativas, reduciendo así, el envejecimiento.

a. Resveratrol

El Resveratrol (5-(E)-2-(4-hydroxyphenyl) ethenyl] benzene-1,3-diol), es un polifenol antioxidante producido por la uva roja, moras, cacahuets, el ruibarbo y presente en el vino tinto (Figura 4). Estas plantas presentan fitoalexinas, las cuales son sustancias que se sintetizan en respuesta a restricciones o estrés de diferente naturaleza (Cheynier *et al.*, 1998). Los efectos beneficiosos del resveratrol incluyen: el aumento de la longevidad, mejora de la enfermedad cardiovascular, mejora de la sensibilidad a la insulina y reducción del envejecimiento relacionado con el declive neurocognitivo (Smoliga *et al.*, 2013).

El tratamiento con resveratrol disminuye los marcadores de daño por estrés oxidativo en modelos *in vivo* e *in vitro* de hipoxia-isquemia, en los cuales se produce gran cantidad de radicales libres (Cristòfol *et al.*, 2012). Se ha visto que la administración oral de trans-resveratrol en ratas durante 28 días induce un incremento de la masa cerebral probablemente debido a su efecto neurotrófico (Smoliga *et al.*, 2011).

Por otro lado, induce PGC-1 α , un regulador importante del estrés oxidativo y del metabolismo mitocondrial (Mudò *et al.*, 2012). El tratamiento con resveratrol también aumenta la expresión y translocación nuclear de FOXO3 en células dopaminérgicas, siendo los genes FOXO la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo (Wu *et al.*, 2013).

Se ha podido comprobar que el estrés oxidativo ejerce un papel muy importante en el envejecimiento y el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. A partir de aquí, tenemos que tener en cuenta también el concepto de restricción calórica (RC), ya que la

función del resveratrol es la de imitar los efectos beneficiosos de la RC. La RC se trata de una simple reducción de la ingesta calórica en ausencia de malnutrición. A ésta, se le atribuyen efectos beneficiosos como son el retraso o la prevención del cáncer, enfermedades del corazón, enfermedades neurodegenerativas, la sarcopenia y la diabetes (Baur, 2010). El efecto potencial de la RC es enorme en comparación con otros factores que pueden influir en la vida útil y podrían mejorar la calidad de vida de muchas personas (Lefevre *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2006). Se ha descrito que estos efectos beneficiosos de la RC están mediados en gran medida por Sirtuínas (SIRT) en mamíferos (homóloga de la proteína Sir2 de levadura) [Lin *et al.*, 2000]. Y que el resveratrol, aparte de reducir los efectos del estrés oxidativo y la formación de especies reactivas de oxígeno, también prolonga la vida útil de manera dependiente de Sirtuínas (Howitz *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2004). La actividad enzimática de todas las Sirtuínas depende del co-sustrato de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) [Imai *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000]. Dado que la forma reducida del co-sustrato (NADPH) es un inhibidor de las Sirtuínas, se sugirió que un aumento en relación de NAD^+ / NADPH, impulsado por un cambio en el metabolismo oxidativo, podría aumentar la actividad de las Sirtuínas y como consecuencia, disminuir el estrés oxidativo y aumentar así la vida útil (Lin *et al.*, 2004). Por lo tanto, para que el resveratrol actúe como un mimético de la RC tiene que haber en ambos caso, la activación de SIRT1 (Baur, 2010).



Figura 4. Alimentos en la dieta que presentan Resveratrol

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años se ha avanzado en el estudio de las propiedades beneficiosas de los polifenoles. Diversos estudios demuestran un efecto favorable de la administración crónica de antioxidantes sobre el envejecimiento cerebral de las ratas. En concreto, el resveratrol se ha visto que reduce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) disminuyendo los efectos del estrés oxidativo (Howitz *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2004); pero también produce efectos mediados por SIRT1. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende analizar a nivel molecular el mecanismo de actuación del tratamiento crónico con resveratrol, después de haber comprobado sus mejoras en el retraso del deterioro cognitivo mediante pruebas comportamentales y su correlación con un retraso del deterioro monoaminérgico cerebral que ocurre durante el envejecimiento.

Objetivos

1. Revisión del conocimiento actual sobre el tema. Principalmente relacionado con el deterioro cerebral, bioquímico y cognitivo que ocurre durante el envejecimiento; y el efecto beneficioso de los antioxidantes.
2. Análisis de datos procedentes de experimentos realizados en el laboratorio de Neurofisiología. Familiarizarse con las técnicas de análisis comportamentales, análisis de monoaminas por HPLC y de análisis de proteínas por western-blot.
3. Interpretación de los resultados obtenidos y correlación entre los datos bioquímicos y las pruebas cognitivas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho Wistar jóvenes (3 meses; n=9) y viejas (20 meses; n=10) libres de patógenos (SPF) (Charles River, Barcelona, España). Los animales fueron criados en el estabulario de la Universidad de las Islas Baleares (Tipo II, registro nºES70400000540 en la *Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Comunidad Autónoma de las Islas Baleares*), donde se encuentran las condiciones necesarias para trabajar con animales SPF. Las ratas se colocaron en jaulas individuales de metacrilato (Panlab, Barcelona) con virutas de madera como material de nidificación (Ultrasorb, Barcelona) y se dispusieron en una cámara con condiciones ambientales controladas: temperatura (20-22°C), humedad (65-70%) y ciclos de 12h de luz/oscuridad. Las ratas tenían libre acceso al agua y a una dieta estándar (Panlab A04).

Los animales se trataron en concordancia a la Convención Europea para la Protección de Animales Vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos (Directiva 86/609/EEC), siendo los protocolos aprobados por la *Comisión Bioética de la Universidad de las Islas Baleares*.

3.2 Fármacos y tratamiento

Los fármacos utilizados en este trabajo han sido: trans-resveratrol, aceite de maíz y NSD 1015. Se administró un tratamiento crónico (28 días) de resveratrol por vía intraperitoneal (20mg/kg), suspendido en aceite de maíz. A las ratas control, se les administraron aceite de maíz vía intraperitoneal (1mg/kg) durante el mismo tiempo que las otras ratas estaban siendo tratadas con resveratrol. La administración del resveratrol se aplicó en las primeras horas del día y una hora antes de realizar la prueba comportamental, ya que es el tiempo que tarda en hacer efecto en el animal. Después del tratamiento crónico, las ratas recibieron NSD 1015 (100 mg/kg) y pasados 30 min de la administración, fueron sacrificadas mediante la decapitación. Todos los compuestos fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich.

3.3 Prueba comportamental de *radial maze*

El *Radial maze* es una prueba de comportamiento que se utiliza para medir el aprendizaje espacial y la memoria. El laberinto radial consta de 8 brazos equidistantes (57 x 11 cm) alrededor de una plataforma octogonal central (32 cm de diámetro), junto con unas puertas automáticas (20 cm de alto) al principio de cada uno de los brazos y en cuyos extremos, se

ubican unos pocillos en los que se coloca una pequeña cantidad de comida (Tarragon *et al.*, 2012) (Figura 5). Para realizar esta prueba, los animales fueron sometidos a un ayuno de 48 horas antes de realizar el test, únicamente con libre acceso al agua para que así tuviesen una motivación a la hora de ir a buscar la comida al final de cada brazo.

Al inicio de la prueba, se coloca a la rata en la plataforma central y a continuación, se van anotando los brazos visitados, y el tiempo transcurrido. La prueba ha finalizado cuando la rata ha visitado todos los brazos o cuando ha transcurrido un tiempo máximo de 20 min. Antes de realizar el test al siguiente animal, se debe limpiar el laberinto con etanol 95% para eliminar posibles olores de la rata anterior y para que no haya restos de orina y heces.

