



Universitat
de les Illes Balears

Estrategias neuroprotectoras en el
envejecimiento cerebral.
Mecanismos neuroquímicos y
moleculares y su correlación con los
efectos sobre las capacidades cognitivas

Maria Fiorella Sarubbo

Tesis Doctoral
2016



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2016

**ESTRATEGIAS NEUROPROTECTORAS EN EL
ENVEJECIMIENTO CEREBRAL. MECANISMOS
NEUROQUÍMICOS Y MOLECULARES Y SU
CORRELACIÓN CON LOS EFECTOS SOBRE LAS
CAPACIDADES COGNITIVAS**

Maria Fiorella Sarubbo



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2016

Programa de Doctorado en Neurociencias

**ESTRATEGIAS NEUROPROTECTORAS EN EL
ENVEJECIMIENTO CEREBRAL. MECANISMOS
NEUROQUÍMICOS Y MOLECULARES Y SU
CORRELACIÓN CON LOS EFECTOS SOBRE LAS
CAPACIDADES COGNITIVAS**

Maria Fiorella Sarubbo

Director: Antoni Miralles Socias
Directora: Susana Esteban Valdés
Director: David Moranta Mesquida

Doctora por la Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears

Los Drs. Antoni Miralles, Susana Esteban y David Moranta, de la Universitat de les Illes Balears

DECLARAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Estrategias neuroprotectoras en el envejecimiento cerebral. Mecanismos neuroquímicos y moleculares y su correlación con los efectos sobre las capacidades cognitivas* presentada por Maria Fiorella Sarubbo para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo su supervision.

Y para que quede constancia de ello firman este documento.

Dr. Antoni Miralles

Dra. Susana Esteban

Dr. David Moranta

Palma de Mallorca, 15 de enero de 2016

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda económica de una Beca de Posgrado de la Universitat de les Illes Balears (UIB) (2012-2014) y posterior Contrato Predoctoral de Continuación Propio de la UIB (2014-2016). El trabajo de investigación fue financiado por el Programa Pont La Caixa-UIB (7/2014) y por el Govern Balear (AAEE 18/2014).

AGRADECIMIENTOS

Para la consecución de esta Tesis fue necesaria la ayuda de muchas personas a las que quiero expresar mi más profundo agradecimiento. En primer lugar, a mis tres directores de Tesis, el Dr. Antoni Miralles, por su dedicación y disponibilidad, por su ayuda científica, y sobre todo por haber buscado de ayudarme y comprenderme siempre, demostrando una honestidad excepcional. A la Dra. Susana Esteban, porque fue mi mentora desde mis inicios como alumna colaboradora. Gracias por su trabajo inagotable, sus consejos, su cercanía y disposición a estar siempre en todo lo que fuera necesario, incluso más allá de lo profesional, aportándome seguridad y guiándome en todo momento. Al Dr. David Moranta, por haber aceptado ser mi director, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, y ser una de las personas que más me ha ayudado, por trabajar continuamente incluso en condiciones adversas, demostrando una gran profesionalidad, siendo para mí un ejemplo al cual seguir. A los tres gracias por haber formado un gran equipo directivo, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por esforzarse en enseñarme y ayudarme a mejorar continuamente.

También quiero agradecer a todas las personas con las que de diversas formas he trabajado en el laboratorio de Neurofisiología de la UIB. A la Dra. Sara Aparicio por su energía y positividad a la hora de trabajar. A todos los compañeros de laboratorio, Marga, M^a Antònia, Joanllo, Cristina, Melina, Dani y Eva. Además a los que durante sus trabajos de Grado o Máster han participado en experimentos de esta tesis, como M^a Antònia Ribot, Camí, Laura y Marc. Especialmente a Carol Kienzer, quien aparte de ayudarme se ha convertido en una gran amiga.

De manera muy especial quiero agradecer a quienes fueron mi segunda familia en la última etapa de la Tesis, ellos son el grupo de Infección e Inmunidad de la FISIB, dirigido por la Dra. Verónica Regueiro y formado junto con David por Quique, Pau, Mar, Vero Martínez, y los alumnos Jaume, Sofía y Aina. Gracias por haberme integrado desde el primer momento como un miembro más del grupo, permitiendo que realizara una parte fundamental de esta Tesis en su laboratorio. Porque de cada uno de ellos he aprendido mucho, y por haberme hecho disfrutar de mi trabajo durante esta etapa. Espero contar siempre con vuestra amistad.

Agradezco la ayuda técnica de Pau y Maribel del Científicotècnic. En especial a Maribel, por su disposición y amabilidad para enseñarme mucho sobre HPLC. A Benjamín y el laboratorio de Neurofarmacología por las veces que he necesitado su colaboración. A Cristina López-Polín de la Dirección de Estrategia de Comunicación y Promoción Institucional de la UIB, por su ayuda con el diseño gráfico de la portada. También a Carlos Ríos y Paz, por sus consejos y ayuda. Finalmente a mis padres y mis tres hermanos, sin ellos casi nada de lo que he hecho en mi vida sería posible. A ellos les dedico esta Tesis porque son y serán siempre lo más importante.

A mis padres y hermanos

ABREVIATURAS

5-HIAA	ácido 5-hidroxi indolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptófano
AADC	enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa
ABC	del inglés <i>ATP-binding cassette</i>
ADN	ácido dextrorribonucleico
Akt	proteína quinasa B de la vía PI3K/Akt/mTOR
AMP	adenosín monofosfato
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
AMPK	proteína quinasa activada por AMP
ANOVA	ánálisis de la varianza
AROS	del inglés <i>active regulator of SIRT1</i>
ATP	adenosina trifosfato
BBB	del inglés <i>blood brain barrier</i>
BCA	método del ácido biciconínico
BCRP	del inglés <i>breast cancer resistance protein</i>
BDNF	del inglés <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
Cdk1-B	del inglés <i>cyclin-dependent kinase 1B</i>
COX	enzima ciclooxigenasa
DA	dopamina
DBC1	del inglés <i>deleted in breast cancer 1</i>
DOI	densidad óptica integrada
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
DOPAC	ácido hidroxifenilacético
DYRK	del inglés <i>dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase</i>
ECL	electroquimioluminiscencia amplificada
EDTA	ácido etilenediamino tetraacético
ERK	quinasa regulada por señales extracelulares
FOXO	del inglés <i>forkhead box</i>
Glu ²³⁰	aminoácido glutamato 230
GnRH	hormona liberadora de la gonadotropina
HPLC	del inglés <i>high performance liquid chromatography</i>
HVA	ácido homovanílico
i.p	vía intraperitoneal
IgG	inmunoglobulina G
IIS	del inglés <i>insulin/IGF (insulin-like growth factor)-like signaling</i>
IKK	proteína quinasa de la vía de NF-κB
IL-1β	interleuquina 1 β

IMAO	inhibidor de la enzima MAO
iNOS	óxido nítrico sintasa
I κ B	proteína quinasa de la vía de NF- κ B
JNK	proteína quinasa activada por estrés que fosforila c-Jun
kDa	kilodaltons
LPS	endotoxina lipopolisacárido
LTP	del inglés <i>long term potentiation</i>
MAO	enzima monoamino oxidasa
MAPK	proteína cinasa activada por señales mitógenas
MEK	proteína tirosina/treonina quinasa de la vía de las MAPK
MRP2	del inglés <i>multidrug resistance-associated protein 2</i>
mTOR	proteína diana de la rampamicina en mamíferos
NA	noradrenalina, norepinefrina
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotido
NADH	nicotinamida adenina dinucleotido deshidrogenasa
NF- κ B	factor nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
NSD 1015	3-hydroxybenzyl hydrazine; inhibidor de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
o/n	del inglés <i>over night</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSA	ácido octano sulfónico
PGC1- α	coactivador transcripcional 1 alfa
PKA	del inglés <i>protein kinase A</i>
PKB	del inglés <i>protein kinase B</i>
RAR β	receptor de ácido retinoico beta
ROS	del inglés <i>reactive oxygen species</i>
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SIRT	del inglés <i>silent information regulator proteins</i>
SNA	sistema nervioso autónomo
SNC	sistema nervioso central
SPF	del inglés <i>specific pathogen free</i>
STAC	del inglés <i>sirtuin activating compound</i>
TBS	tampón tris salino
TH	enzima tirosina hidroxilasa
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
TPH	enzima triptófano hidroxilasa
WB	<i>Western blot</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inversión de la tendencia demográfica en España.....	3
Figura 2. Población mayor de 65 años en países desarrollados y en vías de desarrollo	4
Figura 3. Esquema representativo del concepto de mitohormesis	6
Figura 4. Efecto del envejecimiento en los diferentes tipos de memoria	12
Figura 5. Esquema de la síntesis de catecolaminas	16
Figura 6. Organización del sistema noradrenérgico en el cerebro de rata	17
Figura 7. Organización del sistema dopaminérgico en el cerebro de rata	18
Figura 8. Esquema de la síntesis de serotonina	20
Figura 9. Organización del sistema serotoninérgico en el cerebro de rata	20
Figura 10. Vía de señalización de NF- κ B. Relación con otras proteínas como SIRT1	24
Figura 11. Esquema de algunas vías de inflamación y autofagia durante el envejecimiento	26
Figura 12. Localización subcelular de las sirtuínas de mamíferos	34
Figura 13. Patrón de expresión de las diferentes sirtuínas en distintas regiones del SNC de rata adulta ..	35
Figura 14. Funciones fisiológicas de SIRT1	36
Figura 15. Mecanismo propuesto para la activación alostérica de SIRT1 por medio de STACs	38
Figura 16. Mecanismo de acción de SIRT1	39
Figura 17. Esquema del papel de SIRT1 como regulador de varios procesos celulares.....	40
Figura 18. Esquema del proceso de formación del fragmento de 75 kDa de SIRT1	41
Figura 19. Laberinto radial.....	53
Figura 20. Campo abierto.....	56
Figura 21. Diagrama del laberinto de Barnes	57
Figura 22. Laberinto de Barnes	57
Figura 23. Esquema de los tipos de estrategias de aprendizaje	59
Figura 24. Aparato de <i>rotarod</i>	59
Figura 25. Esquema del efecto del NSD 1015 sobre las vías de síntesis de monoaminas	61
Figura 26. Representación esquematizada de la disección del cerebro de rata (visión sagital).....	62
Figura 27. Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	62
Figura 28. Cromatogramas representativos de distintas preparaciones	63
Figura 29. Material para la realización de electroforesis y esquema de un dispositivo de SDS-PAGE	67
Figura 30. Equipo de transferencia y esquema de la realización de la electrotransferencia	68
Figura 31. Sistema de detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL	70
Figura 32. Rectas patrón de pool de hipocampo.....	71
Figura 33. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína p-Akt.....	75
Figura 34. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína Akt	75
Figura 35. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína p-ERK1/2.....	76
Figura 36. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína ERK1/2	76
Figura 37. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína p-MEK1/2.....	77
Figura 38. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína MEK1/2	77

Figura 39. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína p-mTOR.....	78
Figura 40. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína p-NF-κB.....	78
Figura 41. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína NF-κB.....	79
Figura 42. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína NF-κB acetilada.....	79
Figura 43. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína SIRT1	80
Figura 44. Membrana de <i>western blot</i> representativa de la proteína α-tubulina	80
Figura 45. Parámetros fisiológicos generales en el tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas ...	88
Figura 46. Variación del peso en el tratamiento crónico con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas.....	89
Figura 47. Efecto agudo sobre la memoria de trabajo en la prueba de laberinto radial de los tratamientos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina	91
Figura 48. Efecto sobre la memoria de trabajo del tratamiento crónico con resveratrol en ratas adultas..	92
Figura 49. Efecto sobre la memoria de trabajo del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas....	93
Figura 50. Efecto sobre la memoria episódica del tratamiento crónico con resveratrol en ratas adultas... 95	
Figura 51. Efecto sobre la memoria episódica del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas	96
Figura 52. Efecto sobre la memoria de trabajo del tratamiento crónico con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas	97
Figura 53. Efecto sobre la memoria episódica de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina	99
Figura 54. Efectos sobre la memoria espacial y aprendizaje del tratamiento crónicos con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas	101
Figura 55. Efecto sobre la coordinación motora en el <i>rotarod</i> del tratamiento crónico con resveratrol en ratas adultas	102
Figura 56. Efecto sobre la coordinación motora en el <i>rotarod</i> , del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas	103
Figura 57. Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas en el aparato de <i>rotarod</i>	104
Figura 58. Efecto crónico del tratamiento con resveratrol en ratas viejas en el sistema catecolaminérgico de hipocampo y estriado.....	106
Figura 59. Efecto crónico del tratamiento con resveratrol en ratas viejas en los niveles de DA en hipocampo y NA en estriado.....	107
Figura 60. Efecto crónico del tratamiento con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas en la acumulación de DOPA y en el contenido en NA en el hipocampo; y niveles de DOPA, DA y HVA en estriado	109
Figura 61. Efecto crónico del tratamiento con resveratrol en ratas viejas, en el sistema serotoninérgico de hipocampo, estriado y glándula pineal	111
Figura 62. Efecto crónico del tratamiento con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas, en el sistema serotoninérgico de hipocampo, estriado y glándula pineal, en la acumulación de 5-HTP contenido en 5-HT y su metabolito 5-HIAA	113

Figura 63. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de p-Akt, Akt y p-Akt/Akt en hipocampo y corteza parietal.....	116
Figura 64. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de p-mTOR en hipocampo y corteza parietal.....	117
Figura 65. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de p-MEK1/2, MEK1/2, p-MEK1/2 respecto MEK1/2, p-ERK1/2, ERK1/2 y p-ERK1/2 respecto ERK1/2 en hipocampo.....	120
Figura 66. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad en el hipocampo de rata de p-NF-κB, NF-κB acetilada, NF-κB, p-NF-κB/NF-κB y NF-κB acetilada/NF-κB.....	123
Figura 67. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad en hipocampo de rata de SIRT1 (110 kDa) y su fragmento de 75 kDa.....	125
Figura 68. Índice de fragmentación de la proteína SIRT1 de 110 kDa en el fragmento de 75 kDa en hipocampo de ratas tratadas con resveratrol.....	126
Figura 69. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de SIRT1 (110 kDa) y SIRT1 (75 kDa) en estriado, corteza frontal y corteza parietal.....	128
Figura 70. Índice de fragmentación de la proteína SIRT1 de 110 kDa en el fragmento de 75 kDa, en estriado, corteza frontal y corteza parietal de ratas tratadas con resveratrol.....	129
Figura 71. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de SIRT1 (110 kDa) y su fragmento de 75 kDa en hipocampo.....	131
Figura 72. Índice de fragmentación de la proteína SIRT1 de 110 kDa en el fragmento de 75 kDa en hipocampo de ratas jóvenes, viejas y viejas tratadas de forma crónica con silimarina, quercetina, y naringenina.....	132
Figura 73. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con silimarina, quercetina y naringenina en hipocampo de ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de NF-κB acetilada, NF-κB total, y la relación entre ambas formas.....	134
Figura 74. Efectos del envejecimiento y de los tratamientos crónicos con polifenoles en hipocampo sobre la inmunoreactividad de SIRT1 (110 kDa) y su fragmento de 75 kDa.....	136
Figura 75. Efectos del envejecimiento y de los tratamientos crónicos con polifenoles en hipocampo sobre la inmunoreactividad de NF-κB acetilada, NF-κB y NF-κB acetilada respecto NF-κB.....	138
Figura 76. Correlación entre los niveles de inmunoreactividad de NF-κB acetilada y NF-κB en hipocampo de ratas tratadas con polifenoles.....	139
Figura 77. Correlación entre los niveles de inmunoreactividad de SIRT1 (110 kDa), NF-κB acetilada y NF-κB total en hipocampo de ratas viejas tratadas con polifenoles.....	140
Figura 78. Esquema del posible mecanismo de acción de los polifenoles en el envejecimiento.....	163

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de resveratrol en algunos alimentos	30
Tabla 2. Contenido de silimarina en algunos alimentos	31
Tabla 3. Contenido de quercetina en algunos alimentos.....	32
Tabla 4. Contenido de naringenina en algunos alimentos	33
Tabla 5. Composición de la dieta estándar A04 Panlab.....	49
Tabla 6. Fármacos antioxidantes, nomenclatura y estructura química	73
Tabla 7. Nomenclatura y estructura química del NSD 1015	74

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Envejecimiento	3
1.1.1 Datos poblacionales	3
1.1.2 Concepto de envejecimiento	4
1.1.3 Teorías del envejecimiento: teoría del estrés oxidativo	5
1.1.4 Características generales del envejecimiento	7
1.1.5 Características del envejecimiento a nivel cerebral	10
1.1.5.1 Declive cognitivo y motor.....	10
1.1.5.2 Características estructurales	13
1.1.5.3 Características neurofisiológicas	14
1.1.6 Influencia del envejecimiento en los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos involucrados en los procesos cognitivos	14
1.1.6.1 Función del sistema catecolaminérgico en los procesos de memoria y aprendizaje. Influencia del envejecimiento	15
1.1.6.2 Función del sistema serotoninérgico en los procesos de memoria y aprendizaje. Influencia del envejecimiento	19
1.1.7 Neuroinflamación y envejecimiento	21
1.2 Antioxidantes en la prevención del envejecimiento cerebral.....	27
1.2.1 Polifenoles: clasificación y propiedades	28
1.2.1.1 Resveratrol	29
1.2.1.2 Silimarina.....	30
1.2.1.3 Quercetina	31
1.2.1.4 Naringenina.....	32
1.2.2 Mecanismo de acción de las sirtuínas y su relación con los polifenoles	33
2. Hipótesis y objetivos	43
3. Materiales y métodos.....	47
3.1 Animales de experimentación.....	49
3.2 Tratamientos farmacológicos.....	50
3.3 Análisis conductual (pruebas comportamentales).....	52
3.3.1 Laberinto radial.....	52
3.3.2 Reconocimiento de objetos	54
3.3.3 Laberinto de Barnes	56
3.3.4 Rotarod (cilíndro rotatorio).....	59
3.4 Determinación cromatográfica de la actividad tirosina hidroxilasa (síntesis de DOPA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HTP) <i>in vivo</i>	60
3.4.1 Disección y preparación de muestras	61