Las pruebas realizadas se grabaron con una cámara de video la cual está conectada a un software específico para el análisis de datos de esta prueba (Smart v2.5; Panlab, S.L., Barcelona, España). Los parámetros que nos interesan son: el tiempo necesario para completar el laberinto en un máximo de 20 min y el número de errores cometidos durante el test (suma de brazos no visitados y brazos revisitados).

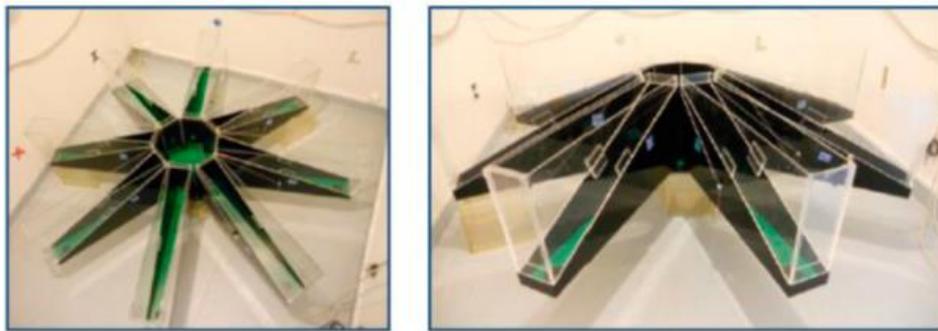


Figura 5. Dispositivo del *Radial maze*

3.4 Determinación cromatográfica de la síntesis de monoaminas, precursores y metabolitos in vivo

La Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna cuyo objetivo es la separación de los distintos componentes de una sustancia, basándose en los tiempos de retención que experimentan cada uno de sus componentes al pasar a través de la fase estacionaria (columna), cuando la muestra es eluída por una fase móvil líquida (eluyente). A partir de este tiempo de retención, es posible identificar los diferentes compuestos de interés en la muestra a analizar. El detector electroquímico proporciona un potencial de oxidación suficiente para oxidar las sustancias a analizar (Figura 6).

Este protocolo permite identificar al mismo tiempo en una muestra concreta: noradrenalina (NA), dihidroxifenilalanina (DOPA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), dopamina (DA), 5-

hidroxitriptófano (5-HTP), ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA), ácido homovanílico (HVA) y serotonina (5-HT).



Figura 6. Cromatografía líquida de alta eficacia/resolución/presión (HPLC)

3.4.1 Disección y preparación de muestras

Para determinar la síntesis in vivo de 5-HT, DA y NA, se determinó la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de DA y NA; y la actividad de la triptófano hidroxilasa (TPH), enzima limitante en la síntesis de 5-HT. Después de los tratamientos crónicos, todos los animales recibieron una inyección de NSD 1015 (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (100 mg/kg) 30 min antes de su sacrificio, para testar la actividad de las enzimas limitantes en la síntesis de monoaminas. El NSD 1015 es un inhibidor del enzima descarboxilasa la cual se encarga de la síntesis de DA / NA y 5-HT y por lo tanto, mediante esta técnica se puede cuantificar las cantidades de DOPA y 5-HTP y a su vez, de manera indirecta, la tasa de síntesis de DA / NA y 5-HT (Figura 7). También podremos cuantificar los niveles de los metabolitos de degradación de la DA (HVA), el cual nos informará sobre el metabolismo de la DA en el estriado y de la 5-HT (5-HIAA), el cual nos informará sobre el metabolismo de la 5-HT tanto en el hipocampo como en el estriado.

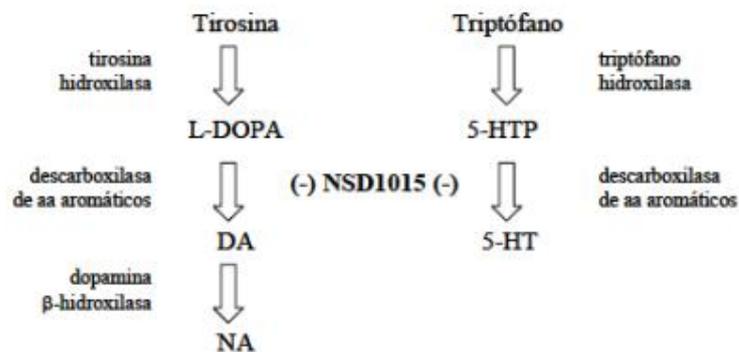


Figura 7. Esquema del efecto de NSD 1015 sobre las vías de síntesis de monoaminas. (Moranta, 2005)

Las regiones del cerebro a analizar son el hipocampo y el estriado, donde ambas tienen abundancia de 5-HT; y en el caso de la acumulación de DOPA, el estriado indica síntesis de DA (Sastre-Coll *et al.*, 2001), y el hipocampo, síntesis de NA (Sastre-Coll *et al.*, 2002).

3.4.2 Análisis cromatográfico

Tras decapitar las ratas, se diseccionaron las distintas regiones del cerebro y se extrajeron el hipocampo y el estriado. Las regiones fueron pesadas y homogeneizadas con homogeneizador Ultraturax en 1 ml de buffer de homogeneización en frío, durante 30 segundos. A continuación las muestras se centrifugaron a 40000 g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue filtrado (filtros de teflón de 0.45 µm, Spartan-3) y congelado a -80°C hasta el momento de análisis.

Se inyectaron alícuotas de 30 µl de los sobrenadantes de las muestras cerebrales del hipocampo y estriado. Para separar los compuestos anteriormente citados se utilizó una columna de tipo Spherisorb S3 ODS1 acoplada a una precolumna Tracer ODS2 C18 y mantenida a 37°C. La fase móvil fue impulsada a un flujo de 0,8 ml/min por una bomba de doble pistón tipo Waters M-510. Los compuestos fueron detectados electroquímicamente, manteniendo un potencial aplicado de +0,75 V frente al electrodo de referencia. La corriente producida fue captada por un computador PC gracias al software Empower Pro de Waters®. Las concentraciones de los diferentes compuestos, fueron calculadas interpolando la altura del pico correspondiente en la curva estándar realizada diariamente para cada compuesto, con patrones externos. Los valores de los compuestos se expresaron en picogramos por miligramo de tejido húmedo (pg/mg).

3.5 WESTERN BLOT

3.5.1 Preparación de la muestra

Para la detección y cuantificación de las proteínas SIRT-1 y NF-κB se procesaron el hipocampo y el estriado de animales sometidos a distintos tratamientos.

Se homogeneizaron de 100 a 150 mg de hipocampo y estriado con un homogeneizador Ultraturax a máxima velocidad, en una proporción 1:15 peso/volumen de tampón de homogeneización (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 2% SDS), que contenía los siguientes inhibidores de proteasas: ABESF (1,3 mM), leupeptina (10 µg/ml), E64 (5 µg/ml), pepstatina A (10 µg/ml) y antipaina (10 µg/ml), y los siguientes inhibidores de fosfatasa: cantaridina (1mM) y ortovanadato sódico (1 mM). A continuación, las muestras fueron sonicadas. Se guardó una alícuota del homogenado a -80°C hasta la determinación del

contenido proteico según el método del ácido biciconínico (BCA). El resto fue diluido 1:1 con tampón de carga (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1,5% SDS; 10% glicerol; 2,5% 2-mercaptoetanol; 0,1% azul de bromofenol) y, finalmente, se desnaturalizó por baño maría a 95 °C durante 5 min.

La preparación de las muestras se llevó a cabo en tandas de 10 muestras, controlando en todo momento el tiempo para no excederse de 1 hora y manteniendo las muestras a 4 °C durante todo el procedimiento.

3.5.2 Determinación del contenido proteico de las muestras. Método del ácido biciconínico (BCA)

Debido a la presencia del detergente SDS en las muestras, el contenido proteico se determina a través del método del ácido biciconínico (BCA) ya que es compatible con SDS hasta el 1% (Smith *et al.*, 1985).

En un tubo de ensayo, se diluyeron 5 µl de muestra con agua bidestilada hasta completar un volumen de 100 µl. De forma paralela se realizó una curva patrón, a partir de una disolución conocida de albúmina bovina (2 µg/ µl), cuyo intervalo de concentración fue de 0,05 a 0,7 µg/ µl en un volumen total de 100 µl de agua bidestilada. Las muestras se hacen por triplicado y la recta patrón por duplicado. Se añaden 20 µl de muestra en cada pocillo y 25 µl de cada valor de la recta en sus pocillos correspondientes. A continuación, se añaden 200 µl del reactivo BCA (Pierce, U.S.A.) compuesto por reactivo A y B (50:1); se agitaron, se incubaron a 37 °C durante 30 min y se dejaron reposar a temperatura ambiente. Los valores de absorbancia de las muestras se midieron en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemania) a 562 nm, extrapolándolos con los de la curva patrón mediante regresión no lineal.

3.5.3 Electroforesis

Para la separación de las proteínas se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli, 1970).

Se utilizaron geles con sistemas de tampón discontinuo en los que se pueden diferenciar dos zonas: un gel de concentración de muestras (Stucking) compuesto por 4% acrilamida-bisacrilamida, 166 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,2% persulfato amónico y 0,08% N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED); y un gel de resolución o separación (Running) compuesto por un 8% de acrilamida-bisacrilamida, 0,75 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05% persulfato amónico y 0,05% TEMED. En los geles, se cargaron de 5 a 20 µl de muestra, cargando un volumen final que contuviera 40 mg/ml de proteínas en cada muestra.

También se cargaron 3 pocillos con un “pool” de 20 µl formado por la mezcla de diferentes muestras de corteza parietal. Se utilizaron peines de 15 pocillos, donde se cargaron muestras en todos los pocillos excepto en los dos correspondientes a los extremos. En cada gel se cargaron 5 µl de un marcador estándar de pesos moleculares adecuado a la proteína en estudio. Se utilizó el marcador *Prestained SDS-PAGE Standard-Broad-Range* (Bio-Rad) constituido por 8 proteínas preteñidas con azul de bromofenol que abarca un rango de pesos moleculares entre 6,4 y 200 kDa.

Una vez las muestras fueron cargadas en el gel, se sometieron a una corriente continua de 80 voltios, y una vez dentro del gel de resolución, la intensidad de la corriente se aumentó hasta 110 voltios. El tiempo aproximado de electroforesis fue de unos 120 min, aunque depende del peso molecular de la proteína a estudiar. El tampón de electroforesis en el que estaban inmersos los geles estaba compuesto por: 0,3% Tris base; 1,44% glicina; 0,1% de SDS, el pH de este tampón es de 8,5 - 8,6.

3.5.4 Electrotransferencia (Western Blot)

Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0,45 mm, aplicando un campo eléctrico perpendicular al plano del gel, conocido como *western blot*. Una vez en la membrana, para identificar a las proteínas se utilizaron diferentes anticuerpos, técnica conocida como *immunoblotting*. Esta técnica se basa en la capacidad que poseen los anticuerpos en reconocer de forma específica determinadas proteínas que actúan como antígenos.

Para realizar la electrotransferencia, el gel y la membrana de nitrocelulosa se colocan emparedados entre un conjunto de hojas de papel de filtro (3MM Whatman) y esponjas, sujeto por un armazón de plástico, y sumergido en el tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl, pH 8,4; 60 mM glicina; 20% metanol). El proceso de transferencia se realizó a 10 voltios durante 45 min (Figura 8).

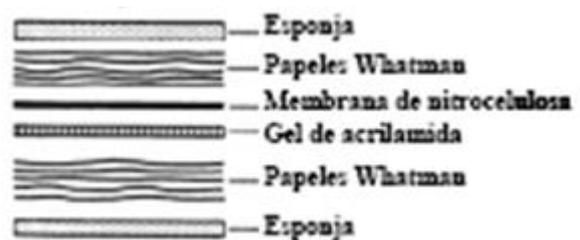


Figura 8. Esquema representativo de la electrotransferencia (Western Blot)

Transcurrido ese tiempo, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución bloqueadora que consistió en tampón TBS que contenía un 5% de leche en polvo desnatada y 0,1% Tween 20 (monolaureato de polioxietilenosorbitan). Las proteínas de la solución bloqueadora deben unirse inespecíficamente a todas las porciones de membrana que no han adsorbido proteínas del

gel, evitando así la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana e incrementa la probabilidad de que solo se unan a sus respectivos antígenos.

Tras el bloqueo, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante unas 13 a 16 horas, a 4 °C con una suave y continua agitación, con el anticuerpo primario contra las formas fosforiladas de cada proteína analizada, repitiéndose el mismo proceso para las proteínas totales. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

- **p-pNF-kB (p-p65) / pNF-kB (p65):** Anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína de 65 kDa p-pNF-kB (p-p65), que reconoce la serina (ser276); así como también el anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína total pNF-kB (ser276). Este anticuerpo fue suministrado por la casa comercial Santa Cruz (USA); NF-kB fosforilada: Ref: Sc-101749, Lot: C3012, detecta la serina 276 y NF-kB total: Ref: Sc-372, Lot: L1610.
- **Anti-SIRT1:** Anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína de 110 kDa SIRT1. Este anticuerpo se une a los aminoácidos 1-131 de ratón de SIRT1. Así como detecta otra banda de 75 kDa correspondiente a SIRT1 75 kDa. Este anticuerpo fue suministrado por la casa comercial Millipore (USA); Ref: 07-131, Lot: 2428681.
- **α -Tubulina:** Anticuerpo monoclonal (isotipo IgG1 de ratón) contra la proteína de 55 kDa α -tubulina. Este anticuerpo es derivado del hibridoma B-5-1-2 producido por fusión de células de mieloma y esplenocitos, en un ratón inmunizado. La tubulina tienen un peso molecular de 50 kDa. Este anticuerpo fue suministrado por Sigma Aldrich; Ref: PA186602, Lot: PJ1886651.

Tras una serie de lavados de la membrana (3 de 5 min) en tampón TBS, se incubaron con el anticuerpo secundario, que reconoce de forma específica el anticuerpo primario utilizado, durante 2 horas. El anticuerpo secundario (anti-mouse) está conjugado con el enzima peroxidasa de rábano. El anticuerpo secundario fue suministrado por Cell signaling (USA); Ref: 1858413, Lot: HA102346.

Por último, se realizaron 3 lavados de 5 min con tampón TBS y se procedió a la detección de la señal quimioluminiscente.

La detección inmunológica de las proteínas no fosforiladas (totales) se realizó mediante la técnica de *stripping immunoblot*, donde se utilizaron las mismas membranas de nitrocelulosa en las que previamente se habían detectado las formas fosforiladas de estas proteínas. Las membranas se mantuvieron durante 30 min a 50 °C con el tampón de *stripping* (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM 2-mercaptoetanol; 2% SDS). Tras 4 o 5 lavados de 5 min con

tampón PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Na₂HPO₄, 1,38 mM KH₂PO₄ pH 7,4), para eliminar el tampón de *stripping*, se continuó con el bloqueo de uniones inespecíficas mediante una solución bloqueadora realizada con tampón PBS y que contenía 5% de leche en polvo desnatada y 0,1% Tween 20; junto con la inmunodetección de las proteínas mediante los anticuerpos primarios y secundarios.

3.5.5 Sistema de detección

La inmunoreactividad fue detectada mediante un sistema de quimioluminiscencia amplificada. Se utilizan reactivos de revelado compuestos por luminol y ácido cumárico presente en dos soluciones: Solución 1: 2.5 mM luminol, 0.4 mM ácido p-cumárico, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5). Solución 2: 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 0.2mM H₂O₂. Se combinan ambas soluciones en proporción 1:1. La enzima peroxidasa unida al anticuerpo secundario, cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno (Figura 9, a). Tras la oxidación, se emite una señal quimioluminiscente llegando a su máximo de intensidad entre los 5 – 20 primeros minutos. A partir de ahí, empieza a decaer teniendo una semivida de emisión de unos 60 min. (Figura 9, b).