3.4.2 Análisis cromatográfico	62
3.5 Detección y cuantificación de la inmunoreactividad de proteínas mediante la técnica de <i>western blot</i>	64
3.5.1 Preparación de las muestras	64
3.5.2 Determinación del contenido proteico de las muestras. Método del ácido biciconínico (BCA)..	64
3.5.3 Electroforesis	65
3.5.4 Electrotransferencia (<i>western blot</i>)	67
3.5.5 Sistema de detección.....	69
3.5.6 Cuantificación fotodensitométrica	70
3.6 Análisis matemático de los resultados	72
3.7 Fármacos y otros reactivos	73
3.7.1 Fármacos.....	73
3.7.2 Anticuerpos.....	75
3.7.3 Otros reactivos	81
4. Resultados	83
4.1 Parámetros fisiológicos generales de los animales de experimentación	86
4.2 Efectos de los tratamientos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre la conducta en ratas viejas	90
4.2.1 Efecto agudo en ratas viejas de los tratamientos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre la memoria de trabajo (laberinto radial)	90
4.2.2 Efecto del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas adultas y viejas sobre la memoria de trabajo (laberinto radial).....	91
4.2.3 Efecto del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas adultas y viejas sobre la memoria episódica (reconocimiento de objetos).....	94
4.2.4 Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas sobre la memoria de trabajo (laberinto radial).....	96
4.2.5 Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas sobre la memoria episódica (reconocimiento de objetos).....	98
4.2.6 Efecto del envejecimiento y de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas sobre la memoria espacial y aprendizaje (laberinto de Barnes).....	100
4.2.7 Efecto del envejecimiento y de los tratamientos crónicos con resveratrol en ratas adultas y viejas sobre la coordinación motora (<i>rotarod</i>).....	102
4.2.8 Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas sobre la coordinación motora (<i>rotarod</i>).....	103
4.3 Efectos de los tratamientos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre los sistemas monoaminérgicos en ratas viejas	105
4.3.1 Efecto del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol sobre la síntesis de catecolaminas en el cerebro de ratas viejas.....	105

4.3.2 Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina sobre la síntesis de catecolaminas en el cerebro de ratas viejas	108
4.3.3 Efecto del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol sobre la síntesis serotoninérgica en el cerebro de ratas viejas	110
4.3.4 Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina sobre la síntesis serotoninérgica en el cerebro de rata vieja	111
4.4 Efectos de los tratamientos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre proteínas implicadas en el envejecimiento	114
4.4.1 Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR	114
4.4.2 Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre vías de señalización implicadas en neuroinflamación.....	118
4.4.2.1 Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre la vía de señalización de MAPK/ERK.....	118
4.4.2.2 Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol sobre la vía de señalización de NF- κ B.....	121
4.4.3 Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre la enzima desacetilasa SIRT1.....	124
4.4.4 Efecto del tratamiento crónico con silimarina, quercetina y naringenina en hipocampo de ratas viejas sobre la enzima desacetilasa SIRT1	129
4.4.5 Efecto del tratamiento crónico con silimarina, quercetina y naringenina sobre la acetilación de la proteína NF- κ B en hipocampo de ratas viejas	132
4.4.6 Correlación entre los niveles de las proteínas SIRT1 y NF- κ B durante el envejecimiento y tras los tratamientos con polifenoles	135
5. Discusión	141
5.1 Estandarización de las condiciones experimentales y seguimiento de parámetros fisiológicos generales	144
5.2 Efectos del envejecimiento y de los tratamientos con polifenoles en los procesos cognitivos y motores	145
5.3 Efectos del envejecimiento y de los tratamientos con polifenoles sobre los sistemas monoaminérgicos	149
5.4 Efectos del envejecimiento y de los polifenoles sobre los niveles de proteínas de vías de señalización implicadas en envejecimiento e inflamación	152
5.5 Consideraciones finales y direcciones futuras	164
6. Conclusiones.....	169
7. Anexos	173
8. Bibliografía.....	189

RESUMEN

El desarrollo de la medicina y la tecnología ha favorecido el incremento de la proporción de población longeva a nivel mundial. Este contexto demográfico ha generado la necesidad de comprender mejor los cambios que ocurren a nivel cerebral durante el envejecimiento, así como de encontrar estrategias encaminadas a prevenir, retrasar y atenuar sus consecuencias. Aunque no se conocen bien todos los mecanismos moleculares implicados en el proceso de envejecimiento, se ha señalado como causas fundamentales el estrés oxidativo y la activación de la inflamación. En este sentido, los polifenoles, dadas sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, pueden ser moléculas claves para contribuir a la prevención del envejecimiento. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos protectores de los tratamientos con polifenoles sobre los cambios que ocurren durante el envejecimiento a nivel cerebral, así como analizar los mecanismos de acción implicados. Para ello se realizaron diversos tratamientos crónicos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas. Durante los tratamientos se realizaron diferentes pruebas comportamentales para analizar los efectos a nivel cognitivo y motor, comparando los resultados con los de ratas jóvenes y viejas control. Después de los tratamientos y sacrificio de los animales, se analizaron: mediante HPLC con detección electroquímica, la síntesis y acumulación de neurotransmisores monoaminérgicos implicados en los procesos cognitivos y motores; y mediante *western blot*, los niveles de inmunoreactividad de diferentes proteínas/vías de señalización (PI3K/Akt/mTOR, MEK/ERK, NF- κ B y SIRT1) implicadas en envejecimiento y/o inflamación. Se comprobó que el envejecimiento genera deterioro cognitivo y motor, que está ocasionado en parte por un declive en los sistemas monoaminérgicos centrales, así como por cambios en los niveles de proteínas relacionadas con envejecimiento e inflamación. Se comprobó que estos cambios son contrarrestados por los tratamientos crónicos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina. Estos compuestos actúan como antioxidantes y antiinflamatorios, restaurando los niveles de los principales neurotransmisores monoaminérgicos, así como regulando los niveles de proteínas claves en el proceso de envejecimiento y neuroinflamación como SIRT1 y NF- κ B, en regiones cerebrales fundamentales para la correcta funcionalidad de los procesos cognitivos y motores.

RESUM

El desenvolupament de la medicina i la tecnologia ha afavorit l'increment de la proporció de població longeva a nivell mundial. Aquest context demogràfic ha generat la necessitat de comprendre millor els canvis que ocorren a nivell cerebral durant l'envelliment, així com de trobar estratègies encaminades a prevenir, retardar i atenuar les seves conseqüències. Encara que no es coneixen bé tots els mecanismes moleculars implicats en el procés d'envelliment, s'han assenyalat com a causes fonamentals l'estrès oxidatiu i l'activació de la inflamació. En aquest sentit, els polifenols, donades les seves propietats antioxidants i antiinflamatòries, poden ser molècules claus per contribuir a la prevenció de l'envelliment. L'objectiu d'aquest treball va ser determinar els efectes protectors dels tractaments amb polifenols sobre els canvis que ocorren durant l'envelliment a nivell cerebral, així com analitzar els mecanismes d'acció implicats. Per a això es van realitzar diversos tractaments crònics amb els polifenols resveratrol, silimarina, quercetina i naringenina en rates velles. Durant els tractaments es van realitzar diferents proves comportamentals per analitzar els efectes a nivell cognitiu i motor, comparant els resultats amb els de rates joves i velles control. Després dels tractaments i sacrifici dels animals, es van analitzar: mitjançant HPLC amb detecció electroquímica, la síntesi i acumulació de neurotransmissors monoaminèrgics implicats en els processos cognitius i motors; i mitjançant *Western blot*, els nivells de immunoreactivitat de diferents proteïnes/vies de senyalització (PI3K/Akt/mTOR, MEK/ERK, NF- κ B i SIRT1) implicades en envelliment i/o inflamació. Es va comprovar que l'envelliment genera deteriorament cognitiu i motor, que està ocasionat en part per un declivi en els sistemes monoaminèrgics centrals, així com per canvis en els nivells de proteïnes relacionades amb envelliment i inflamació. Es va comprovar que aquests canvis són contrarestats pels tractaments crònics amb resveratrol, silimarina, quercetina i naringenina. Aquests compostos actuen com a antioxidants i antiinflamatòries, restaurant els nivells dels principals neurotransmissors monoaminèrgics, així com regulant els nivells de proteïnes claus en el procés d'envelliment i neuroinflamació com SIRT1 i NF- κ B, en regions cerebrals fonamentals per a la correcta funcionalitat dels processos cognitius i motors.

ABSTRACT

The development of medicine and technology has helped to increase the proportion of the aging population worldwide. This demographic context has created the need to better understand the changes that occur in the brain during aging and to find strategies to prevent, delay and mitigate its consequences. Although not all the molecular mechanisms involved in the aging process are well known, oxidative stress and activation of inflammation have been identified as the leading causes. In this regard, the polyphenols due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, may be key molecules contributing to the prevention of aging. The aim of this study was to determine the protective effects of the treatments with polyphenols on the changes that occur during aging in the brain, and to analyze the mechanisms of the action involved. Various chronic treatments were carried out with the polyphenols resveratrol, silymarin, quercetin and naringenin in old rats. Different behavioral tests were performed during treatments in order to analyze the effects at a cognitive and motor level, comparing the results with those of young and old control rats. After treatments and the sacrifice of animals it was analyzed: the synthesis and accumulation of monoamine neurotransmitters involved in cognitive and motor processes, by HPLC with electrochemical detection; and the immunoreactivity levels of different protein/signaling pathways (PI3K/Akt/mTOR, MEK/ERK, NF- κ B and SIRT1) involved in aging and/or inflammation, by Western blot. It was found that aging generates cognitive and motor impairment, which is caused in part by a decline in the central monoaminergic systems, as well as changes in the levels of proteins related to aging and inflammation. It was found that these changes are reversed by chronic treatment with resveratrol, silymarin, quercetin and naringenin. These compounds act as antioxidants and anti-inflammatories, restoring the levels of the major monoaminergic neurotransmitters and regulating the levels of key proteins in the aging process and neuroinflammation such as SIRT1 and NF- κ B in brain regions critical for accurate functionality of cognitive and motor processes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENVEJECIMIENTO

1.1.1 Datos poblacionales

Durante las últimas décadas, como consecuencia del desarrollo científico y tecnológico se ha producido un aumento de la esperanza de vida. Este hecho unido a la disminución en la tasa de fecundidad ha generado en casi todos los países una inversión de la tendencia demográfica (Imsero, 2014) (**Figura 1**). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de Naciones Unidas en el informe *World Population Prospects: The 2012 Revision*, en la última década la proporción de personas mayores de 60 años se ha incrementado más rápidamente que cualquier otro grupo de edad. La OMS prevé que, entre 2000 y 2050, la población mundial mayor de 60 años se triplicará y pasará de 600 millones a 2000 millones. Otra de las tendencias previstas es la del denominado *envejecimiento de la población mayor* o también *envejecimiento del envejecimiento*. Este término hace referencia al incremento de la población más anciana, es decir, la que supere los 80 años. Según la misma fuente en 2050 habrá en el mundo cerca de 400 millones de personas con 80 años o más (**Figura 2**).

El envejecimiento de la población, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, es un indicador de la mejora de la salud en el mundo. Este fenómeno tiene consecuencias directas para la sociedad, ya que por un lado las personas de edad realizan importantes contribuciones a la sociedad, pero por otro lado supone un importante desafío sanitario, como por ejemplo la necesidad de mejorar la atención tanto a nivel sanitario como social; así como encontrar estrategias para prevenir y tratar las enfermedades crónicas asociadas a la edad, y el deterioro fisiológico que acompaña al envejecimiento.

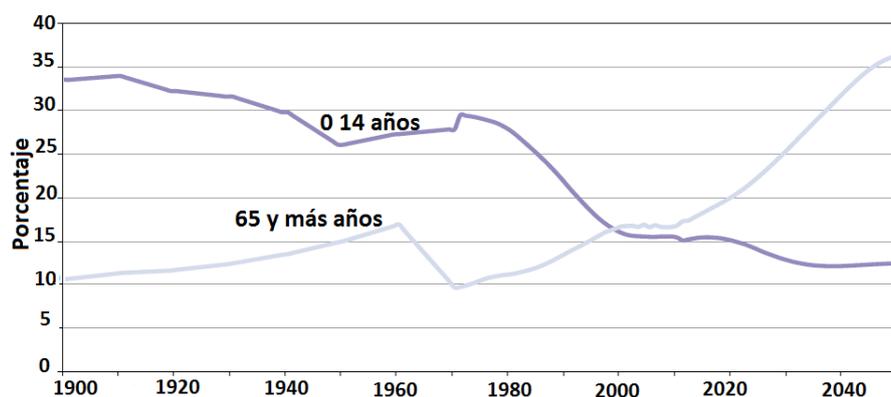


Figura 1. Inversión de la tendencia demográfica en España, 1900-2050. Las proyecciones de población (2020-2050) están calculadas a partir de la población a 1 de enero de 2012 (Imsero, 2014).

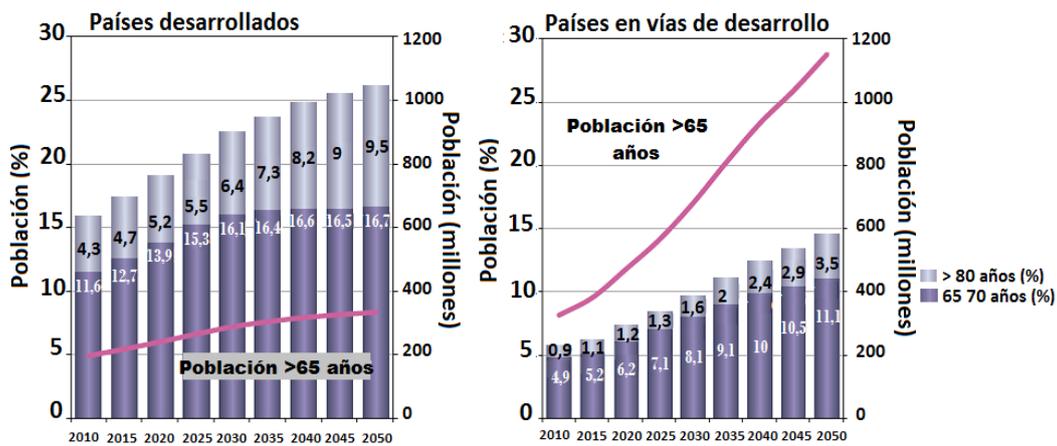


Figura 2. Población mayor de 65 años en países desarrollados y en vías de desarrollo, 2010-2050 (millones y porcentaje). Se trata de una proyección (Imsero, 2014).

Además, la OMS en el mismo informe, destaca que más del 20 % de los adultos que pasan de los 60 años sufren de un trastorno mental o neurológico. Por lo que, a nivel poblacional el envejecimiento cerebral tiene destacadas consecuencias. Los trastornos neuropsiquiátricos más comunes son la demencia y la depresión, siendo un 6,6 % de las personas mayores de 60 años diagnosticadas con incapacidad total, a causa de este tipo de trastornos. De esta forma el declive cognitivo se ha convertido en una de las principales amenazas contra la salud durante el envejecimiento (Bishop y cols., 2010).

1.1.2 Concepto de envejecimiento

Hasta el momento no existe una definición universalmente aceptada del proceso de envejecimiento. Sin embargo, en términos generales el envejecimiento se puede definir como el declive funcional dependiente del tiempo que afecta a la mayoría de los organismos vivos (López-Otín y cols., 2013). Es un proceso universal en la naturaleza, complejo y multifactorial que además de causar una progresiva pérdida de funcionalidad, aumenta el riesgo de muerte (revisión sobre envejecimiento de Viña y cols., 2007). En esta misma revisión se define el proceso de envejecimiento a partir de las siguientes características: 1) es *universal*: cualquier fenómeno asociado con el envejecimiento ocurre en diferentes grados en todos los individuos de una especie. 2) es *intrínseco*: las causas que son el origen del envejecimiento deben ser endógenas; no deben depender de factores extrínsecos. 3) es *progresivo*: Los cambios que conducen al envejecimiento deben ocurrir gradualmente a lo largo de la vida (deben también ocurrir en individuos jóvenes, aunque sea en una pequeña proporción). 4) El envejecimiento es *perjudicial*, es decir, un fenómeno asociado al envejecimiento sólo se considerará como parte del proceso de envejecimiento si es nocivo para el individuo.

La ciencia ha experimentado un avance sin precedentes en los últimos años, y hoy en día, la investigación sobre el envejecimiento está encaminada a profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables de este proceso a nivel molecular y celular, y al estudio de las enfermedades asociadas a esta etapa de la vida (López-Otín y cols., 2013).

1.1.3 Teorías del envejecimiento: teoría del estrés oxidativo

En el estudio del envejecimiento además de la búsqueda de una definición correcta de este proceso, existen teorías que intentan dar una explicación de las causas de este fenómeno. Más de 300 teorías se han postulado sobre el envejecimiento (Medvedev, 1990). Estas teorías pretenden llegar a la comprensión del fenómeno del envejecimiento y explicar el deterioro fisiológico que parece estar asociado a una acumulación de fallos en diversos componentes biológicos.

Entre estas teorías, *la teoría del estrés oxidativo o de los radicales libres del envejecimiento* (Harman, 1956) es una de las más aceptadas, por lo que a continuación profundizaremos en este tema. Esta teoría está relacionada con el proceso de respiración celular, por tanto para comprenderla debemos recordar que durante la respiración celular las mitocondrias de los organismos aeróbicos generan adenosina trifosfato (ATP) a partir de la fosforilación oxidativa. Durante este proceso el oxígeno molecular se reduce formando agua. Cada átomo de oxígeno captura 2 electrones, por tanto 4 electrones por cada oxígeno molecular. Así cada O_2 captura $4 H^+$ y $4 e^-$ dando lugar a $4 H_2O$. El punto clave radica en la captura del primer electrón donde se forma el radical superóxido $O_2^{\bullet-}$. Durante este proceso se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno (Reiter y cols., 2001), que son moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Los principales ROS son el ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) (Ihara y cols., 1997). Durante la respiración celular la mitocondria consume el 90 % del oxígeno captado por la célula, lo que le convierte en una gran fuente de ROS. Por ejemplo, en un estado fisiológico normal durante la respiración celular entre el 1 y el 5 % del oxígeno captado por la célula es convertido en radicales $O_2^{\bullet-}$ (Boveris y cols., 1972). Estos ROS son intermediarios normales de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, pero cuando ocurre una producción excesiva los ROS pueden provocar daño oxidativo en proteínas, lípidos y en el ácido desoxirribonucleico (ADN), en un proceso conocido como *estrés oxidativo* que se cree que podría ser uno de los causantes del envejecimiento y muerte celular (Alexeyev y cols., 2004). Para evitar el daño existen mecanismos de defensa que están basados en enzimas antioxidantes especializadas como por ejemplo la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión reductasa, que neutralizan estos ROS. Teniendo en cuenta todo lo anterior, la teoría del estrés oxidativo propone la hipótesis de que el envejecimiento es el resultado de una disfunción mitocondrial progresiva causada por

un aumento de la producción de ROS, y por tanto por un aumento del estrés oxidativo, sin los niveles adecuados de defensas antioxidantes (Harman, 1956). Debido a su estructura química las sustancias lipídicas como el colesterol o los ácidos grasos poliinsaturados, son unas de las principales afectadas por el estrés oxidativo. En este sentido, los ROS inducen peroxidación lipídica, generando cambios estructurales en las mitocondrias, y acumulación de productos de peroxidación lipídica (Sies, 1997; Negre-Salvayre y cols., 2010).

En combinación con la teoría del estrés oxidativo, es necesario introducir el concepto de *mitohormesis* según el cual niveles moderados de ROS pueden activar los sistemas de defensa induciendo una respuesta adaptativa que contribuye a la homeostasis y a la supervivencia del organismo; por el contrario y en concordancia con la teoría del estrés oxidativo, altos niveles de ROS causan daño celular y envejecimiento (Calabrese y cols., 2011; Ristow y Schmeisser 2014; Yun y Finkel, 2014) (**Figura 3**). En este sentido, algunos trabajos recientes parecen indicar que niveles moderados de ROS pueden prolongar la esperanza de vida en levaduras y *C. elegans* (Doonan y cols., 2008; Van Raamsdonk y Hekimi, 2009; Mesquita y cols., 2010). Es por ello que, modificaciones genéticas o mutaciones espontáneas, en diversos organismos, que aumenten la resistencia al estrés oxidativo pueden incrementar la longevidad (Ristow y cols., 2010). Estos y otros datos han abierto el camino a una reconsideración del papel de ROS en el envejecimiento. En la misma línea existen estudios que sugieren que sustancias como la metformina y el resveratrol actuarían como venenos mitocondriales, induciendo un nivel moderado de estrés que activaría los mecanismos de defensa celulares prolongando la vida (Hawley y cols., 2010).

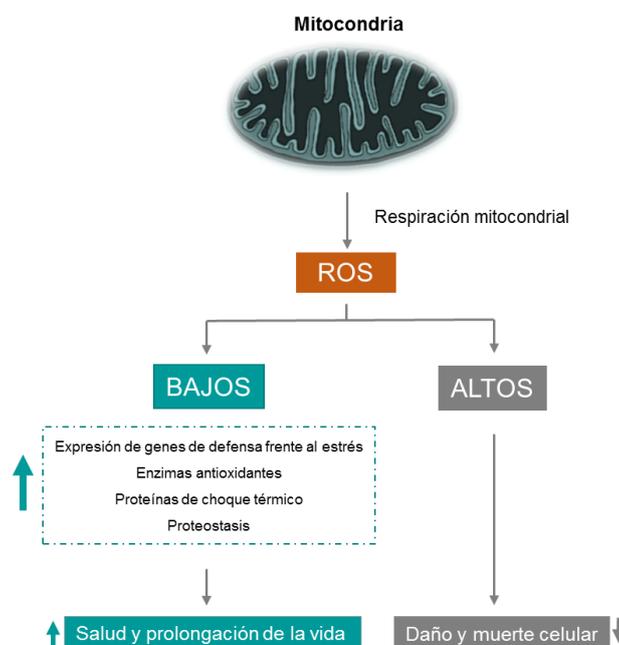


Figura 3. Esquema representativo del concepto de mitohormesis. Niveles altos de ROS causan daño celular dando lugar a muerte celular, mientras que niveles bajos son capaces de activar mecanismos que median en respuestas adaptativas que pueden prolongar la vida.

1.1.4 Características generales del envejecimiento

En el envejecimiento de diferentes organismos, con especial énfasis en el envejecimiento de los mamíferos, además de producirse estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, a nivel celular y molecular se pueden identificar las siguientes características comunes: *inestabilidad genómica*, *acortamiento de los telómeros*, *senescencia celular replicativa*, *reducción del número de células madre*, *alteraciones epigenéticas*, *pérdida de proteostasis*, *alteración de la comunicación celular* y *desregulación del estado energético y nutricional*. Estas características cumplen los siguientes requisitos: 1) tienen lugar durante el envejecimiento normal, 2) su empeoramiento de forma experimental acelera el envejecimiento y 3) su mejoría experimental retarda el proceso de envejecimiento normal y por lo tanto incrementa la esperanza de vida. Para cada una de las características comentadas, este conjunto de requisitos ideales se cumple en diversos grados. La complejidad deriva de la interconexión existente entre todas ellas (López-Otín y cols., 2013).

A continuación comentaremos brevemente cada una de estas características, así como la relación existente entre ellas. El envejecimiento se caracteriza por la ***inestabilidad genómica***: la acumulación de daño a nivel genético durante la vida es una característica general del envejecimiento (Moskalev y cols., 2012). La integridad y estabilidad del ADN se ven desafiados por la acción continua de agentes exógenos físicos, químicos y biológicos, así como por las amenazas endógenas, incluyendo errores de replicación de ADN, reacciones hidrolíticas espontáneas y el propio fenómeno de estrés oxidativo comentado anteriormente (Hoeijmakers, 2009). Para minimizar estas lesiones, los organismos han desarrollado una gran variedad de mecanismos de reparación del ADN que sinérgicamente son capaces de hacer frente a la mayor parte de los daños causados en el ADN (Lord y Ashworth, 2012). Sin embargo, todas estas amenazas provocan mutaciones puntuales, translocaciones cromosómicas, deleciones y duplicaciones o adiciones, integración de ADN procedente de virus o transposones y ***acortamiento de los telómeros***. Los telómeros son secuencias especializadas de ADN que se encuentran en el extremo de los cromosomas. Los telómeros contienen muchas repeticiones en tándem de secuencias cortas, reconocidas por la telomerasa que rellena estas secuencias cada vez que la célula se divide. La actividad telomerasa mantiene la longitud de los telómeros. Sin embargo, existen tipos celulares en los cuales la actividad de la telomerasa disminuye de modo que cada vez que la célula se divide pierde nucleótidos del extremo hasta que los cromosomas son defectuosos y las células ya no pueden dividirse. Esto es lo que se denomina ***senescencia celular replicativa*** (Campisi 1997). Se ha observado acortamiento de los telómeros durante el envejecimiento normal, tanto en humanos como en ratones (Blackburn y cols., 2006; Blasco, 2007). Se considera que el acortamiento de los telómeros es uno de los causantes de la senescencia celular, que es la interrupción del ciclo celular acompañado de cambios fenotípicos estereotipados

(Hayflick y Moorhead, 1961). Debido a que el número de células senescentes aumenta con el envejecimiento, se ha asumido que la senescencia contribuye al envejecimiento. Aunque el propósito principal de la senescencia es prevenir la propagación de las células dañadas y activar su desaparición por medio del sistema inmune, en los organismos de edad el sistema de reposición de células dañadas puede llegar a ser ineficaz; resultando en la acumulación de células senescentes que pueden agravar los daños y contribuir al envejecimiento. En los últimos años, se ha apreciado que las células senescentes manifiestan alteraciones dramáticas en su secretoma, convirtiéndose en un secretoma proinflamatorio, que produce citoquinas que contribuyen al proceso de envejecimiento dando lugar a inflamación (se profundizará sobre este aspecto en el apartado *1.1.7 Neuroinflamación y envejecimiento*) (Kuilman y cols., 2010; Rodier y Campisi, 2011). Durante el envejecimiento debido al aumento de la senescencia por los procesos ya explicados, se produce una **reducción del número de células madre**, así por ejemplo hay una disminución en la producción de células que participan en las respuestas inmunitarias, un proceso que se denomina inmunosenescencia (Shaw y cols., 2010). Además durante el envejecimiento así como se observa inestabilidad genómica también se producen **alteraciones epigenéticas**: los cambios epigenéticos implican alteraciones en los patrones de metilación del ADN, así como modificaciones postraduccionales de las histonas (metilación, desmetilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación entre otras), afectando a la remodelación de la cromatina (Greer y cols., 2010; Siebold y cols., 2010).

El envejecimiento no solo se caracteriza por cambios genéticos y epigenéticos, también es característico de esta etapa la **pérdida de proteostasis**, que es la pérdida de la homeostasis de las proteínas (Powers y cols., 2009). La proteostasis implica los siguientes mecanismos: estabilización de proteínas correctamente plegadas, regulación de la familia de las proteínas de choque térmico y mecanismos de degradación de proteínas mal plegadas o dañadas por medio del sistema ubiquitina-proteosoma y del sistema lisosomal de autofagia (Mizushima y cols., 2008; Hartl y cols., 2011; Koga y cols., 2012). Durante el envejecimiento se produce una inadecuada función de estos sistemas, que puede ocasionar una acumulación de agregados proteicos tóxicos (Bishop y cols., 2010), contribuyendo al desarrollo de algunas patologías relacionadas con la edad, tales como la enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, entre otras (Powers y cols., 2009).

Todas estas alteraciones descritas anteriormente pueden poner en riesgo los tejidos y la homeostasis del organismo. Otras características del envejecimiento son la **alteración de la comunicación celular**, como por ejemplo la desregulación neurohormonal o la señalización neuronal (Russell y Kahn, 2007; Laplante y Sabatini, 2012; Rando y Chang, 2012; Zhang y cols., 2013); y la **desregulación del estado energético y nutricional**, en el que se ven afectados los

sistemas detectores de nutrientes como la vía de señalización de la insulina (IIS) que participa en la detección de glucosa y la diana de rapamicina en célula de mamíferos (mTOR) que detecta altas concentraciones de aminoácidos, ambas vías regulan el metabolismo anabólico (Laplante y Sabatini, 2012). También se producen alteraciones en los sensores de nutrientes que señalan escasez y catabolismo de nutrientes como son la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) que detecta bajos niveles de energía mediante la detección de altos niveles de AMP y las sirtuínas (SIRT), en especial SIRT1, que detectan los estados de baja energía mediante la detección de altos niveles de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y actúan en la dirección opuesta de IIS y mTOR (Houtkooper y cols., 2010). Estas vías están interconectadas y relacionadas con el envejecimiento, por lo que cambios en ellas se han relacionado con el envejecimiento prematuro, tanto en organismos modelo como en humanos (Fontana y cols., 2010; Kenyon, 2010; Barzilai y cols., 2012). Por ejemplo, se ha observado que la inhibición de mTOR quinasa prolonga la vida en levadura, gusanos y moscas (Johnson y cols., 2013). AMPK tiene múltiples efectos sobre el metabolismo como por ejemplo inhibe mTOR (Alers y cols., 2012). Por su parte SIRT1 puede producir respuestas metabólicas complejas como por ejemplo aumentar la mitocondriogenesis (Rodgers y cols., 2005), mejorar las defensas antioxidantes, y reducir la oxidación de ácidos grasos lo que favorece la longevidad (Fernández-Marcos y Auwerx, 2011) (se profundizará sobre SIRT en el apartado *1.2.2 Mecanismo de acción de las sirtuínas y su relación con los polifenoles*). Además se ha descrito que SIRT1 y AMPK pueden participar en un circuito de retroalimentación positiva, conectando así los dos sensores de estados de baja energía para dar una respuesta unificada (Price y cols., 2012). En conjunto, las investigaciones disponibles hasta el momento apoyan firmemente la idea de que la señalización anabólica acelera el envejecimiento y la disminución de la señalización de nutrientes extiende la longevidad (Fontana y cols., 2010).

Finalmente, estas características a nivel molecular y celular en conjunto favorecen la pérdida de la homeostasis frente a los cambios en el ambiente externo, dando lugar a cambios característicos del envejecimiento en órganos y sistemas (Viña y cols., 2007). Citaremos algunos ejemplos: durante el envejecimiento disminuye la capacidad para soportar situaciones generales de estrés, como por ejemplo disminuye la capacidad de soportar temperaturas extremas (Chester y Rudolph, 2011). El funcionamiento del sistema inmunitario es deficiente y esto da lugar a un aumento tanto de enfermedades autoinmunes, así como un aumento de la susceptibilidad a las infecciones, acompañado de una disminución de la filtración glomerular en los riñones, falta de ventilación pulmonar, y disminución del flujo sanguíneo (Chester y Rudolph, 2011). La mayoría de los órganos vitales sufren fenómenos asociados a la atrofia o degeneración, sobretodo el cerebro, corazón y sistema muscular. De esta forma, hay falta de coordinación motora, acompañado de pérdida de fuerza y elasticidad del sistema muscular (Darling y cols., 1989; Contreras-Vidal y

cols., 1998; Seidler y cols., 2010). A nivel de los órganos de los sentidos, el envejecimiento se caracteriza por pérdidas en la visión, y en la capacidad auditiva, que también influyen en los fallos a nivel cognitivo, como son los fallos en la memoria, característicos del envejecimiento (Peters y cols., 2002; Wilson y cols., 2006). Por otra parte, el envejecimiento provoca una degradación del material intercelular. Por ejemplo, hay una disminución en el número de fibras elásticas, así como enlaces transversales de fibras de colágeno en la dermis (Brun y cols., 2015). La incidencia de patologías como el cáncer aumenta exponencialmente con la edad, y lo mismo ocurre con la incidencia de enfermedades degenerativas, de las cuales las neurodegenerativas son las más destacadas (Kennedy y cols., 2012).

1.1.5 Características del envejecimiento a nivel cerebral

Antes de explicar las características del envejecimiento a nivel cerebral hay que destacar que el cerebro es una de las estructuras que acumulan más estrés oxidativo con la edad (Möller y cols., 2010). Algunas de las razones principales de este fenómeno se deben a que en el cerebro hay un elevado consumo de oxígeno necesario para mantener un alto rendimiento energético, un mayor número de mitocondrias, abundante óxido nítrico (NO) y membranas celulares ricas en ácidos grasos poliinsaturados, que son fácilmente peroxidados, fenómeno que se ve agravado por una falta de niveles adecuados de defensas y sistemas antioxidantes (que también disminuyen a causa del estrés oxidativo) (Sohal 1990 a y b, Coyle 1993, Reiter 1998 b, Mariani, 2005, Freeman, 2012). Todo ello puede contribuir a la acumulación del daño neuronal con la edad (Yanker y cols., 2008). Por este motivo el estrés oxidativo es considerado en numerosos estudios como un colaborador importante para el desarrollo y la patogénesis de una amplia variedad de enfermedades neurodegenerativas, así como en el deterioro cognitivo relacionado con la edad (Bishop y cols., 2010). A continuación se resumirán las principales características del envejecimiento a nivel cerebral.

1.1.5.1 Declive cognitivo y motor

Se ha observado que durante el envejecimiento se produce un declive a nivel cognitivo y motor. La **función motora** sufre un deterioro caracterizado por la pérdida de fuerza muscular, disminución del equilibrio (Darling y cols., 1989; Contreras-Vidal y cols., 1998) y coordinación (Seidler y cols., 2010), debido a disfunciones del sistema nervioso central y periférico, así como del sistema neuromuscular (Diggles-Buckles, 1993). La falta de equilibrio y los problemas al andar son algunas de las causas principales de morbilidad en el envejecimiento (Alexander y cols., 1992). La cantidad de movimientos disminuye un 15-30 % con la edad (Diggles-Buckles, 1993). Esta disminución parece ser una estrategia en los individuos adultos para ganar exactitud en los movimientos a cambio de perder velocidad (Seidler-Dobrin y Stelmach, 1998). La lentitud para

procesar información también afecta la actividad motora debido a un incremento del ruido neural y otros cambios sinápticos (Salthouse y Somberg, 1982; Salthouse, 1993).

Junto con el declive en la actividad motora también se produce un deterioro en las funciones cognitivas. Las funciones cognitivas más afectadas por la edad son la atención, la memoria, y el aprendizaje. Estas funciones dependen de la percepción, que aunque es considerada como una función precognitiva muestra un declive relacionado con la edad atribuible a los problemas que ocurren en los órganos de los sentidos (Peters y cols., 2002). El deterioro en la percepción, atención y memoria afecta negativamente a otras funciones cognitivas más complejas como el aprendizaje (Wilson y cols., 2006; Glorioso y cols., 2011). Esto se debe a que el aprendizaje y la memoria son dos procesos cognitivos relacionados, formados por la capacidad de adquirir (atención y percepción), codificar, almacenar, mantener y recuperar (memoria) información procedente del entorno (Sweatt, 2003). La memoria se puede clasificar en diferentes categorías según el tipo de recuerdo y el tiempo de retención de la información.