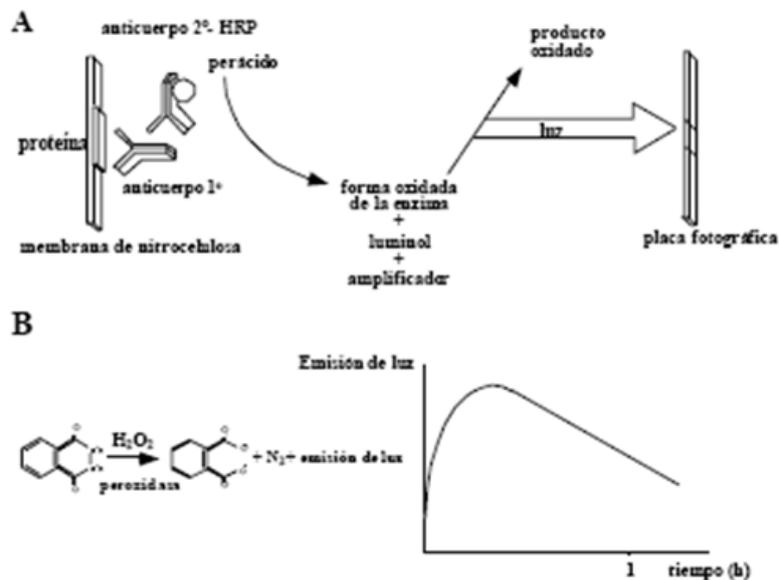


Figura 9. Sistema de detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL

La mezcla del revelado (800µl S1 + 800 µl S2) se vertió sobre las membranas y se incubó durante 1 minuto. Posteriormente, se analizó la emisión de luz por parte de las membranas mediante el sistema de captura de imágenes por quimioluminiscencia GeneGnome XRQ (Syngene). El tiempo de exposición de las membranas fue distinto dependiendo de la proteína a analizar y los anticuerpos utilizados (entre 1 y 20 minutos).

3.5.6 Cuantificación fotodensitométrica

El análisis de las imágenes fue realizado con el programa de dominio público “*NIH Image program*”. De esta manera se obtiene los valores de densidad óptica integrada (DOI) que resulta de la suma de píxels que forman la banda inmunoreactiva. Un píxel es un punto definido por las coordenadas (x, y, z), donde (x) e (y) son los ejes perpendiculares que sitúan al punto en un plano, y (z) el eje perpendicular a dicho plano que representa la intensidad del punto dentro de una escala de grises de 256 tonalidades.

La cantidad de proteína diana, con el anticuerpo correspondiente, en hipocampo y estriado de ratas sometidas a los distintos tratamientos, fue comparada en el mismo gel con la de ratas control así como con un control interno “pool” formado por un mix de muestras de corteza parietal de rata. La cuantificación de cada muestra se realizó en diferentes geles.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha utilizado el software GraphPad Prism 5 para realizar los análisis estadísticos de los resultados mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguido de los test *Fisher*, *Scheffé* o *Newman-Keuls*, así como las gráficas correspondientes. Se ha considerado estadísticamente significativo un nivel mínimo de probabilidad (P) igual o inferior a 0,05 ($p \leq 0,05$). Los resultados se expresan como media \pm error estándar.

4. RESULTADOS

A continuación se explican los resultados obtenidos a partir de las pruebas comportamentales, bioquímicas y moleculares.

5.1. Efecto del tratamiento crónico con resveratrol sobre la memoria de trabajo

Se analizó el efecto neuroprotector del tratamiento con resveratrol a nivel comportamental mediante la prueba del laberinto radial (*radial maze*), con la que se valora la memoria de trabajo. Los dos parámetros cuantificados fueron el tiempo que tardan las ratas en completar la prueba y el número de errores cometidos. El tratamiento ejecutado sobre las ratas viejas se realiza respecto a una rata control vieja tratada de la misma forma pero únicamente con vehículo (aceite de maíz).

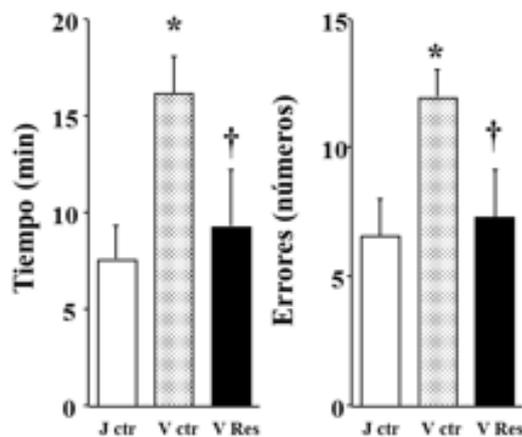


Figura 10. Prueba de memoria de trabajo en ratas viejas mediante el test de *radial maze*. Las barras representan el tiempo (promedio \pm SEM) para completar la prueba (gráfica de la izquierda) y el número total de errores (suma de los brazos no visitados y revisitados, promedio \pm SEM, gráfica de la derecha). Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía seguido por el test de Fisher. * $p \leq 0.05$, cuando comparas con el grupo control joven; † $p \leq 0.05$, comparado con el grupo control viejo.

En la figura 10, se muestra el efecto del tratamiento con resveratrol sobre la memoria de trabajo en ratas viejas mediante la prueba del laberinto radial (*radial maze*). El grupo control viejo presentó un empeoramiento de forma significativa en la memoria de trabajo respecto al grupo control joven. En cambio, el grupo tratado con resveratrol presentó mejoras cognitivas de forma significativa respecto al grupo control viejo: se observó una disminución tanto del tiempo requerido para completar la prueba como del número de errores cometidos.

5.2. Efecto del tratamiento crónico con resveratrol sobre la síntesis de monoaminas

Se evaluó el efecto neuroprotector del tratamiento con resveratrol sobre los sistemas monoaminérgicos cerebrales en estos animales. Concretamente, se analizó el efecto sobre la síntesis de las diferentes monoaminas, analizando la actividad de las dos enzimas limitantes: la tirosina hidroxilasa (TH), responsable de la síntesis de DOPA, y la triptófano hidroxilasa (TPH), responsable de la síntesis de 5-HTP. La actividad de estas dos enzimas

son indicativos de la tasa de síntesis de catecolaminas y serotonina, respectivamente. Estos análisis se realizaron en una región rica en terminales noradrenérgicos y serotoninérgicos (hipocampo) y en otra región rica en terminales dopaminérgicos y serotoninérgicos (estriado). Ambas regiones están implicadas en el control de las actividades cognitivas, como la memoria y el aprendizaje.