La clasificación basada en el *tipo de recuerdo* según sea consciente o inconsciente puede ser:

1) *memoria declarativa* o *explícita*, también llamada *aprendizaje consciente*. La memoria declarativa implica el almacenamiento inconsciente pero el recuerdo consciente de la información. Puede referirse a eventos (*memoria episódica*), hechos o datos aislados (*memoria semántica*). Asimismo, incluye condicionamiento asociativo consciente y aprendizaje espacial. Debido a la recuperación de la información, la memoria declarativa es consciente por lo que las regiones cerebrales más implicadas en este proceso son las regiones corticales y el hipocampo.

2) *memoria no declarativa* o *implícita*, también llamada *aprendizaje no consciente* (Sweatt, 2003). El almacenamiento de información correspondiente a la memoria implícita es inconsciente, pero la recuperación de la misma puede ser consciente o inconsciente. Se ha descrito que las vías neurales implicadas en este proceso son principalmente la corteza prefrontal, el núcleo *accumbens*, la amígdala, cuerpo estriado, cerebelo, tálamo y corteza motora. Este tipo de memoria engloba *memoria de procedimiento*, que consiste en la capacidad de adquirir hábitos y habilidades motoras cuya repetición tiende a incrementar destreza en su ejecución.

La memoria también se puede clasificar según *el tiempo* en que la información es mantenida hasta su evocación posterior en (Baddeley, 2000):

1) *memoria de largo plazo*, en la que se puede mantener la información por horas, días o años, porque es más estable, menos lábil.

2) *memoria de corto plazo*. Dentro de esta categoría se encuentra la *memoria de trabajo* (o memoria de corto plazo activa, o memoria operante) que se refiere, al recuerdo a corto plazo de información específica necesaria para la ejecución de una tarea determinada. La dinámica psiconeural de este tipo de memoria de corto plazo está sustentada por la conformación de redes dinámicas entre neuronas prefrontocorticales denominadas “campos de memoria”; estas redes son alternantes, temporalmente reverberantes y se mantienen activas y estables hasta que la acción conductual es ejecutada (Williams y Goldman-Rakic, 1995). La memoria de trabajo y las acciones motrices conducentes a ejecutar las tareas relacionadas con la memoria de trabajo, implican el procesamiento enteramente consciente de la información (Sweatt, 2003). Las regiones cerebrales implicadas en este tipo de memoria son la corteza cerebral, el hipocampo, el cuerpo estriado, el núcleo amigdalino y el cerebelo.

En la **Figura 4** vemos como en humanos, a lo largo de la vida, se incrementan los conocimientos, sobre todo a nivel del lenguaje, en parte debido a la experiencia adquirida con los años. Sin embargo, de forma paralela a este hecho, se produce un declive en los diferentes tipos de memoria a largo y corto plazo, acompañado por un deterioro en la velocidad de procesamiento (Glorioso y cols., 2011), como ya hemos comentado anteriormente.

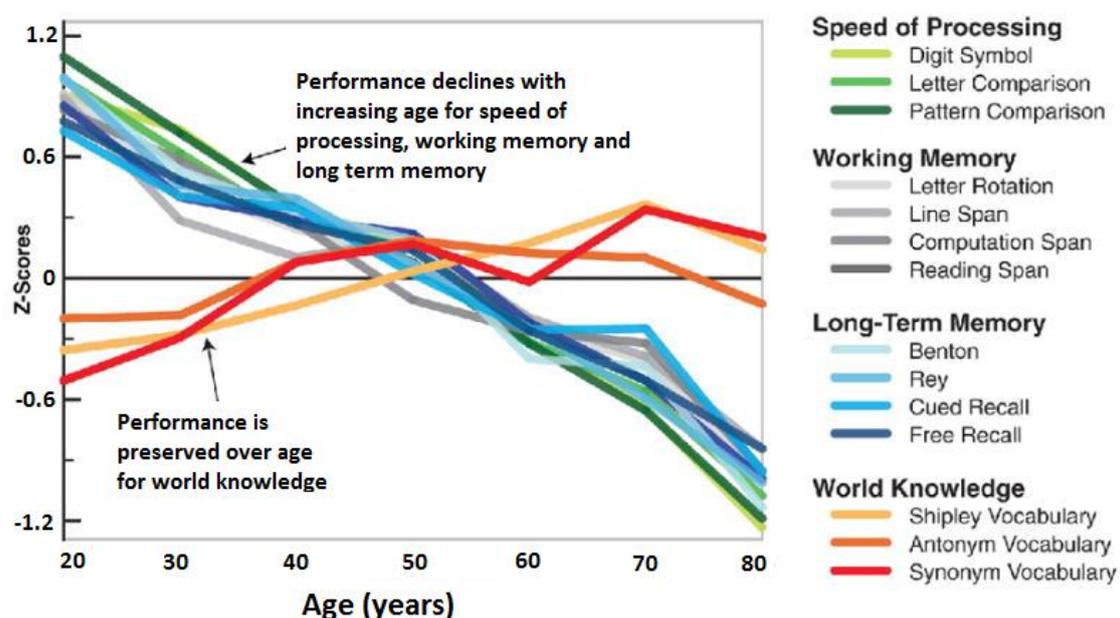


Figura 4. Efecto del envejecimiento en los diferentes tipos de memoria. Z-score es la medida de la distancia de la media en relación a la desviación estándar (Glorioso y cols., 2011).

Aunque en la memoria y aprendizaje participan diferentes estructuras cerebrales, que ya hemos citado anteriormente, hay determinadas regiones que tienen un papel fundamental en la funcionalidad de estos procesos, estas son el hipocampo y el estriado. Por ello comentaremos brevemente algunas características de estas regiones en relación a los procesos cognitivos.

En la memoria y aprendizaje el hipocampo es una de las regiones más implicadas, con especial participación en la memoria espacial (Morris y cols., 1982). Está involucrado principalmente en la formación de mapas cognitivos detallados del contexto en el que se produce el aprendizaje (lugar de aprendizaje). Es una región rica en neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas (Viljoen y cols., 2007; Berumen y cols., 2012). Se ha demostrado que la función del hipocampo, se ve afectada con la edad, lo que origina deterioro en la memoria (Driscoll, 2005; Burke, 2006). En cambio, el cuerpo estriado dorsolateral es más importante para el aprendizaje y la elección de las acciones (Cook y Kesner, 1988; Brasted y cols., 1997), por lo tanto, se encarga de asociar los estímulos con las respuestas a estos (aprendizaje de respuesta). El estriado es una región rica en neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas (George y cols., 1994; Phillips, 2003). El hipocampo y el cuerpo estriado pueden funcionar en paralelo como parte de un sistema dinámico de memoria con el objetivo de optimizar el comportamiento basado en experiencias anteriores (Kim y Baxter, 2001; Poldrack y Packard, 2003).

El declive cognitivo y motor que se produce durante el envejecimiento es en parte debido a cambios a nivel estructural y neurofisiológico, que conllevan a una pérdida de eficacia en la neurotransmisión (Randall y cols., 2012). A continuación comentaremos las características estructurales y neurofisiológicas más destacadas durante el proceso de envejecimiento.

1.1.5.2 Características estructurales

Durante el envejecimiento, se producen cambios en la morfología de las neuronas (Burke y cols., 2006). Estos cambios morfológicos consisten en cambios en el tamaño del soma neuronal, pérdida y/o deterioro de dendritas y espinas dendríticas, que dan lugar a cambios en las sinapsis (Hedden y cols., 2004; Zindler y cols., 2010; Chen y cols., 1995; Wong y cols., 1998). Los axones sufren una desmielinización, provocando alteración de la conductividad neuronal (Rizzo y cols., 2015). También en las neuronas hay alteraciones en la densidad de receptores para neurotransmisores (Rizzo y cols., 2015). A pesar de todo esto y en contraste con la idea de que con la edad existe una pérdida neuronal irreversible, hace unos 40 años se ha demostrado que en áreas específicas del cerebro las neuronas son continuamente regeneradas a partir de células madre indiferenciadas. El problema es que existe un punto en el que los daños ocasionados por el envejecimiento o las enfermedades neurodegenerativas son mayores que la capacidad regeneradora del tejido neuronal (Zindler y cols., 2010).

El envejecimiento también provoca alteraciones sobre la neuroglia, sin observarse cambios importantes en el número total de células (Pakkenberg y cols., 1997). Al parecer los oligodendrocitos y las células de la microglia son las células principalmente afectadas por el

envejecimiento, siendo los oligodendrocitos los más susceptibles debido a los cambios morfológicos que sufren en las capas de mielina (Peters, 2002).

También se observan cambios en la barrera hematoencefálica (BBB) durante el envejecimiento. La BBB es el mayor modulador del transporte de nutrientes entre el sistema circulatorio y el sistema nervioso central (SNC), evitando el paso de sustancias tóxicas al SNC. De esta forma las alteraciones que se producen en el sistema circulatorio debidas a la edad como pueden ser hipertensión, cambios en el diámetro y permeabilidad de los capilares, isquemias cerebrovasculares, y cambios histológicos en la vascularidad del cerebro, afectan el paso de sustancias y nutrientes al cerebro. Todo esto provoca una disminución en el flujo sanguíneo al cerebro y en particular en el flujo de glucosa (Donahue y cols., 2008).

Como comentaremos a continuación algunos de estos cambios estructurales se traducen en cambios neurofisiológicos que afectarán a la comunicación neuronal y por tanto a las funciones cognitivas y motoras (Rizzo y cols., 2015).

1.1.5.3 Características neurofisiológicas

El envejecimiento genera alteraciones en la estructura de las neuronas, lo que afecta a las fases de los potenciales de acción y a la velocidad de conducción de estos, así como a la expresión de los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y a la respuesta a neurotransmisores. En conjunto estas modificaciones se traducen en cambios en las sinapsis y la plasticidad neuronal, causando deterioro cognitivo y motor (Fieber y cols., 2010; Moroz y Kohn, 2010; Akhmedov y cols., 2013; Kadakkuzha y cols., 2013; Sibille y cols., 2013; Kempzell y Fieber, 2015). Estos cambios están acompañados por alteraciones en los sistemas de síntesis y metabolismo de neurotransmisores monoaminérgicos en el cerebro (Esteban y cols., 2010 a y b, Moranta y cols., 2014) y en otros sistemas de neurotransmisión como el sistema colinérgico, cuyo principal neurotransmisor es la acetilcolina, que tiene funciones relacionadas con los procesos de recompensa y en la memoria (Millan y cols., 2004). A continuación se explicará la influencia del envejecimiento en los principales sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos implicados en los procesos cognitivos y motores.

1.1.6 Influencia del envejecimiento en los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos involucrados en los procesos cognitivos

Los neurotransmisores monoaminérgicos están involucrados en muchas funciones en el cerebro, que cambian durante el envejecimiento (Esteban y cols., 2010 a y b; Moranta y cols., 2014). Algunas regiones cerebrales como la corteza prefrontal, hipocampo y cuerpo estriado están innervadas por aferentes monoaminérgicos. La memoria y aprendizaje están modulados por estas

estructuras por lo que una alteración de las funciones de estas vías de neurotransmisión pueden resultar en cambios a nivel cognitivo (González-Burgos y cols., 2009). El sistema monoaminérgico está formado por neurotransmisores y neuromoduladores de tipo monoaminas, cuya estructura química consiste en un anillo aromático conectado a grupo amino. Todas las monoaminas derivan de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, tirosina o triptófano. Dentro del grupo de las monoaminas se encuentran las catecolaminas que son la dopamina (DA), la noradrenalina (NA) y la adrenalina; las indolaminas como la 5-hidroxitriptamina (5-HT; serotonina) y la imidazolamina como la histamina (Carlsson, 1987). Además de tener actividad neurotransmisora, poseen actividad neuromoduladora. Lo anterior significa que pueden ejercer una influencia directa o indirecta sobre la excitabilidad de las neuronas a las que estimulan (González-Burgos y cols., 2009). A continuación explicaremos de forma resumida las principales características de los sistemas de neurotransmisión catecolaminérgico y serotoninérgico, que son sistemas que están directamente implicados en la funcionalidad de los procesos cognitivos y motores.

1.1.6.1 Función del sistema catecolaminérgico en los procesos de memoria y aprendizaje. Influencia del envejecimiento

El sistema catecolaminérgico está formado por el sistema noradrenérgico y el sistema dopaminérgico. Estos sistemas sintetizan los neurotransmisores noradrenalina (NA) y dopamina (DA) a partir de la tirosina. La tirosina hidroxilasa (TH, E.C. 1.14.16.2) es la enzima limitante de la vía de síntesis de catecolaminas, cataliza la conversión de la L-tirosina en 3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA), paso inicial en la biosíntesis de catecolaminas. La enzima se activa por fosforilación, que puede ser provocada por proteínas quinasas dependientes de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) o de Ca^{2+} . La DOPA es descarboxilada de forma rápida por la enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (AADC) para formar DA y ésta posteriormente es transformada en NA (Fernstrom y cols., 2007) (**Figura 5**).

Debido a que la TH cataliza la reacción inicial y autolimitante en la biosíntesis de DA, NA y adrenalina, los niveles tisulares de catecolaminas están determinados en gran medida, por la actividad de esta enzima. Entre las sustancias que pueden modular la actividad del enzima TH se encuentran tanto substratos, cofactores, productos de reacción, iones como Fe, y distintos neurotransmisores, así como diversos fármacos. Además, la actividad de TH también se regula en respuesta a modificaciones en el flujo de impulsos nerviosos, así el aumento del flujo de impulsos conlleva a una mayor liberación y metabolización del neurotransmisor, lo cual produciría el vaciamiento de un depósito de NA que ejerce de regulador, accesible a la TH,

mientras que en los períodos de reposo, en los que la utilización de este neurotransmisor disminuye, la NA se acumularía disminuyendo la actividad TH (Weiner, 1970; Fillenz, 1990).

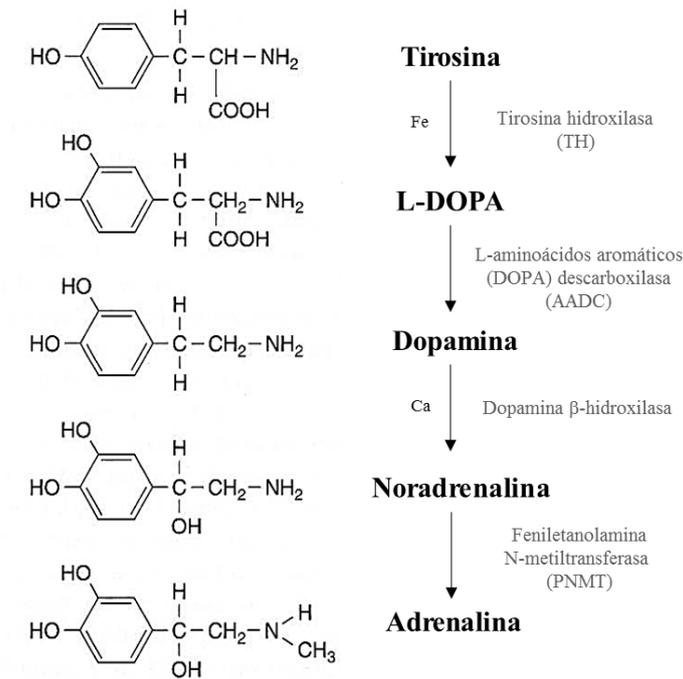


Figura 5. Esquema de la síntesis de catecolaminas.

Sistema noradrenérgico

El sistema noradrenérgico está compuesto por neuronas noradrenérgicas que sintetizan NA a partir de la tirosina, que se libera en las terminaciones nerviosas de múltiples regiones cerebrales incluido el hipocampo. En la **Figura 6** vemos la organización del sistema noradrenérgico en el cerebro de rata (Swanson y Hartman, 1975). El sistema noradrenérgico se relaciona con los estados de activación del organismo, por lo que desempeña una función muy importante a nivel del SNC en la regulación de la vigilia, potencia el aprendizaje espacial y la memoria, regula la actividad motora y ciertos estados afectivos. Por ello una disminución de NA cerebral se correlaciona con depresión. Así, el sistema noradrenérgico es importante en las funciones cognitivas (*ver revisión* de Chamberlain y Robbins, 2013) como son el procesamiento de nueva información y la exploración de novedades (Delini-Stula y cols., 1984), lo cual requiere un incremento de la actividad noradrenérgica debida a la activación del *locus coeruleus* (Sara y cols., 1994; Vankov y cols., 1995) y a un aumento de la liberación de NA en el hipocampo (Lemon y cols., 2009; Sara y cols., 1994). A su vez la NA sirve de neurotransmisor en el sistema nervioso autónomo (SNA), y en las fibras postganglionares del sistema nervioso simpático (McCorry, 2007).

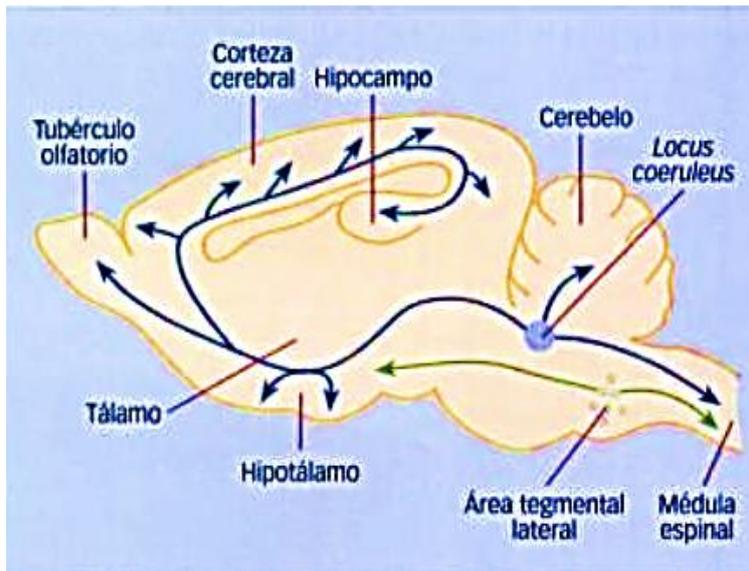


Figura 6. Organización del sistema noradrenérgico en el cerebro de ratona. El núcleo noradrenérgico más importante es el *locus coeruleus*, del que parte una vía ascendente principal (hacia el tálamo, los tubérculos olfatorios, la corteza cerebral y el hipocampo), una vía hacia el cerebelo y otra vía descendente hacia la médula espinal. En el área tegmental lateral se originan vías ascendentes hacia el hipotálamo y descendentes hacia la médula espinal (George y cols., 1994).