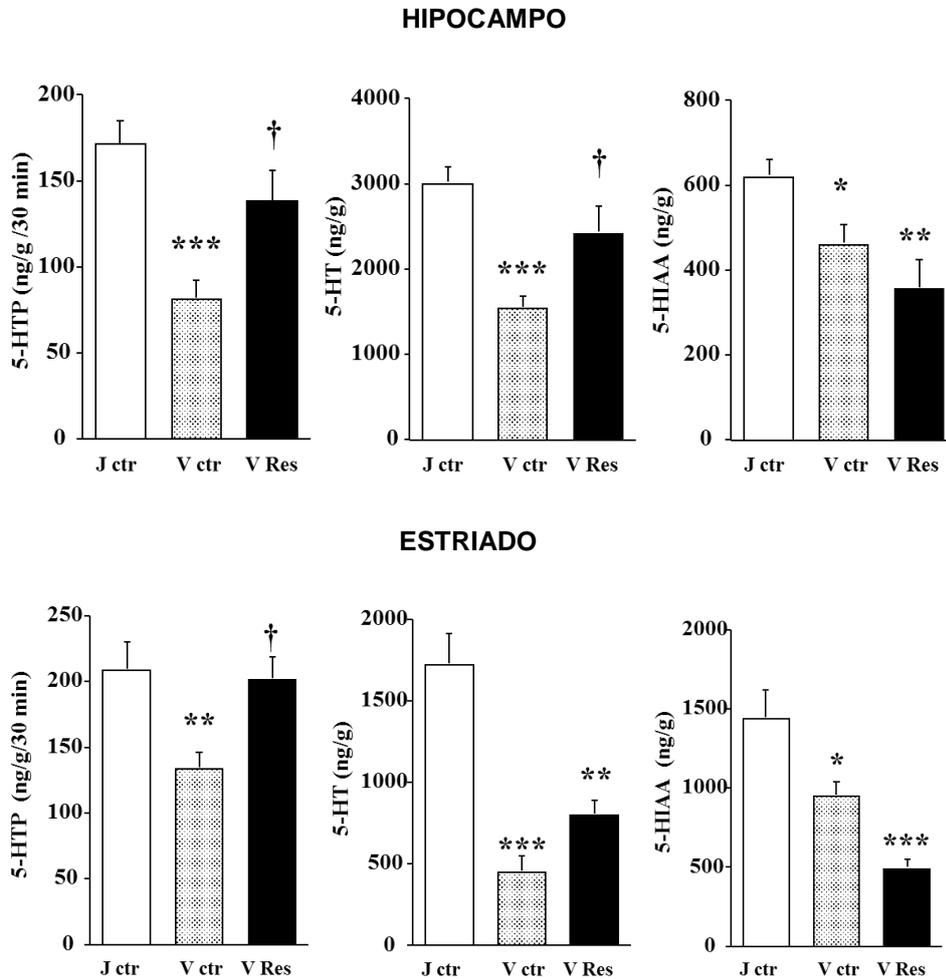


Figura 11. Efecto del tratamiento crónico del trans-resveratrol en el sistema serotoninérgico en hipocampo y estriado. Las barras representan en ng/g tejido (promedio \pm SEM) la acumulación de 5-HTP (durante 30 min después de la inhibición de la descarboxilasa con NSD 1015), contenido tisular de 5-HT y los niveles del metabolito 5-HIAA. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de vía seguido por el test de *Scheffé*: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ cuando comparas con el grupo control joven; † $p \leq 0.05$, comparado con el grupo control viejo.

En la figura 11, se muestra el efecto del resveratrol sobre el sistema serotoninérgico en hipocampo y estriado de ratas viejas. Se muestra la cantidad (ng/g tejido) de 5-HT, de su precursor (5-HTP) y su principal metabolito (5-HIAA). Como era de esperar, hubo menor síntesis de 5-HT (actividad de TPH mediada por la acumulación de 5-HTP) en ratas de avanzada edad tanto en hipocampo como estriado, en comparación con las ratas control joven. Consecuentemente, el contenido intraneuronal de 5-HT y su metabolito 5-HIAA,

mostraron una reducción dependiente de la edad. Sin embargo, el tratamiento con resveratrol aumentó la síntesis de 5-HT en ratas viejas y la acumulación de 5-HTP (actividad de TPH) aumentó tanto en hipocampo como en estriado de ratas viejas. Como consecuencia, también aumentó el contenido intraneuronal de 5-HT por este tratamiento con resveratrol, aunque en menor medida que el 5-HTP. En cambio, el contenido del metabolito 5-HIAA disminuyó por este tratamiento. Ambos datos podrían estar indicando también un incremento de la neurotransmisión serotoninérgica en ambas regiones cerebrales de animales tratados con resveratrol.

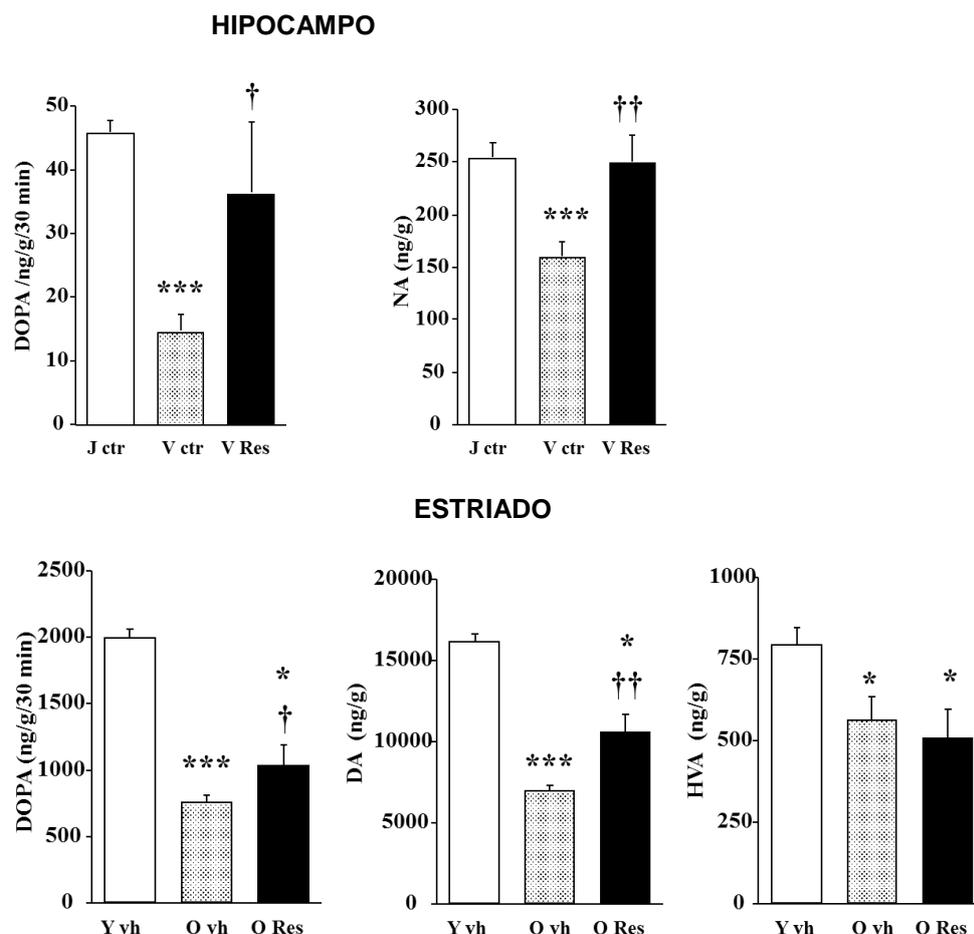


Figura 12. Efecto del tratamiento crónico del trans-resveratrol en el sistema catecolaminérgico en hipocampo y estriado. Las barras representan en ng/g tejido (promedio \pm SEM) la acumulación de DOPA (durante 30 min después de la inhibición de la descarboxilasa con NSD 1015), contenido tisular de DA o NA según la región de estudio, y los niveles de metabolitos de HVA en el estriado. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de vía seguido por el test de *Scheffé*: * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ cuando comparas con el grupo control joven; † $p \leq 0.05$, †† $p \leq 0.01$ comparado con el grupo control viejo.