La NA es reconocida por diferentes tipos de receptores entre ellos los receptores adrenérgicos α y β que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Así, la NA induce respuestas en las neuronas postsinápticas a través de sistemas de segundos mensajeros mediados por proteínas G (Schatzberg y Nemeroff, 2006). Los receptores adrenérgicos α y β presentan dos subtipos: receptores adrenérgicos α_1 y α_2 , y receptores adrenérgicos β_1 y β_2 (Cerdarbaum y cols., 1977). Todos estos receptores muestran una amplia distribución en la corteza cerebral, y en distintas regiones del tálamo, el hipotálamo, el estriado, el hipocampo y la corteza cerebral (Young y cols., 1980; Reznikoff y cols., 1986).

Los niveles de NA se ven reducidos significativamente con la edad debido en parte a pérdida de neuronas en el *locus coeruleus* (Mann y cols., 1983; Marcyniuk y cols., 1986) y a disminución de actividad de la enzima TH (Esteban y cols., 2010 a y b, Moranta y cols., 2014). También disminuyen en el cerebelo y se ha relacionado este fenómeno con problemas a nivel motor (Bickford, 1993; Gould y Bickford, 1996) y de aprendizaje espacial (Collier y cols., 2004), y en patologías neurodegenerativas como el Alzheimer (Gannon y cols., 2015).

Sistema dopaminérgico

La DA se sintetiza a partir de la tirosina y se encuentra ampliamente distribuida en regiones cerebrales involucradas estrechamente con los procesos de aprendizaje y memoria, así como con el control motor (Nieoullon A, 2002; Garret y cols., 2015). En la **Figura 7** se puede observar la organización del sistema dopaminérgico en el cerebro de ratona. La actividad de la DA es mediada por dos familias de receptores acoplados a segundos mensajeros, la familia D1 que agrupa a los receptores D1 y D5, y la familia D2 que incluye a los receptores D2, D3 y D4 (Misale y cols.,

1998). El subtipo D1 es el receptor dopaminérgico más abundante (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994). Se encuentra densamente distribuido en regiones de relevancia cognitiva tales como el neostriado, núcleo *accumbens*, amígdala, núcleo subtalámico, sustancia negra y cerebelo y en concentraciones moderadas en la corteza cerebral frontal, tálamo, globo pálido y formación hipocampal. De la familia de receptores D2, se ha detectado una alta densidad del subtipo D2 en neuronas GABAérgicas del neostriado, formación hipocampal y núcleo *accumbens*, y en cantidades moderadas en la sustancia negra, corteza cerebral prefrontal, globo pálido, amígdala y tálamo (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994).

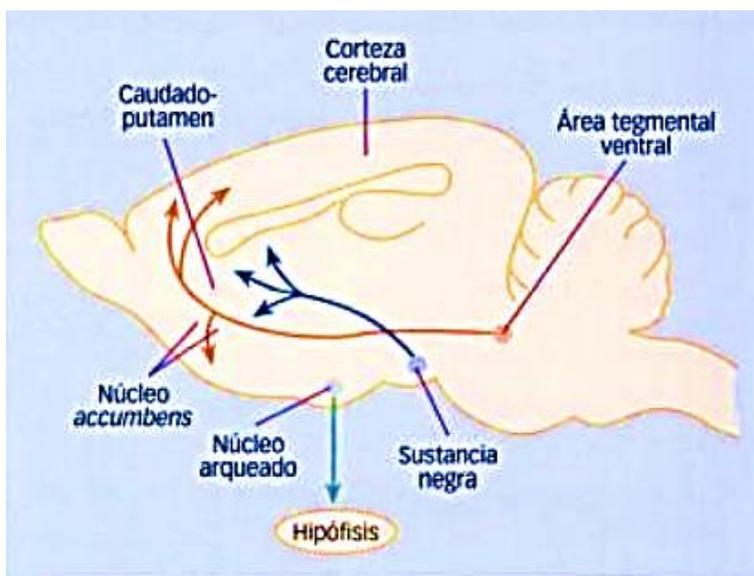


Figura 7. Organización del sistema dopaminérgico en el cerebro de ratona. El sistema nigroestriado conecta la sustancia negra con el caudado-putamen. El sistema mesocorticolímbico está formado por neuronas que van desde el área del tegmento ventral hasta el núcleo accumbens y hasta la corteza cerebral. El sistema tuberoinfundibular comunica el núcleo arqueado del hipotálamo con la hipófisis (George y cols., 1994).

La transmisión dopaminérgica resulta crucial en la memoria del trabajo (Arnsten y Li, 2005), en la que interviene la corteza prefrontal (Luciana y Collins, 1997), así como en diferentes procesos cognitivos que implican al hipocampo (Li y cols., 2003; Manahan-Vaughan y cols., 2003; Lemon y cols., 2006), jugando un papel importante tanto los receptores del subtipo D1 (Williams y Goldman-Rakic, 1995; Seamans y cols., 1998) como del subtipo D2 (Wilkerson y Levin, 1999).

Existen estudios que indican que una disminución de DA produce deterioro en el desempeño de la memoria de trabajo (Brozoski y cols., 1979), observándose una correlación negativa entre los niveles de DA y el número de errores cometidos en las pruebas de memoria que utilizan el laberinto en T (Sahakian y cols., 1985). Por otro lado, la liberación de DA se incrementa en la corteza prefrontal, núcleo *accumbens* y estriado dorsal cuando la recompensa es contingente con el aprendizaje (Stefani y Moghaddam, 2006; O'Neill y Brown, 2006). Algunos circuitos neurales entre la corteza prefrontal, la formación hipocampal y diversas regiones del cuerpo estriado, están relacionados con la conducta de búsqueda basada en la memoria; y son modulados por un aumento de la liberación de DA en dichas regiones (Phillips y cols., 2003). Así, la DA liberada modula la

entrada de información biológicamente significativa procedente de la corteza prefrontal (atención), del hipocampo (contexto espacial) y de la amígdala (motivación); mediante receptores D1, cuya función es mantener un estado bajo de actividad neuronal. Cuando la neurona se despolariza tras la excitación sostenida mediada por las aferencias corticales, hipocámpales y amigdalinas, el receptor D2 (que es excitador) contribuye a sostener dicho efecto despolarizante estabilizando un estado alto de actividad facilitando la generación del potencial de acción subyacente al envío de la información hacia zonas motoras relacionadas, entre las que se encuentran la corteza cerebral, globo pálido, tálamo y el núcleo *accumbens* (Fernández-Espejo, 2000). Así, la adquisición o en su caso la extinción de condicionamientos aversivos o apetitivos estarían moduladas por actividad dopaminérgica mediada por los receptores D1 y D2.

El sistema dopaminérgico también tiene grandes implicaciones en las disfunciones cognitivas y motoras relacionadas con la edad (Kaasinen y Rinne, 2002). Esto es debido a que las personas de edad tienen niveles absolutos de DA inferiores (Carlsson y Winblad, 1976; Garnett y cols., 1983). Además, se produce una reducción de los receptores de DA (Suhara y cols., 1991; Inoue y cols., 2001; Kaasinen y cols., 2002) y de los transportadores de DA (Van Dyck y cols., 1995; Rinne y cols., 1998; Volkow y cols., 1998) cuando comparamos jóvenes y adultos. Dado el papel que juega la memoria en la adquisición de habilidades motoras, los déficits cognitivos asociados a la degeneración dopaminérgica pueden contribuir a la disfunción motora (Seidler y cols., 2010).

1.1.6.2 Función del sistema serotoninérgico en los procesos de memoria y aprendizaje. Influencia del envejecimiento

La serotonina (5-HT) es sintetizada a partir del triptófano procedente de la dieta. La enzima triptófano hidroxilasa (TPH, EC 1.14.16.4, L-triptófano-5- monooxigenasa) transforma el triptófano en 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Esta enzima se encuentra sólo en el citoplasma de células serotoninérgicas. El 5-HTP es rápidamente descarboxilado y transformado en 5-HT por la enzima descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (Lovenberg y cols., 1962) (**Figura 8**). En condiciones fisiológicas, esta enzima no se encuentra saturada por el sustrato, por lo que la formación de 5-HT en el cerebro se ve afectada por cambios en la disponibilidad de triptófano, ya que el paso de triptófano a 5-HTP es limitante de la síntesis de 5-HT (Young y Gauthier, 1981). La actividad neuronal también puede regular la síntesis de 5-HT. Así, aumentará la síntesis de manera dependiente a la estimulación somática de las neuronas serotoninérgicas (Eccleston y cols., 1970; Shields y Eccleston, 1972; Hamon y Glowinski, 1974). Aunque en condiciones fisiológicas la concentración de 5-HT no regula la actividad de la TPH, en ciertas condiciones experimentales, como tras un tratamiento con determinados fármacos que aumente la concentración de 5-HT, si que provocará una inhibición de la síntesis de 5-HT (Hamon y cols., 1973); ya que las

monoaminas liberadas al espacio sináptico participan en la regulación de la propia síntesis de neurotransmisor por parte de la neurona liberadora, a través de la interacción con receptores presinápticos que modulan la actividad TPH, que es el paso limitante de la síntesis.

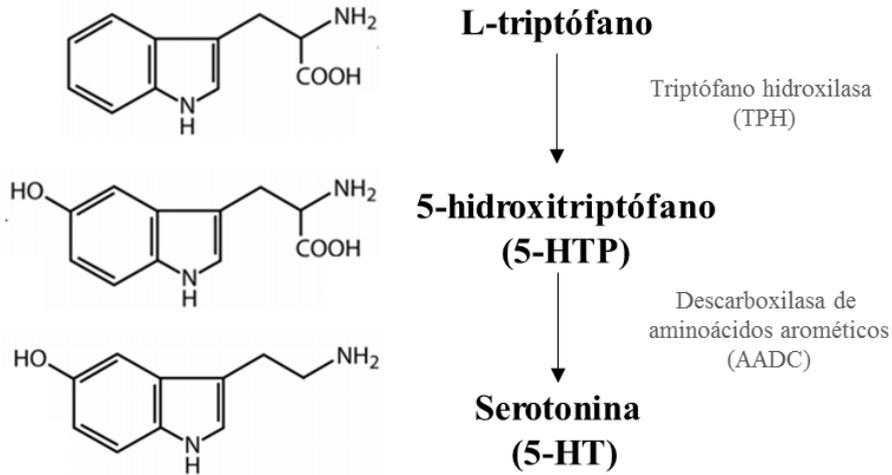


Figura 8. Esquema de la síntesis de serotonina.

La 5-HT se sintetiza y se libera en las terminaciones nerviosas de múltiples regiones del cerebro tales como el hipocampo y el cuerpo estriado, que están implicadas en la organización de diversos procesos cognitivos, incluyendo el aprendizaje y la memoria (González-Burgos, 2009, Zhang y cols., 2015). Se ha visto que la restricción de triptófano y por tanto, la reducción de 5-HT producen deterioro de la memoria de corto plazo y en la memoria espacial (Olvera-Cortés y cols., 1998; Schmitt y cols., 2000; Van der Veen y cols., 2006; Hritcu y cols., 2007). En la **Figura 9** se puede ver la organización del sistema serotoninérgico en el cerebro de rata.

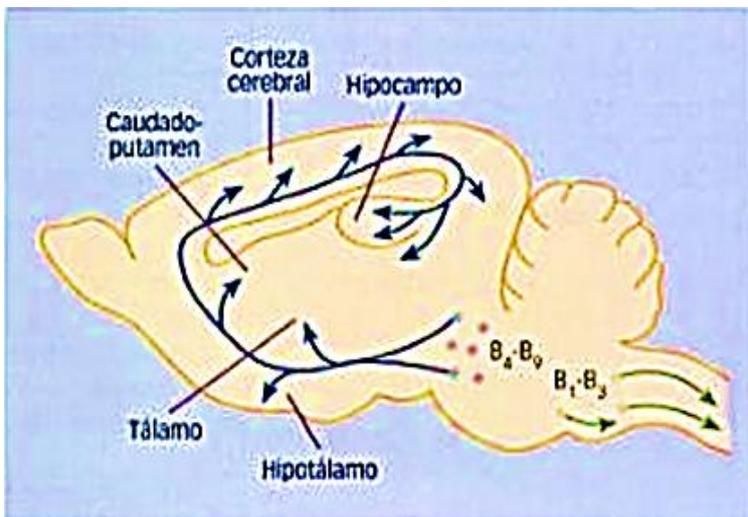


Figura 9. Organización del sistema serotoninérgico en el cerebro de rata. Los núcleos serotoninérgicos caudales (B₁-B₃) contienen neuronas que se proyectan hacia la médula espinal. En los núcleos B₄-B₉ se localizan neuronas que se proyectan hacia el hipotálamo, el tálamo, el caudado-putamen, la corteza cerebral y el hipocampo (George y cols., 1994).

Al igual que cualquier otro neurotransmisor, la actividad de la 5-HT está mediada por receptores específicos. Los efectos sinápticos y fisiológicos de las sinapsis serotoninérgicas dependen del tipo de receptor que resulte estimulado en una sinapsis dada, así como de la posible interacción que se establezca entre los propios terminales serotoninérgicos y otros sistemas de neurotransmisión tales como el sistema colinérgico en hipocampo, corteza y estriado, en donde ambos sistemas cooperan en la regulación de las funciones cognitivas (Cassel y Jeltsch, 1995).

La familia de receptores de 5-HT consiste en 20 miembros divididos en siete clases que, a su vez, se pueden subdividir en subtipos (Barnes y Sharp, 1999; Meneses, 1999). La mayoría han sido localizados en áreas relacionadas con aprendizaje y memoria, tales como el hipocampo, el estriado, la amígdala y la corteza cerebral (Meltzer y cols., 1998). La lesión de vías serotoninérgicas en hipocampo provoca deficiencias en la memoria de referencia de ratas, al ser evaluadas en el laberinto acuático de Morris (Sprague y cols., 2003). También se ha descrito que el bloqueo postsináptico del receptor 5HT1A favorece el desempeño eficiente de la capacidad de retención y memoria de trabajo espacial y de referencia no espacial mediante un efecto facilitador de la liberación de acetilcolina (Millan y cols., 2004). Diversas regiones del cuerpo estriado poseen densidades diferentes de receptores de 5-HT (Barnes y Sharp, 1999). La 5-HT estriatal está involucrada en la consolidación de la información relacionada con el aprendizaje. El cuerpo estriado está en particular involucrado en la organización del aprendizaje y memoria que evocan respuestas condicionadas, así como en la memoria de procedimiento (Sweatt, 2003).

En el envejecimiento los niveles de 5-HT se ven reducidos significativamente debido en parte a una disminución de la actividad de la enzima TPH, lo que también se relaciona con problemas a nivel cognitivo (Esteban y cols., 2010 a y b, Moranta y cols., 2014, Sarubbo y cols., 2015).

1.1.7 Neuroinflamación y envejecimiento

Durante el envejecimiento en el cerebro aparte de tener lugar las alteraciones comentadas anteriormente a nivel estructural y neurofisiológico, también se produce una alteración del sistema inmune dando lugar a procesos de inflamación, que será lo que comentaremos a continuación.

Una amplia variedad de estudios han puesto en evidencia la activación del sistema inmunitario durante el proceso de envejecimiento en mamíferos, este fenómeno se denomina *inflammaging* (inflamación asociada al envejecimiento). Se refiere a un fenotipo proinflamatorio que acompaña al envejecimiento en los mamíferos (Salminen y cols., 2008 a y b). Este fenotipo puede ser consecuencia de múltiples causas, tales como la acumulación de daño en los tejidos, la ineficacia del sistema inmune frente a la defensa contra patógenos y células huésped disfuncionales, la

propensión de las células senescentes para secretar citoquinas proinflamatorias, el aumento de la activación de la vía de señalización del factor nuclear kappa B (NF- κ B) o la aparición de una respuesta defectuosa de autofagia (Salminen y cols., 2012 a, b y c).

A mediados del siglo XIX, Rudolf Virchow describió por primera vez un tejido conectivo en el cerebro y la médula espinal, al que llamó *Nervenkitt* (pegamento neuronal) (Somjen, 1988). Posteriormente pasó a llamarse células de la neuroglia, compuestos por células de la macroglia y microglia, y se les atribuyó una función de soporte en el tejido nervioso. Sin embargo, en las últimas décadas su función se ha vuelto a evaluar, y se ha visto que las células de la microglia tienen una función inmunitaria en el SNC, y que tienen similares funciones que los macrófagos periféricos (Kreutzberg, 1996). Siendo células inmunitarias, su principal función es defender el organismo frente a la agresión de patógenos, promoviendo la reparación del tejido y facilitando la homeostasis rodeando neuronas y astrocitos (Glass y cols., 2010, Spencer y cols., 2012). Sin embargo, la activación descontrolada de la microglia da lugar a la producción de factores que contribuyen al daño neuronal, como son las citoquinas (interleuquina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF- α)) (Gibbons y Dragunow, 2006), ROS (Wang y cols., 2006) y glutamato (Takeuchi y cols., 2006). Cuando se activa la microglia, activa el inflamasoma NLRP3 y las vías proinflamatorias como la vía de la proteína quinasa B (Akt) que activa mTOR, la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la vía de quinasas c-Jun N-terminal (JNK), y la vía de señalización de NF- κ B (Spencer y cols., 2012), que conducen a una mayor producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β , interferones y TNF- α que es una de las principales señales inflamatorias en el cerebro (Mrak y Griffin, 2005; Green y cols., 2011; Salminen y cols., 2012 b y c). La inflamación excesiva se considera un factor crítico en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, ya que en esta situación hay un aumento de estrés oxidativo, donde se liberan radicales libres como los radicales superóxido y óxido nítrico (NO), todas estas moléculas generan una retroalimentación positiva generando un aumento del daño oxidativo (Spencer y cols., 2012). Además, esta cascada de eventos culminan con el daño neuronal, por ejemplo se altera la integridad de las sinapsis porque se alteran proteínas esenciales post y presinápticas como la drebrina y la sinaptofisina, lo que puede dar lugar a un declive cognitivo y a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Rao y cols., 2012; Spencer y cols., 2012). Por último, cuando la inflamación es excesiva puede llegar a generar muerte neuronal por apoptosis (MacEwan, 2002; Taylor y cols., 2005).