En la figura 12, se muestra el efecto del resveratrol sobre el sistema catecolaminérgico en ambas regiones cerebrales. Se muestra la acumulación (ng/g tejido) de DOPA, que en una región predominantemente noradrenérgica como el hipocampo representa la tasa de síntesis de NA, mientras que en una región predominantemente dopaminérgica como el

estriado representa la tasa de síntesis de DA. También se muestra el contenido de NA y de DA en hipocampo y estriado, respectivamente; y además uno de los metabolitos principales de la DA, el HVA. Con el método de análisis utilizado no fue posible detectar ningún metabolito de degradación de la noradrenalina. De manera similar al sistema serotoninérgico, la tasa de síntesis de NA en el hipocampo disminuyó con la edad, mostrando así menor acumulación de su precursor DOPA (actividad de TH) en ratas de avanzada edad. Además, se pudo observar una reducción de la síntesis de DA en el cuerpo estriado, con una menor acumulación de DOPA y de los niveles del metabolito HVA. En el sistema noradrenérgico también se pudo ver el efecto protector por el tratamiento con resveratrol. Indujo un aumento significativo del precursor DOPA y el contenido de NA en el hipocampo. De la misma manera, en el sistema dopaminérgico del cuerpo estriado, se pudo observar un aumento de la acumulación de DOPA y el contenido de DA, mientras que los niveles de HVA no cambiaron. Este último dato podría indicar un incremento de neurotransmisión dopaminérgico en el estriado de los animales viejos tratados con resveratrol.

5.3. Efecto del tratamiento crónico con resveratrol sobre los niveles de SIRT1 y NF-kB

Este efecto del resveratrol sobre los sistemas monoaminérgicos puede ser debido a un efecto contrarrestando el estrés oxidativo a nivel cerebral o más, a efectos mediados por SIRT1. Para intentar discriminar estos efectos, se analizó el impacto del envejecimiento y el efecto del tratamiento crónico con resveratrol sobre los niveles de las proteínas SIRT-1 y NF-kB en el hipocampo y estriado de rata mediante *western-blot*.

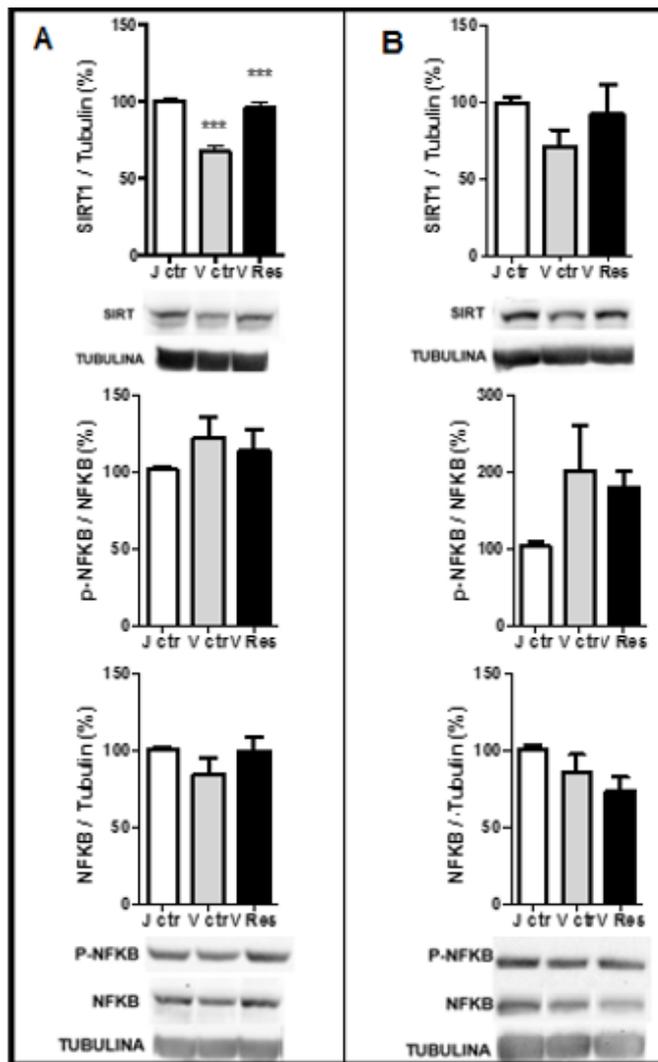


Figura 13. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol sobre los niveles de las proteínas SIRT1, NF- κ B y la forma fosforilada de NF- κ B en hipocampo (A) y estriado (B) de rata. Las barras representan el análisis densitométrico cuantitativo de los niveles de la proteína SIRT1 (paneles superiores) y la proteína NF- κ B y su forma fosforilada (paneles inferiores en hipocampo (A) y estriado (B) de rata. Los niveles de las proteínas fueron normalizados por los niveles de tubulina. Los resultados se expresan en porcentaje (media \pm SEM) respecto de la muestra control de ratas jóvenes (J ctr), de los niveles de SIRT1 y NF- κ B normalizados por los niveles de tubulina. Además, se muestra la proporción de proteína NF- κ B fosforilada respecto a la proteína total. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de vía seguido por el test de *Newman-Keuls*. *** $p \leq 0.001$, cuando comparas con el grupo control joven y viejo (n= 5-9 animales por grupo). En la parte inferior de cada gráfico de barras, se muestran immunoblots representativos de los datos mostrados.

En la figura 13, se muestra el efecto del envejecimiento y del tratamiento con resveratrol sobre los niveles de la proteína SIRT1 y NF- κ B en hipocampo y estriado. El contenido de SIRT1 del grupo control viejo fue significativamente menor en comparación con el grupo control joven tanto en los extractos de hipocampo como de estriado (aunque en el estriado no alcanzó significancia estadística (Fig. 13A, gráfica superior). El tratamiento con resveratrol en estos animales viejos recupera los niveles de SIRT1 a niveles parecidos a los de animales jóvenes. Observando los niveles de NF- κ B total en los distintos tratamientos (Fig. 13A, gráfica inferior), se puede ver el efecto del resveratrol sobre NF- κ B respecto al grupo control viejo disminuyendo su contenido en el estriado, pero sin diferencias significativas. Por último, no se observaron cambios significativos en la proporción de NF- κ B fosforilado (Fig. 13A, panel central) respecto a los niveles totales en ningún grupo experimental, aunque el grupo tratado con resveratrol tenga la tendencia a disminuir respecto al grupo control viejo.

6. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que un tratamiento crónico con resveratrol produce un efecto neuroprotector sobre el deterioro cognitivo y monoaminérgico que normalmente ocurre durante el envejecimiento y apunta a que este efecto neuroprotector del resveratrol esté mediado por un mecanismo dependiente de SIRT1.

Está ampliamente descrito, que la edad produce una disminución de los procesos cognitivos, especialmente la memoria (Mather & Carstensen, 2005). Por una parte, en este estudio se pretendió comprobar el efecto del resveratrol a nivel cognitivo, observando el aprendizaje espacial y la memoria. El test demostró que el envejecimiento produce un empeoramiento claro de la memoria de trabajo y a su vez, se vio una mejora en las ratas tratadas con resveratrol ya que éstas presentaron una disminución del tiempo necesario para la ejecución del test así como también, un menor número de errores. De forma similar, en otros estudios el tratamiento crónico con resveratrol produjo un aumento en la memoria y esto podría ayudar a reducir el descenso de la capacidad cognitiva que normalmente se produce como consecuencia del envejecimiento (Sarubbo *et al.*, 2015).

Estos efectos sobre las capacidades cognitivas, tanto del envejecimiento como del tratamiento con resveratrol, se correlacionó con los datos bioquímicos de los sistemas monoaminérgicos cerebrales. Para este estudio, nos centramos en dos regiones cerebrales estrechamente implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje, hipocampo y estriado (Mcdonald & White, 1993). Se analizaron los efectos del resveratrol sobre la síntesis de 5-HTP/serotonina, DOPA/noradrenalina y DOPA/dopamina junto con sus principales metabolitos. Así, los resultados indicaron que el envejecimiento produjo un deterioro en los sistemas monoaminérgicos. Se observó una reducción en la síntesis de 5-HT tanto en hipocampo como estriado y reducción de la síntesis de NA y DA en hipocampo y estriado, respectivamente.