A continuación se explicarán las siguientes vías de señalización implicadas en inflamación durante el envejecimiento: 1) la vía de NF- κ B (Spencer y cols., 2012), 2) la actividad de la vía de señalización por quinasas mitogénicas MAPK (Bhat y cols., 1998; Culbert y cols., 2006, Spencer y cols., 2009 a) y 3) la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, que a pesar de no ser un activador directo de los procesos de inflamación actúa sobre vías de señalización que están implicadas en inflamación (Song y cols., 2005).

1) Vía de señalización de NF- κ B: NF- κ B está formado por un complejo heterodimérico formado por p50/p52 y p65 (Baldwin y cols., 1996). Como se puede ver en la **Figura 10** en el citoplasma, el dímero de NF- κ B se une con la proteína inhibitoria I κ B y de esta forma todo el complejo está inactivo. Los ROS y otras moléculas activan proteínas quinasas que fosforilan I κ B. De forma que I κ B fosforilada se separa del complejo NF- κ B, activándolo y permitiendo que se transfiera al núcleo, una vez entrado en el núcleo p65 se acetila en la lisina 310 así como se fosforila lo que permite la transcripción de genes (Yeung y cols., 2004).

El regulador principal de la inmunidad innata es el sistema NF- κ B (Friedman y cols., 2002). El papel de NF- κ B es importante en la defensa del organismo ya que es un sistema que responde a daños medioambientales y a su vez organiza las defensas celulares (Karin y cols., 2002; Perkins y cols., 2007). Sin embargo, la sobreactivación de la vía de NF- κ B es uno de los signos transcripcionales del envejecimiento, así por ejemplo se ha visto que la expresión condicional de un inhibidor de NF- κ B en la piel envejecida de ratones transgénicos provoca el rejuvenecimiento fenotípico de este tejido (Adler y cols., 2007). Del mismo modo, la inhibición genética y farmacológica de la señalización de NF- κ B evita características asociadas a la edad en diferentes modelos de envejecimiento acelerado en ratones (Osorio y cols., 2012; Tilstra y cols., 2012). Un nuevo enlace entre la inflamación y el envejecimiento deriva del reciente descubrimiento de que las respuestas inflamatorias y el estrés activan NF- κ B en el hipotálamo e inducen una vía de señalización que resulta en reducción de la producción de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) por las neuronas (Zhang y cols., 2013). Esta disminución de la GnRH puede contribuir a numerosos cambios relacionados con el envejecimiento tales como fragilidad ósea, debilidad muscular, atrofia de la piel y la reducción de la neurogénesis. Estos hallazgos sugieren que el hipotálamo puede modular el envejecimiento mediante la integración de las respuestas inflamatorias impulsadas por NF- κ B mediado con efectos neuroendocrinos de GnRH. Además hay que tener en cuenta que la activación de la vía de señalización de NF- κ B puede ser regulada por proteínas como SIRT1 que puede inhibir la señal de NF- κ B, desacetilando la subunidad RelA/p65 en la lisina 310, disminuyendo el proceso de inflamación en el envejecimiento (Oeckinghaus y cols., 2009). Por lo que activadores de SIRT1 como son algunos polifenoles

pueden regular los procesos de inflamación (se profundizará sobre este punto en el apartado 1.2.2 *Mecanismo de acción de las sirtuínas y su relación con los polifenoles*) (Rice-Evans y cols., 1996; Santangelo y cols., 2007; Spencer 2009 a, b y 2010).

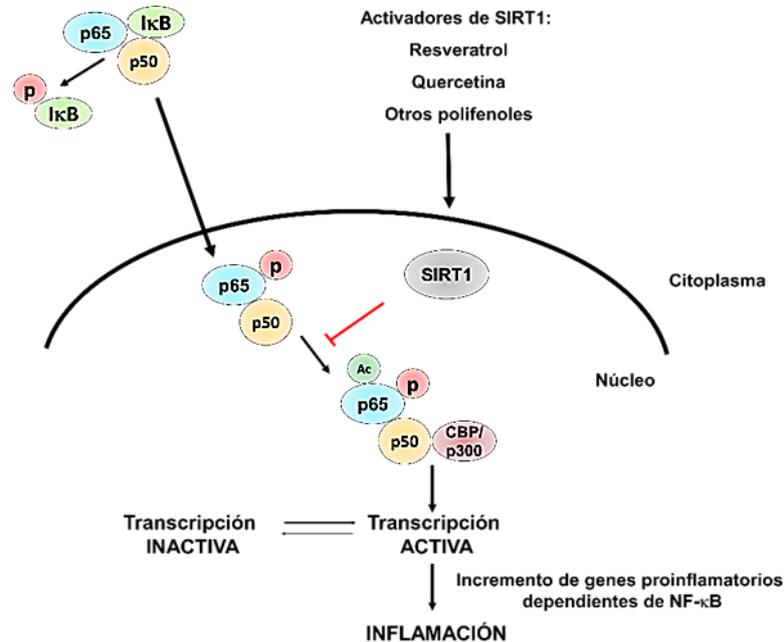


Figura 10. Vía de señalización de NF-κB. Relación con otras proteínas como SIRT1, que desacetila la subunidad RelA/p65 en la lisina 310, impidiendo la activación de la transcripción de genes proinflamatorios. Los polifenoles como el resveratrol y la quercetina pueden incrementar la actividad de SIRT1 provocando una represión de la inflamación.

2) Vía de señalización de MAPK: las MAPK incluyen la señalización intracelular regulada por quinasas (MEK1/2, ERK1/2, JNK1/2/3, y p38 quinasa), que son importantes en la transducción de señales extracelulares en las respuestas celulares. Frente a señales externas como son las citoquinas proinflamatorias, entre otros factores, se genera una cascada de señalización intracelular, en la cual la activación de estas quinasas conduce a la fosforilación de proteínas citosólicas y nucleares (Bhat y cols., 1998; Culbert y cols., 2006, Spencer y cols., 2009 a). Entre las proteínas nucleares activadas por estas vías se encuentran los factores de transcripción STAT, NF-κB, CREB, c-jun, (Chang y Karin, 2001) que regulan la expresión de genes que conducen a un incremento en la expresión de moléculas inflamatoria como NO, citoquinas y ciclooxigenasa (COX). Todo ello conduce a un incremento de la inflamación, que en última instancia puede provocar daño celular y tisular (**Figura 11**).

3) Vía de señalización PI3K/Akt y su relación con NF-κB y mTOR: como ya hemos mencionado Akt, es una serina/treonina quinasa también conocida como proteína quinasa B (PKB), que está implicada en inflamación y en regulación de la autofagia por medio de modular la actividad de mTOR (Song y cols., 2005). Además, Akt interacciona con otras vías implicadas en inflamación,

como la vía de NF- κ B. Akt puede fosforilar I κ B y provocar así su degradación, con ello se libera NF- κ B, que entonces puede migrar al núcleo y activar la transcripción de genes (Oeckinghaus y cols., 2009).

La activación de la vía de PI3K/Akt regula la actividad de mTOR, que es una serina/treonina quinasa que se presenta en forma de dos complejos multiprotéicos mTOR1 y mTOR2. mTOR tiene múltiples funciones como controlar la autofagia, el crecimiento celular, la longevidad y la agregación de proteínas que influyen en enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento (Bishop y cols., 2010). La autofagia es un proceso catabólico regulado de supervivencia celular cuyo objetivo es eliminar los orgánulos envejecidos o dañados, las proteínas mal plegadas, los agregados proteicos y los patógenos. Durante la autofagia los elementos perjudiciales para la supervivencia celular son encapsulados en una doble membrana que posteriormente se fusionará con el lisosoma que será el encargado de eliminarlos (Glick y cols., 2010). Así se elimina el daño y se reciclan los componentes celulares, para producir energía o para ser utilizados en otras reacciones bioquímicas (Yang y cols., 2014). Es un proceso importante en los procesos de inflamación y en respuesta a señales de estrés, de esta forma tiene un papel clave evitando la neurodegeneración (Glick y cols., 2010). El complejo mTOR1 inhibe la autofagia a través de la proteína S6 quinasa 1 (S6K1) y el factor de iniciación 4E-unido a proteína 1 (4E-BP1) (Ma y cols., 2009). La inflamación genera una desregulación en el proceso de autofagia, ya que afecta vías de señalización como la de mTOR, implicada en este proceso (Yang y cols., 2014). Durante el envejecimiento se produce una sobreactivación de mTOR y por tanto una inhibición de la autofagia, que es una de las causas que favorecen la aparición de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Maiese y cols., 2013; Troca-Marín y cols., 2011). Se ha visto que en el organismo en general, señales bajas de mTOR incrementan la autofagia favoreciendo la longevidad. Sin embargo, la activación de forma adecuada de mTOR es indispensable para la morfogénesis de las dendritas, la plasticidad sináptica, y la consolidación de la memoria a largo plazo (Urbanska y cols., 2012; Yang y cols., 2008). Así por ejemplo en el hipocampo la inhibición de Akt debido al envejecimiento, provoca inactivación de la vía de señalización de mTOR, que también causa un déficit en los procesos de autofagia y ello origina deterioro a nivel cognitivo (Yang y cols., 2014). Por este motivo, aunque las implicaciones de mTOR en enfermedades neurodegenerativas han sido ampliamente estudiadas se debe investigar más sobre el papel de mTOR durante el envejecimiento (Maiese y cols., 2013; Troca-Marín y cols., 2011). Además se debe tener en cuenta que mTOR es uno, pero no el único factor que regula la autofagia, algunos ejemplos: SIRT1 inhibe mTOR (Guo y cols., 2011) y también desacetila Akt promoviendo el desarrollo axonal (Li y cols., 2013), también la vía de señalización de NF- κ B regula mTOR, ya que como hemos explicado NF- κ B está relacionado con Akt (Yang y cols., 2014).

En la **Figura 11** podemos ver un esquema donde se resumen algunas de las interrelaciones entre estas proteínas y vías de señalización implicadas en envejecimiento e inflamación en el cerebro.

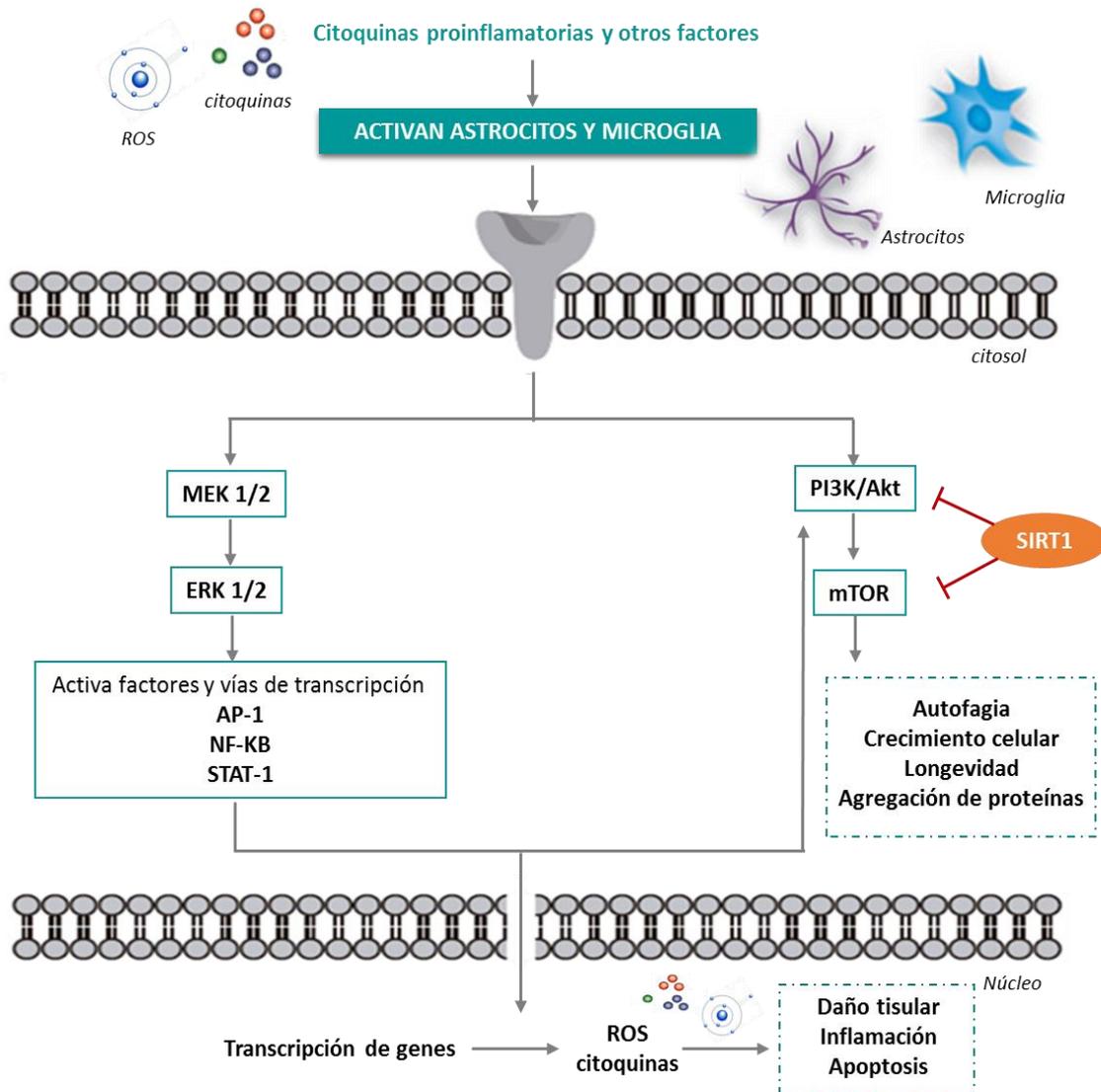


Figura 11. Esquema de las principales vías implicadas en inflamación y autofagia durante el envejecimiento. Cuando los astrocitos y la microglia se activan por señales de estrés como citoquinas y ROS, entre otros, activan vías de señalización intracelulares, como la vía de las MAPK o NF-κB. También pueden activar la vía PI3K/Akt/mTOR, aunque también existen otros activadores de esta vía como quimioquinas y factores de crecimiento entre otros. MAPK y NF-κB activan directamente los procesos inflamatorios. La vía PI3K/Akt/mTOR está implicada en autofagia y proteínas como SIRT1 inhiben mTOR regulando la autofagia. Además la vía PI3K/Akt/mTOR puede actuar sobre vías de señalización implicadas en inflamación, así como ser activado por estas. Esta cascada de eventos intracelulares da como resultado un aumento en la producción de citoquinas y ROS que pueden generar inflamación, daño tisular y apoptosis.

1.2 ANTIOXIDANTES EN LA PREVENCIÓN DEL ENVEJECIMIENTO CEREBRAL

Tal como se ha comentado anteriormente, se considera que el estrés oxidativo puede ser una causa originaria del envejecimiento y de la aparición de enfermedades neurodegenerativas. De esta manera, se asocia el envejecimiento cerebral con un desequilibrio progresivo entre las defensas antioxidantes y las concentraciones intracelulares de ROS (Reiter, 1998 a y b). Además, el declive cognitivo que acompaña al envejecimiento se correlaciona con una disminución de la concentración de antioxidantes a nivel cerebral (Berr, 2000) y en suero (Rinaldi y cols., 2003). Por esta razón, se ha sugerido la utilización de antioxidantes como posible tratamiento protector frente al envejecimiento (Gómez-Pinilla y cols., 2012). Un antioxidante se puede definir como cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine el daño oxidativo provocado por ROS en una molécula diana (Halliwell, 1997). Los antioxidantes pueden ser moléculas complejas como la enzima superóxido dismutasa o moléculas sencillas como el ácido úrico. Con la aparición de la teoría del estrés oxidativo comenzaron muchas líneas de investigación que intentaron discernir el posible papel de los antioxidantes en la prevención del estrés oxidativo. Aunque no hay un consenso acerca de la efectividad *in vivo* de los antioxidantes y mucho menos acerca de su mecanismo de acción durante el envejecimiento, en el organismo no solo son importantes los antioxidantes endógenos, ya que existen estudios que señalan que los antioxidantes de la dieta podían suprimir la expresión de algunos genes relacionados con el envejecimiento cerebral en ratones (Liu y cols., 2002) o reducir el deterioro cognitivo previniendo el daño oxidativo en el cerebro de ratas envejecidas (Lau y cols., 2005). Algunos estudios sugieren que los antioxidantes como la vitamina B, los ácidos grasos ω -3 (Coley y cols., 2015) y otras moléculas presentes en frutas y verduras, como los polifenoles, pueden prevenir el declive cognitivo disminuyendo el riesgo de sufrir enfermedades neurodegenerativas gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Joseph y cols., 2009). Dietas como la mediterránea, son ricas en estos compuestos (Huhn y cols., 2015), por lo que el estudio del impacto de estas moléculas a nivel cognitivo y molecular durante el envejecimiento, pueden ser útiles en la prevención del envejecimiento de forma natural. Por ejemplo, experimentos que utilizaron una suplementación dietética con extractos de fruta y verdura, mostraron una gran efectividad previniendo los efectos comportamentales deletéreos del envejecimiento tanto cognitivos como motores en ratas (Joseph y cols., 2009), así como previenen la aparición de patologías neurodegenerativas (Corredor, 2006).