Se ha demostrado que 5-HT, DA y NA influyen en una amplia variedad de funciones cerebrales, principalmente de carácter cognitivo (González-Burgos & Feria-Velasco, 2008). Se ha visto que una reducción de las actividades de TPH y TH durante el envejecimiento cerebral normal, se ha relacionado con una fosforilación ineficiente y / o un daño oxidativo de estas enzimas (Sarubbo *et al.*, 2015). Además, existen evidencias de que las reducciones de los niveles de neurotransmisores y de las actividades de las enzimas involucradas en su síntesis, ocurren cuando se produce el envejecimiento del cerebro. La sensibilidad al envejecimiento parece variar para los diferentes neurotransmisores y regiones del cerebro, y el sistema dopaminérgico es uno de lo más marcadamente alterado, aunque otros sistemas de transmisión también se vean afectados (Carlsson, 1986 & Makman, 1993). Por lo tanto, en este trabajo se comprobó que el deterioro cognitivo estuvo

acompañado de un declive monoaminérgico en las dos regiones cerebrales, hipocampo y estriado.

Se pudo ver como aumentó la acumulación de 5-HTP, la tasa de síntesis de 5-HT y, como consecuencia, aumentaron los niveles de 5-HT en hipocampo y estriado. De la misma manera, se pudo ver un aumento en la acumulación del precursor DOPA, la tasa de síntesis de NA y DA y, consecuentemente, un aumento en los niveles de NA y DA en hipocampo y estriado, respectivamente. Estos efectos producidos en los diferentes neurotransmisores son debidos a un aumento de la actividad de las dos enzimas limitantes responsables de la síntesis de monoaminas, TPH y TH. Teniendo en cuenta trabajos previos, se sugiere que los efectos observados de resveratrol en los niveles de síntesis de las diferentes monoaminas, podría deberse a un efecto protector sobre estas enzimas limitantes (TPH y TH) contra los agentes oxidantes, lo que podría contrarrestar el efecto del envejecimiento ([Sarubbo et al., 2015](#)). O incluso, porque el resveratrol protege a las neuronas de la muerte neuronal durante el envejecimiento ([Okawara et al., 2007](#)).

Esta protección neuronal o de las enzimas puede ser debido, al menos en parte, al efecto antioxidante del resveratrol. Pero también se ha descrito que el resveratrol ejerce parte de sus efectos a través de SIRT1 ([Moriya et al., 2011](#)). Para comprobar este mecanismo, analizaremos los niveles de SIRT1 y NF-kB en el cerebro.

Las Sirtuínas (grupo de enzimas histonas deacetilasas) son mediadores críticos en la restricción calórica (RC) [[Lin et al., 2000](#)]. Estas proteínas regulan la transcripción de ciertos genes mediante el silenciamiento de estos por deacetilación de histonas, regulando así mecanismos de supervivencia que juegan un papel clave en la longevidad ([Mannari et al., 2010](#)). Estudios previos, han demostrado que el resveratrol se muestra mimético de la RC y que ambos, activan la proteína SIRT1 la cual está mediada por vías que cuyas acciones, resultan en la prevención de enfermedades relacionadas con la edad y en un retraso del envejecimiento ([Baur et al., 2006](#); [Markus & Morris, 2008](#)).

Los resultados obtenidos, han mostrado cambios adaptativos significativos en ambas regiones en los niveles de SIRT1, sobre todo en hipocampo pero también, se ha observado una tendencia a disminuir los niveles del efector NF-kB, sin observarse cambios significativos. Conforme a estos resultados y estudios previos, se sabe que la RC puede aumentar la expresión de SIRT1 y el nivel celular de su activador (NAD⁺), junto con la posterior inhibición de la señalización de NF-kB ([Salminen & Kaarniranta, 2009](#)). Una de las funciones principales de SIRT1 es su actividad antiinflamatoria, la cual está mediada en gran parte por la inhibición de NF-kB, regulador clave en la respuesta inmune ([Hubbard y Sinclair, 2014](#)). Las funciones de las Sirtuínas mitocondriales, sugieren que controlan la actividad de varias enzimas metabólicas y desempeñan un papel crucial en la adaptación metabólica en condiciones de dieta, como en el caso de la RC y el ayuno ([Jayasena et al., 2013](#)).

Hace tiempo, se observó que el estrés oxidativo provocado por los radicales libres se asociaba con el proceso de envejecimiento y podía causar procesos degenerativos y además, se sabe que este estrés oxidativo es un inductor sensible del sistema de NF-kB (Salminen & Kaarniranta, 2009). Recientemente, datos analizados mediante el uso de la técnica EMSA, indican un aumento relacionado con la edad en la actividad de unión del complejo NF-kB al DNA en varios tejidos de ratas y ratones de avanzada edad (Caamano & Hunter, 2002; Helenius *et al.*, 1996). Esto podría estar indicando que NF-kB está más activo durante el envejecimiento y esto puede ser debido a un incremento en la neuroinflamación, ya que la vía de señalización de NF-kB está considerada como proinflamatoria (Lawrence, 2009).

Aunque en este estudio no se han observado efectos claros del tratamiento con resveratrol sobre los niveles de NF-kB, ni en la proporción de proteína activada por fosforilación, realmente sería más interesante analizar la forma acetilada de NF-kB, ya que se ha demostrado que la activación de SIRT1 afecta principalmente a la acetilación de NF-kB con lo que impide su activación (Csiszar *et al.*, 2008).

7. CONCLUSIONES

- El envejecimiento en ratas produce una disminución de los procesos cognitivos, como en la memoria de trabajo y, el tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg, durante 30 días), induce una mejora en la memoria de trabajo respecto al grupo control de ratas viejas, observándose una disminución del tiempo necesario para la ejecución del test y un menor número de errores en el *test radial maze*.
- Los efectos cognitivos inducidos durante el envejecimiento se correlacionan con una degeneración de los sistemas monoaminérgicos de rata en regiones cerebrales relacionadas con los procesos de memoria y aprendizaje, como el hipocampo y estriado; y el tratamiento crónico con resveratrol también mejora estos sistemas serotoninérgicos y catecolaminérgicos en las regiones analizadas.
- El envejecimiento produce una disminución significativa de los niveles de SIRT1 en ratas viejas respecto al grupo control joven tanto en hipocampo y estriado; y el tratamiento con resveratrol en animales viejos recupera los niveles de SIRT1 parecidos a los de animales jóvenes.
- El tratamiento con resveratrol protege del deterioro cognitivo asociado con el envejecimiento debido, al menos en parte, a una protección sobre los sistemas monoaminérgicos implicados en estos procesos cognitivos; probablemente por un mecanismo mediado por SIRT1.

8. REFERENCIAS

- **Avello M., Suwalsky M.** (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 494. ISSN 0716-1840. 161-172
- **Baur J.A.** (2010) Resveratrol, sirtuins, and the promise of a DR mimetic. *Mechanisms of Ageing and Development*. 131: 261–269
- **Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA.** (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 444:337–42.
- **Bishop N.A., Tao L., Yankner B.A.** (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 464: 529–53
- **Caamano, J., Hunter C. A.** (2002). NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 15:414–429.
- **Catalgol, B., Batirel S., Taga Y., & Ozer N.K.** (2012). Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology*. 3,141
- **Céspedes, M., Ela, M., Hernández Lantigua, I., Llopiz Janer, N.** (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev Cubana Invest Bioméd* [online]. 15(2): 1561-3011.
- **Cheyrier V., Moutounet M., Sarni-Manchado P.** (1998). Les composés phénoliques. *C. Flanzy, Paris*. En: Lavoissier Tec&Doc (eds) Oenologie, fondements scientifiques et technologiques. 124-164
- **Cristófol, R., Porquet, D., Corpas, R., Coto-Montes, A., Serret, J., Camins, A., Mercè, P., Sanfeliu, C.** (2012). Neurons from senescences-accelerated SAMP8 mice are protected against frailty by the sirtuin 1 promoting agents melatonin and resveratrol. *Journal of Pineal Research*, 52(3), 271-81
- **Csiszar, A., Wang, M., Lakkatta, E. G., Ungvari, Z.** (2008). Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF- κ B. *Journal of Applied Physiology*. 105: 1333-1341.
- **Finkel, T., Holbrook, N.J.** (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408: 239-247.
- **Frie, B., Higdon, L.V.** (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J nutr*. 133 (10): 3275S-84S.
- **Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D.** (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*. 40: 959-975
- **Gill, S.S., Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.
- **González-Burgos, I., Feria-Velasco, A.** (2008). Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res*. 172:603– 623
- **Harman, D.** (1972). The biologic clock: The mitochondria? *J. Am. Geriatr.* 20, 145–147.
- **Hayflick L., Moorhead P.S.** (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*; 25:585-621
- **Helenius, M., Hanninen, M., Lehtinen, S.K., Salminen, A.** (1996). Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor- κ B. *Biochem J*. 318:603–608
- **Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, LL., Scherer, B., Sinclair, D.A.** (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*.425:191–6.
- **Hubbard, B. P., Sinclair, D.A.** (2014). Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Cell Press*. 35: 146-154
- **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.
- **Imlay, J.A.** (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry* 77, 755-776.
- **Inés, L.C.** (2009). Consecuencias del envejecimiento de la población: el futuro de las pensiones

- **Jayasena, T., Poljak, A., Smythe, G., Braid, N., Münch, G., Sachdev, P.** (2013). The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*. 12: 867-883
- **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
- **Kim, D., Nguyen, M.D., Dobbin, M.M., et al.** (2007). SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Embo J*. 26: 3169-79
- **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. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 10478-10504
- **Kushnareva, Y.; Murphy, A.N.; Andreyev, A.** (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: Modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem. J*. 368,545-553.
- **Laemmli, U. K.** (1970). *Nature* 227. 680-685.
- **Lawrence, T.** (2009). The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a001651.
- **Lefevre M, Redman LM, Heilbronn LK, Smith JV, Martin CK, Rood JC, Greenway FL, Williamson DA, Smith SR, Ravussin E.** (2009). Caloric restriction alone and with exercise improves CVD risk in healthy nonobese individuals. *Atherosclerosis*. 203:206–13
- **Lepoivre, M., Flaman, J.M., Bobé, P., Lemaire, G. Henry, Y.** (1994). Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *J. Bio. Chem.*, 269, 21891-97.
- **Lin SJ, Defossez PA, Guarente L.** (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 289:2126–8
- **Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L.** (2004). Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev*. 18:12–6
- **Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 79(5): 727-47
- **Mandavilli, B.S., Santos, J.H., Van Houten, B.** (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat. Res*. 509: 127--151.
- **Mannari C, Bertelli AA, Stiacchini G, Giovannini L.** (2010). Wine, sirtuins and nephroprotection: not only resveratrol. *Med Hypotheses*. 75(6):636-8
- **Markus, M.A., Morris, B.J.** (2008). Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clinical intervention in aging*. 3:331-339
- **Mather, M., Carstensen, L.L.** (2005). Aging and motivated cognition: the positivity effect in attention and memory. *Cell press*. 9: 496-502
- **McDonald, R. J., White, N. M.** (1993). A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral neuroscience*, 107(1): 3-22
- **Miquel, J., Economos, A.C., Bensch, K.G., Atlan, H., Johnson Jr, J.E.** (1979). Review of cell aging in *Drosophila* and mouse. *Age*. 3: 78-88
- **Moranta, D.** (2005). Efectos conductuales y modulación de la síntesis de monoaminas y de la vía de quinas mitogénicas en cerebro de rata tras tratamientos con cannabinoides y etanol. Tesis Doctoral. 2005.
- **Moriya, J., Chen, R., Yamakawa, J. I., Sasaki, K., Ishigaki, Y., Takahashi, T.** (2011). Resveratrol improves hippocampal atrophy in chronic fatigue mice by enhancing neurogenesis and inhibiting apoptosis of granular cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(3), 354-359.
- **Mudò, G., Makela, J., Di Liberto, V., Tselykh, T.V., Olivieri, M., Piepponen, P., ...Linholm, D.** (2012). Transgenic expression and activation of PGC-1α protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 69(7). 1153-65
- **Okawara, M., Katsuki, H., Kurimoto, E., Shibata, H., Kume, T., Akaike, A.** (2007). Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. *Biochemical pharmacology*, 73 (4), 550-560.
- **Omran, A. R.** (1983). The epidemiologic transition theory. A preliminary update. *Journal of Tropical Pediatrics*. 29, 305-316
- **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 adaptative brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol.* 60:173-196
- **Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, et al.,** (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* 8:157–68.
- **Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C and Pouységu L.** (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis. *Angew Chem.* 50: 586 - 621.
- **Rao, M. S., & Mattson, M. P.** (2001). Stem cells and aging: Expanding the possibilities. *Mechanisms of Ageing Development.* 122, 713-734
- **Reese, T.S., Karnovsky, M.J.,** (1967). Fine structural localization of a blood brain barrier to exogenesis peroxidase. *Journal of Cell Biology* 34, 207–217
- **Salminen, A., Kaarniranta, K.** (2009). NF-κB Signaling in the Aging Process. *J Clin Immunol.* 29: 397-405
- **Sarubbo, F., Ramis, M.R., Aparicio, S., Ruíz, L., Esteban, S., Miralles, A., Moranta, D.** (2015). Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats. *Age.* 37:37
- **Sastre-Coll, A., Esteban, S., García-Sevilla, J.A.** (2002). Supersensitivity of 5-HT_{1A}-autoreceptors and α₂-adrenoreceptors regulating monoamine synthesis in the brain of morphine-dependent rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 365: 2010-219
- **Sastre-Coll, A., Esteban, S., Miralles, A., Zanetti, R., García-Sevilla, J.A.** (2001). The imidazoline receptor ligand 2-(2-benzofuranyl)- 2-imidazoline is a dopamine-releasing agent in the rat striatum in vivo. *Neurosci Lett.* 301: 29-32
- **Schriner, S. E. et al.,** (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science.* 308, 1909–1911
- **Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, Avalos JL, Escalante-Semerena JC, Grubmeyer C, Wolberger C, Boeke JD.** (2000). A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6658–63.
- **Smith, P.K. et al.,** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85
- **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.
- **Smoliga J. M., Sage E. C., Campen M.J.** (2013). A healthier approach to clinical trials evaluating resveratrol for primary prevention of age-related diseases in healthy populations. 5: 495-506.
- **Spencer, J., Vauzour, D., Rodríguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Comcha, M.J.** (2010). Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients.* 2(11): 1106-1131.
- **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.
- **Truelsen, T., Thudium, D., Gronbaek, M.** (2002). Amount and type of Alcohol and risk of dementia. The Copenhagen Heart Study. *Neurology.* 59: 1313-1319
- **Vijay K. B., Srivastava R.S.** (2011). Effect of pineal proteins at different dose level on fluoride-induced changes in plasma biochemicals and blood antioxidants enzymes in rats. *Biol Trace Elem Res.* 141: 275-282
- **Viña J., Borrás C., Miquel J.,** (2007). Theories of ageing. *IUBMB Life.* 59:249-254
- **Weiss EP, Racette SB, Villareal DT, Fontana L, Steger-May K, Schechtman KB, Klein S, Holloszy JO.** (2006). Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 84(5):1033–42
- **Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., Sinclair D.**(2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature,* 430:686–9.
- **Wu, P.F., Xie, N., Zhang, J.J., Guan, X.L., Zhou, J., Long, L.H., Chen, J.G.** (2013). Resveratrol preconditioning increases methionine sulfoxide reductases A expression and enhances resistance of human neuroblastoma cells to neurotoxins. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 24(6), 1070-7
- **Yossi G.S., Eldad M., Daniel O.** (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative disease: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.* 40: 959-975