Se pueden dividir los antioxidantes de acuerdo con su solubilidad en *hidrosolubles* y *liposolubles*. Los *hidrosolubles* son las vitaminas B y C (ácido ascórbico) o algunos polifenoles como los taninos hidrosolubles; los *liposolubles* son la vitamina E o tocoferol, la vitamina A, los carotenoides, algunas quinonas y la mayoría de polifenoles (Corredor, 2006).

A continuación haremos referencia al papel de los polifenoles como posibles moléculas con potencial para prevenir el envejecimiento.

1.2.1 Polifenoles: clasificación y propiedades

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas, sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios y como fitoalexinas frente a patógenos (Pandey y cols., 2009). Se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol por molécula, entre los que podemos encontrar diferentes tipos de taninos, ligninas y flavonoides. Químicamente, se pueden clasificar en 10 grupos en función del número de anillos de fenol que contienen y los elementos estructurales unidos a los anillos. Dentro de estos 10 grupos, los flavonoides comprenden el grupo polifenólico más abundantes en frutas y verduras, tienen una estructura 2-fenil-1,4-benzopirona e incluyen 13 subgrupos, entre ellos se encuentran: antocianinas, isoflavonoides, flavonoles, flavanonas y flavonas (Gómez-Pinilla y cols., 2012). Otros dos grupos importantes de polifenoles son los estilbenos como el resveratrol y los lignanos o flavolignanos, como la silimarina (Nencini y cols., 2007).

El conjunto de polifenoles constituye uno de los tipos de antioxidantes más abundantes en la dieta mediterránea (Manach y cols., 2004). En una dieta equilibrada de tipo mediterránea la ingesta total de polifenoles es aproximadamente 1 g/día, una cantidad que es muy superior a la de otras clases de fitoquímicos y antioxidantes. Por este motivo se considera que el consumo de polifenoles en una dieta mediterránea normal puede llegar a ser 10 veces mayor que el consumo de vitamina C y hasta 100 veces mayor que el consumo de vitamina E (Scalbert y cols., 2000; Manach y cols., 2004). Algunos estudios sugieren que los polifenoles pueden alcanzar una concentración del orden de 1 nmol/g de tejido en el cerebro, en dietas ricas en polifenoles (Schaffer, 2012). Se encuentran en verduras y frutas, así como también en el té, el mate, el café, la cerveza, el vino (principalmente el tinto), el aceite de oliva, diferentes frutos secos, chocolate, cereales, etc (Scalbert y cols., 2005 a y b). Además, se ha sugerido un papel importante de los polifenoles en la limitación de los efectos del envejecimiento actuando como uno de los principales antioxidante capaces de reducir los daños oxidativos de lípidos, proteínas, carbohidratos y del ADN (Khurana y cols., 2013; Cirillo y cols., 2014). Afectan a una amplia gama de mecanismos en el cerebro que pueden ayudar al mantenimiento de la salud mental, así como a la recuperación de enfermedades neurodegenerativas (Gómez-Pinilla y cols., 2012). Estos polifenoles han demostrado capacidad neuroprotectora frente a las lesiones inducidas por neurotoxinas y tienen la capacidad de suprimir la neuroinflamación, posicionándose como posible terapias frente a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Venigalla y cols., 2015). Sus efectos beneficiosos también incluyen un aumento de la activación de las vías de señalización

que inducen el aumento de la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes y para proteínas protectoras (Vanzour, 2012). Además, diversos estudios experimentales en animales apoyan la importancia de los polifenoles en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cánceres, enfermedades neurodegenerativas, diabetes o la osteoporosis (Scalbert y cols., 2005 b). Gran parte de la relevancia de los polifenoles en la protección del envejecimiento cerebral se debe a su capacidad de cruzar la BBB por ser moléculas lipofílicas (Abbott, 2010 y 2013). Se ha demostrado en una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* en animales y humanos que los polifenoles tienen potencial para inhibir la neuroinflamación por medio de atenuar la activación de las vías de señalización intracelulares relacionadas directamente con los procesos inflamatorios como son la vía de señalización de MAPK y la vía de señalización de NF- κ B (Rice-Evans y cols., 1996; Santangelo y cols., 2007; Spencer 2009 a, b y 2010). De esta forma, regulan la liberación de citoquinas como TNF- α (Rojanathammanee y cols., 2013), la expresión de óxido nítrico sintasa (iNOS) (Bhat y cols., 1998; Kaminska y cols., 2009; Wen y cols., 2011), la producción de NO, así como regulan la actividad de nicotinamida adenina dinucleotido deshidrogenasa (NADPH) y pueden quelar metales de transición como el hierro (Fe) (Levites y cols., 2002; Mandel y cols., 2005 y 2006).

En este trabajo se estudiaron los siguientes compuestos polifenólicos: resveratrol como representante de los estilbenos, silimarina en representación de los flavolignanós, y los flavonoides quercetina y naringenina.

1.2.1.1 Resveratrol

El resveratrol es un antioxidante polifenólico del tipo de los estilbenos. Fue aislado por primera vez en 1939 del eléboro blanco (*Veratrum album*, L. var. *Grandiflorum Maxim.* Ex Baker) (Takaoka, 1939). El nombre *resveratrol* proviene precisamente del nombre de la resina que genera la planta, el prefijo latín *res* significa que *viene de* y el sufijo *ol* hace referencia a la presencia de un grupo alcohol en su estructura (Borriello y cols., 2014). Hoy se conoce que está ampliamente distribuido en la naturaleza y sintetizado por diversas plantas (ej. *Polygonum cuspidatum*, *Vitis vinifera*, entre otros) como fitoalexina en respuesta a factores de estrés e infecciones externas (Tyihák y cols., 2011). En la **tabla 1** se pueden observar algunos de los principales alimentos que contienen resveratrol y sus cantidades. Este compuesto tomó cierta relevancia debido al artículo publicado por Jang y colaboradores en 1997 en el que atribuyeron al resveratrol propiedades anticancerígenas tanto *in vitro* como *in vivo*. Además en 2003 Sinclair y colaboradores descubrieron que el resveratrol podía activar la proteína SIRT1, prolongando un 70 % la vida de levaduras. Un año más tarde, el mismo grupo consiguió prolongar la vida de gusanos y moscas utilizando el mismo método (Baur y Sinclair, 2006 a). Finalmente en 2006 demostraron que el resveratrol junto con una dieta baja en calorías aumentaba significativamente la supervivencia de

ratones de mediana edad (Sinclair y cols., 2006). En roedores, el resveratrol mejora la salud y previene la mortalidad precoz asociada a la obesidad (Baur y cols, 2010) y tiene efectos beneficiosos a nivel cardiovascular (Bauer y cols., 2006 a), reduce el deterioro que se produce con la edad a nivel del aparato digestivo y en los riñones (Cadenas y cols., 1999; Giovannini y cols., 2001), previene el cáncer de colon (Juan y cols., 2008) y tiene efectos positivos en la espermatogénesis (Juan y cols., 2005), aunque su mecanismo concreto de actuación es objeto de debate. En el caso de humanos el efecto del resveratrol es aún objeto de estudio, sin embargo en países como Estados Unidos es uno de los suplementos alimentarios que más se consumen (Hubbard y cols., 2014). Esto se debe a algunos estudios epidemiológicos que sugieren que el vino tinto, que es rico en resveratrol, tiene efectos beneficiosos sobre la salud como por ejemplo en la reducción del riesgo de demencia (Truelsen y cols., 2002). Se ha observado que en parte debido a la capacidad de atravesar la BBB el resveratrol tiene efectos neuroprotectores a nivel cerebral (Moriya y cols., 2011; Narita y cols., 2011; Liu y cols., 2011), se ha visto que la administración oral de resveratrol en ratas durante 28 días induce un incremento de la masa cerebral probablemente debido a un efecto neurotrófico (Smoliga y cols., 2011).

Por este motivo en las últimas décadas, esta sustancia ha sido estudiada como potencial agente terapéutico y preventivo de numerosas enfermedades. En síntesis las investigaciones hechas *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el resveratrol además de tener efectos antioxidantes que disminuyen el estrés oxidativo y ayudan a mantener la integridad mitocondrial, es una molécula con propiedades anti-tumorales, anti-bacterianas, anti-cancerígenas, anti-inflamatorias, y anti-envejecimiento, entre otras; por lo que puede ser un tratamiento beneficioso en una amplia variedad de enfermedades (Yang y cols., 2015).

Alimentos	Contenido
Uva roja	50-100 µg/g
Vino tinto	0.1-14.3 mg/l
Vino blanco	0.1-2.1 mg/l
Pistacho	0.09-1.67 µg/g
Arándanos	~32 ng/g
Cacahuetes	0.02-1.92 µg/g

Tabla 1. Contenido de resveratrol en algunos alimentos (Planas y cols., 2011).

1.2.1.2 Silimarina

La silimarina es un antioxidante perteneciente químicamente a la clase de los polifenoles de tipo flavolignanicos o lignanos. Se obtiene como extracto lipofílico de la semilla de *Silybum marianum*

L. (cardo mariano) y está compuesto por varios flavonolignanos isómeros: silibina, isosilibina, silicristina, silidianina y dehydrosilibinina (Ding y cols., 2001). A diferencia de la mayoría de polifenoles su presencia en la dieta no es tan abundante, porque no son tantos los alimentos en los que está presente. Se encuentra sobretodo en la alcachofa y en el cardo mariano (Ibrahim y cols., 2013) (**Tabla 2**).

Alimentos	Contenido
Alcachofa	15 µg/g
Cardo mariano (<i>Silybum marianum</i>)	1.5-3 % peso seco

Tabla 2. Contenido de silimarina en algunos alimentos (Ibrahim y cols., 2013)

La silimarina se utiliza para tratar diversas enfermedades de diferentes órganos y sistemas, tales como la hepatitis y cirrosis hepática, en los envenenamientos por setas porque tiene un efecto protector contra toxinas, e incluso se utiliza en la prevención de ciertos cánceres (Cesanow y cols., 2006; Karimi y cols., 2005 y 2011). Además de antioxidante, a la silimarina se le han atribuido efectos antifibróticos, inmunomoduladores, anti-inflamatorios, antiproliferativos, antivirales, evita la hemólisis, es antiosteoporótico y también es modulador selectivo del receptor de estrógeno (Gazak y cols., 2007, Karimi y cols., 2011).

Además por su capacidad para atravesar la BBB la silimarina puede ser útil en el tratamiento y la prevención de algunos procesos neurodegenerativos y neurotóxicos, debido a su actividad antioxidante (Nencini y cols., 2007). Se ha descrito que es capaz de aumentar la concentración de determinados neurotransmisores en el cerebro (Karimi, 2005). Cuando se administra a una dosis de 200 mg/kg/día, reduce fuertemente la oxidación de proteínas en el hipocampo y la corteza de las ratas con edad avanzada (Karimi y cols., 2011). A nivel cerebral se ha demostrado que el tratamiento con silimarina en ratas disminuye la peroxidación lipídica, porque activa e induce un aumento de los niveles de los sistemas de defensa antioxidante (como son la enzima glutatión peroxidasa, el ácido ascórbico y la enzima superóxido dismutasa) (De Groot y Rauhen, 1998; Nencini y cols., 2007).

1.2.1.3 Quercetina

La quercetina es un antioxidante perteneciente químicamente a la clase de los polifenoles de tipo flavonoides. La quercetina es el compuesto flavonoide que aparece con más frecuencia en los

alimentos (Russo, 2012). En la **tabla 3** se pueden ver algunas de las fuentes dietéticas de la quercetina y sus cantidades.

Alimentos	Contenido
Cebollas	284-486 mg/kg
Broccoli	30 mg/kg
Manzanas	36 mg/kg
Peras	6.4 mg/kg

Tabla 3. Contenido de quercetina en algunos alimentos (Hertog y cols., 1992)

Es el flavonoide con mayor actividad antioxidante, por lo que es capaz de inhibir la peroxidación lipídica, ya que activa y aumenta los niveles de los antioxidantes endógenos, como la enzima glutatión S-transferasa (Fiander y cols., 2000). Además presenta propiedades anti-inflamatorias (Orsolic, 2004; Scalbert y cols., 2005 a y b; Chondrogianni y cols., 2010), antifibróticas (Lee y cols., 2003; Yoon y cols., 2012), anticoagulativas (Bucki y cols., 2003), antibacterianas (Cushnie y Lamb, 2005), antiarterogénicas y antihipertensivas (Perez-Vizcaino y cols., 2009), antiproliferativas y anticancerígenas (Gulati y cols., 2006). Además modula la actividad enzimática (Hanasaki y cols., 1994) inhibiendo enzimas como la monoamino oxidasa (MAO) (Bandaruk y cols., 2012) y favoreciendo la expresión de SIRT1 (Davis y cols., 2009). Por todo ello protege contra diversas enfermedades tales como la osteoporosis, ciertas formas de cáncer, enfermedades pulmonares y enfermedades cardiovasculares (Singh y cols., 2003; Boots, 2008; Pérez-Vizcaíno y cols., 2009). En referencia al envejecimiento se ha visto que puede prolongar la vida en levaduras y gusanos (Howitz y cols., 2003; Pietsch y cols., 2009). A nivel cerebral se ha observado que en ratones viejos tras la suplementación con quercetina se produce una mejora de la conducta exploratoria, el aprendizaje espacial y la memoria (Liu y cols., 2006). Así como se ha visto que la quercetina es capaz de revertir el envejecimiento y la disfunción cognitiva que se producen por la acción de ciertas moléculas como etanol (Singh y cols., 2003) o el péptido β -amiloide ($A\beta(1-42)$) (asociado con estrés oxidativo y neurotoxicidad en la enfermedad de Alzheimer) (Ansari y cols., 2009).

1.2.1.4 Naringenina

La naringenina es un antioxidante perteneciente químicamente a la clase de los polifenoles de tipo flavonoides. Está presente en diferentes alimentos (**Tabla 4**), pero se encuentra en mayor proporción en zumo de frutas cítricas (Erlund y cols., 2001), uvas y en el tomate (Paganga y cols., 1999). Felgines y cols., 2000, vieron que la naringenina es absorbida eficientemente después de

alimentar a las ratas con alimentos ricos en este compuesto, lo que hace que este polifenol sea un buen candidato como agente antioxidante exógeno.

Alimentos	Contenido
Tomate	192 ± 372 mg/kg
Zumo de naranja	21-25 mg/l
Zumo de uva	157-241 mg/l

Tabla 4. Contenido de naringenina en algunos alimentos (Erlund y cols., 2001)

Al igual que el resto de polifenoles se sabe que es un agente multifuncional que además de propiedades antioxidantes tiene efectos anti-inflamatorios (Hirai y cols., 2007; Angeline y cols., 2014), antitumorales (Kanno y cols., 2005) y hepatoprotectores (Lee y cols., 2004). En el cerebro gracias a su capacidad de traspasar la BBB, presenta un efecto neuroprotector contra ciertas patologías asociadas al envejecimiento como son Alzheimer o Parkinson (Khan y cols., 2012). En este sentido, se ha demostrado que la naringenina puede mejorar la capacidad de aprendizaje y la memoria en un modelo de ratas con enfermedad de Alzheimer (Ma y cols., 2013).

1.2.2 Mecanismo de acción de las sirtuínas y su relación con los polifenoles

Los polifenoles son sustancias antioxidantes y antiinflamatorias con un elevado potencial neuroprotector que, gracias a su habilidad para modular diversos mecanismos celulares, son dignos candidatos para prevenir los síntomas del envejecimiento (Pandey y cols., 2009). Entre estos mecanismos está la regulación de proteínas implicadas en envejecimiento e inflamación, como las proteínas conocidas como *sirtuínas* (*SIRT*). El nombre de estas proteínas proviene del inglés *Silent Information Regulator proteins* (*SIRT*), es decir proteínas reguladoras de la información silente (Klar y cols., 1979; Rine y cols., 1979; Markus y cols., 2008). Se encargan de regular las respuestas fisiológicas frente a señales metabólicas y de estrés, dos factores claves que afectan al envejecimiento (Duan, 2013).

En los últimos años, las sirtuínas han sido investigadas por medio de una variedad de técnicas que incluyen ensayos *in vitro*, cultivos celulares, modelos animales de enfermedades neurodegenerativas y estudios de tejido humano, por su implicación en varias enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, Esclerosis lateral amiotrófica y atrofia muscular espinal y bulbar (Herkovist y Guarante, 2013). Son clasificadas como desacetilasas de histonas clase III (HDAC). Sin embargo, vale la pena señalar que no todos los sustratos de sirtuínas son histonas y varios miembros de esta familia de proteínas no tienen

actividad desacetilasa (Gregoretto y cols., 2004; Dokmanovic y cols., 2007). En los mamíferos, hay siete miembros de la familia de las sirtuínas y todos se han asociado con la protección contra las enfermedades durante el envejecimiento, por una variedad de mecanismos tales como la regulación de la respuesta al estrés, la apoptosis y la reparación del ADN (Qin y cols., 2006; Jiang y cols., 2012). Todas las sirtuínas de mamíferos contienen un dominio de unión NAD⁺ y un dominio catalítico, pero difieren en sus dominios terminales (Horio y cols., 2011). Las siete sirtuínas de mamíferos tienen diferentes sustratos y se localizan en compartimentos celulares específicos (Yamamoto y cols., 2007 a) (**Figura 12**). En los mamíferos, por lo menos tres miembros de la familia de las sirtuínas, SIRT1, SIRT3 y SIRT6 contribuyen al envejecimiento saludable: SIRT1 y SIRT6 regulan la estabilidad genómica, la vía de señalización de NF- κ B y la homeostasis de la glucosa a través de la desacetilación de histonas (Kawahara y cols., 2009; Kanfi y cols., 2010; Zhong y cols., 2010) y SIRT3 mitocondrial desacetila proteínas mitocondriales, previniendo el envejecimiento (Someya y cols., 2010).

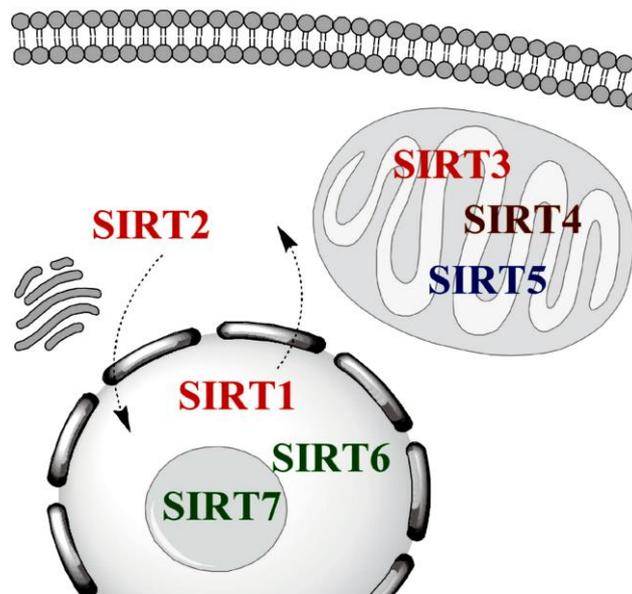


Figura 12. Localización subcelular de las sirtuínas de mamíferos. Las siete sirtuínas se clasifican en cuatro grupos en función de la homología de su secuencia. Estas proteínas tienen diferentes actividades enzimáticas y localizaciones subcelulares (Frye y cols., 2000). Las sirtuínas de la clase I (SIRT1, SIRT2 y SIRT3) se representan con texto rojo. Estas proteínas tienen actividad desacetilasa en presencia de NAD⁺ (Du y cols., 2011). SIRT1 generalmente se cree que tiene una localización nuclear, aunque se ha visto SIRT1 citoplasmática en las neuronas y otros tipos de células (Hisahara y cols., 2008; Byles y cols., 2010). SIRT2 es una proteína predominantemente citoplasmática que puede ser transportada al núcleo (North y cols., 2003; Inoue y cols. 2007) y SIRT3 es una proteína mitocondrial (Onyango y cols., 2002). Las sirtuínas clase II (SIRT4) se resaltan en color marrón (Haigis y cols., 2006). La sirtuína clase III (SIRT5) se representa en azul y esta enzima mitocondrial tiene actividades demalonilasa y desuccinilasa NAD-dependientes, además de una actividad desacetilasa más débil (Du y cols., 2011; Peng y cols., 2011; Nakagawa y cols., 2009). Las sirtuínas clase IV (SIRT6 y SIRT7) están representadas con texto en verde. SIRT6 es una proteína nuclear con una débil actividad desacetilasa y actividad ADP-ribosiltransferasa (Liszt y cols., 2005; Michishita y cols., 2008); y SIRT7 se localiza en los nucleolos y tiene actividad desacetilasa (Vakhrusheva y cols., 2008; Du y cols., 2011; Barber y cols., 2012.). Fuente: Herskovits y Guarante, 2013.

Además de tener una localización particular dentro de las células, en el cerebro también cada tipo de sirtuína tiene un patrón de expresión variable dependiente de cada región cerebral (**Figura 13**).

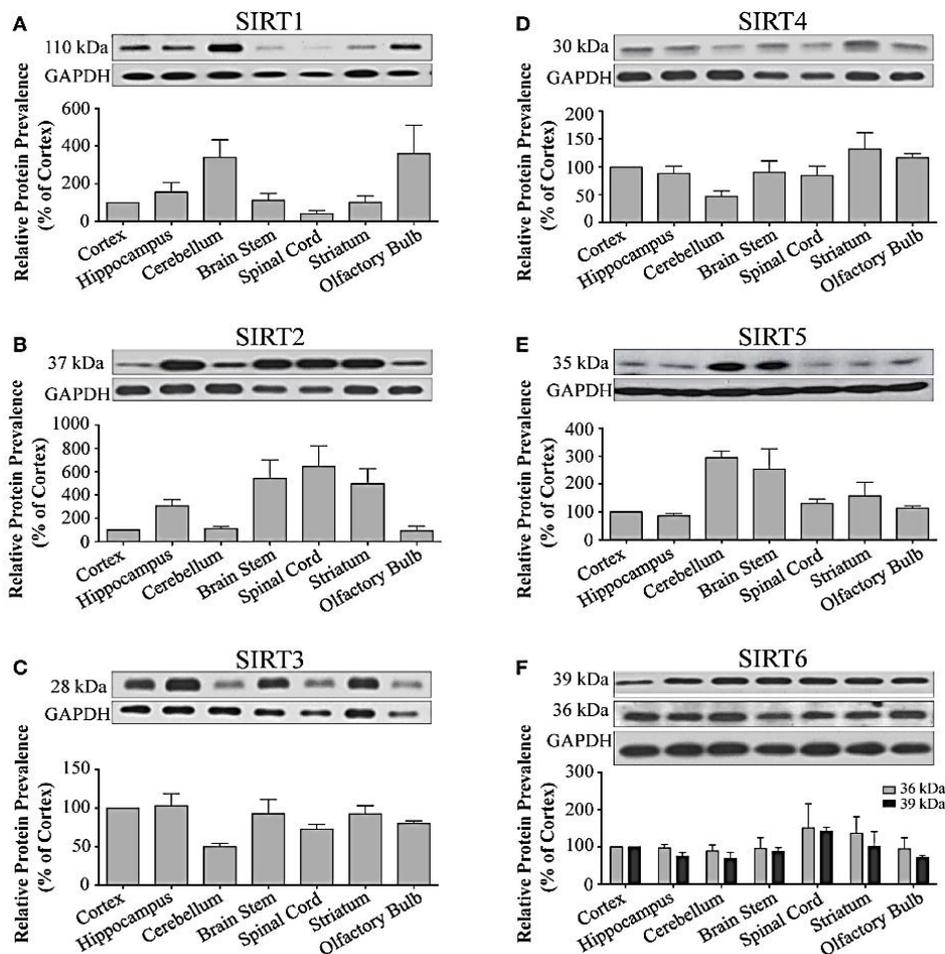


Figura 13. Patrón de expresión de las diferentes sirtuínas en distintas regiones del SNC de rata adulta (Sidorova-Darmos y cols., 2014).

De los siete tipos de sirtuínas, nos centraremos en SIRT1 (110 kDa), que como hemos dicho es una proteína desacetilasa dependiente de NAD⁺, que se une a histonas y otras proteínas. SIRT1 tiene generalmente una localización nuclear, aunque también se encuentra en el citoplasma (Herskovits y Guarante, 2013) (**Figura 12**). La localización citoplasmática de SIRT1 se ha asociado con la regulación de la autofagia, la apoptosis, la diferenciación y la transformación oncogénica (Byles, 2010; Hisahara y cols., 2008). Además, SIRT1 se ha asociado con la regulación de múltiples funciones fisiológicas, dependiendo de su localización específica en los diversos tejidos y órganos (Finkel y cols., 2009). La **Figura 14** ilustra la implicación de SIRT1 en esta gran variedad de funciones fisiológicas (Finkel y cols., 2009). Se ha observado que protege directamente contra ROS y modula las respuestas inflamatorias, así se ha visto que la reducción de SIRT1 es una de las causas de varias enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como por ejemplo la diabetes, el cáncer, la osteoporosis y la neurodegeneración (Michán y cols., 2010).

Por este motivo se ha sugerido en diferentes estudios que las moléculas que puedan modular la expresión de SIRT1 podrían representar una promesa en la prevención de los signos de envejecimiento (Hall y cols., 2013).

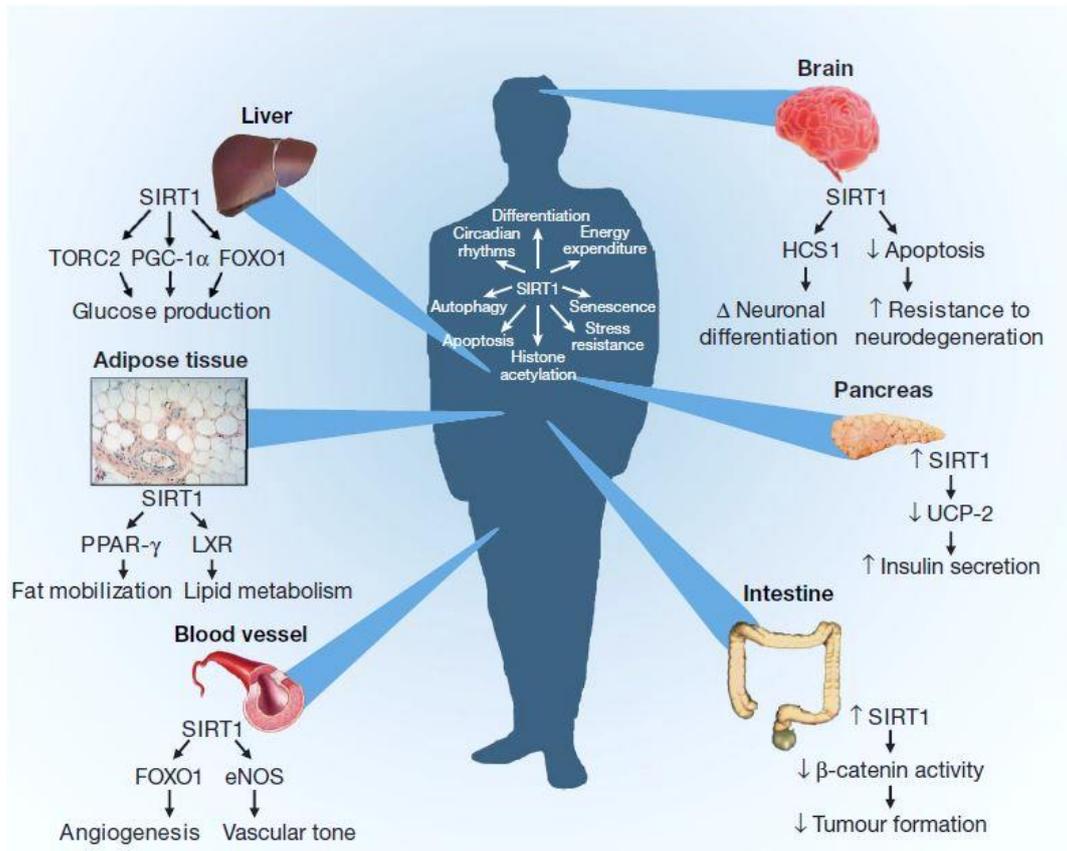


Figura 14. Funciones fisiológicas de SIRT1. Se muestra la organoespecificidad fisiológica de SIRT1, acompañada de algunas dianas directas e indirectas de la regulación de sirtuína. Además se muestran ejemplos de algunos de los mecanismos intracelulares reguladores de SIRT1 (Finkel y cols., 2009).

Se han descrito diferentes niveles de regulación de la actividad enzimática de SIRT1:

1) *a nivel transcripcional*, factores como la edad del individuo, la región del organismo o condiciones fisiológicas concretas como los estados de restricción calórica pueden cambiar el patrón de expresión de sirtuínas (Sidorova-Darmos y cols., 2014).

2) *a nivel post-traducciona*, la actividad de las sirtuínas está regulada por procesos como fosforilación, sumolización, metilación y trans-nitrosilación. Se ha observado que la fosforilación en diferentes sitios localizados en los extremos amino y carboxilo terminal puede inducir estados más activos de la proteína. Así y aunque aún no se conoce el mecanismo concreto, se ha visto que proteínas quinasas como JNK1, DYRK, PKA y la ciclina B (Cdk1-B), fosforilan a SIRT1 activándola (Revollo y Li, 2013).

3) mediante la *formación de complejos proteicos*, estos complejos están formados por proteínas moduladoras y pueden tener un efecto activador o inhibidor de sirtuínas. Citamos dos ejemplos: AROS (*active regulator of SIRT1*) que es un modulador positivo de la acción de SIRT1 sobre p53 y DBC1 (*deleted in breast cancer 1*) que es un modulador negativo de SIRT1 también sobre p53 (Law y cols., 2009).

4) por medio de la *unión con el co-sustrato NAD⁺*, debido a que la actividad enzimática de todas las sirtuínas es dependiente del co-sustrato NAD⁺ (Smith y cols., 2000; Imai y cols., 2010). El NADH es un inhibidor competitivo de las sirtuínas, por lo que se sugirió que un incremento en la relación NAD⁺: NADH, provocado por un cambio en el metabolismo oxidativo, puede derivar en el aumento de la actividad de las sirtuínas (Lin y cols., 2004).

5) mediante la acción de *compuestos activadores de sirtuínas (STACs)*: Los STACs son moléculas con capacidad para activar directamente SIRT1 mediante un mecanismo alostérico de unión al aminoácido Glu230 localizado en una estructura del dominio N-terminal de la proteína SIRT1 (Hubbard y cols., 2013) (**Figura 15**). En experimentos *in vitro* se han identificado diferentes STACs, pero la mayoría son compuestos polifenólicos, como flavonoides, estilbenos y antocianidinas que comparten una estructura química caracterizada por anillos fenólicos con grupos hidroxilo. A parte de los STACs de origen vegetal existen otros sintéticos como SRT1460, SRT1720, SRT2183 e isonicotinamida un antagonista de los efectos inhibitorios de la nicotinamida. Dentro de los STACs de origen natural el resveratrol se ha visto que es el más potente activando SIRT1 (Hubbard y cols., 2014). Aún se desconoce si los STACs pueden prolongar la vida, pero los estudios que se han realizado al respecto señalan que la activación directa de SIRT1 podría ser responsable, al menos en parte, de los efectos fisiológicos de los STACs. Por lo que la activación alostérica de SIRT1, por medio de STACs, se convierte en una posible estrategia de intervención terapéutica para tratar muchas enfermedades asociadas con el envejecimiento (Hubbard y cols., 2014).

En este sentido, se ha descrito que los polifenoles como el resveratrol y la quercetina, activan SIRT1 *in vitro* e *in vivo*, con efectos a nivel cerebral (Cohen y cols., 2004; Davis y cols., 2009; Bhullar y Hubbard, 2015). El resveratrol estimula la actividad de SIRT1, porque al unirse a la proteína provoca un cambio de conformación que incrementa la afinidad de unión al sustrato acetilado y a NAD⁺, necesario para la activación de SIRT1 (Chung y cols., 2010). Además el resveratrol no solo se ha propuesto como activador de SIRT1, sino también como inductor de la sobreexpresión de SIRT1, reduciendo la formación de ROS (Mannari y cols., 2010).

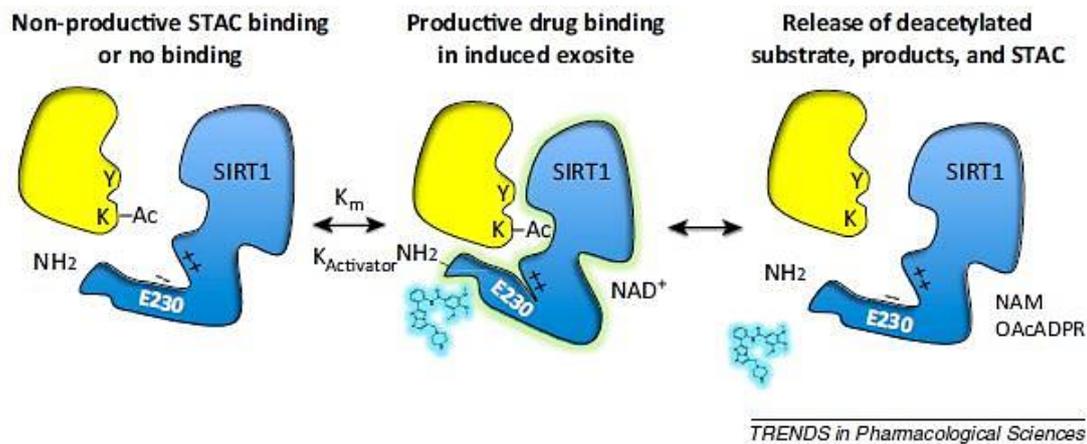


Figura 15. Mecanismo propuesto para la activación alostérica de SIRT1 por medio de STACs. SIRT1 desacetila proteínas diana (en amarillo) utilizando NAD^+ como cosustrato para generar un producto desacetilado, o-acetil-ADD ribosa (OAcADPR) y nicotinamida (NAM). Se ha observado a partir de datos estructurales y bioquímicos un mecanismo alosterico de activación directa de SIRT1, por medio de la unión de STACs al Glu230 del dominio N-terminal de la proteína SIRT1. Mutaciones del glutamato a lisina o alanina (E230 k/S) en la estructura N-terminal, bloquean la activación por medio de STACs, como el resveratrol, lo que demuestra que éste es el mecanismo de activación de SIRT1 (Hubbard y cols., 2014)

Una vez activa SIRT1 juega un papel crítico en la supervivencia celular, porque limita algunas respuestas del organismo frente el estrés, como puede ser el desencadenamiento de las respuestas inflamatorias, la apoptosis y la resistencia al estrés oxidativo (Brunet y cols., 2004; Yamamoto y cols., 2007 b; Horio y cols., 2011), lo que en último término favorece la longevidad del organismo (Chung y cols., 2010; Duan, 2013). El mecanismo de acción de SIRT1 consiste en regular el silenciamiento de genes por medio de desacetilar histonas (**Figura 16**), regulando por tanto la transcripción de proteínas relacionadas con el metabolismo energético y mecanismos de supervivencia (como enzimas reparadoras del ADN, proteínas quinasas, factores de transcripción, y coactivadores). Además SIRT1 desacetila otras proteínas no histona implicadas en los procesos de apoptosis, inflamación y envejecimiento (Xie y cols., 2013) (**Figura 17**). Así por ejemplo, varios estudios han revelado que SIRT1 desacetila la lisina 310 de la subunidad RelA/p65 de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, una subunidad crítica para la activación de la transcripción de genes proinflamatorios y por tanto del desencadenamiento de los procesos inflamatorios, como es la liberación de citoquinas (Yeung y cols., 2004). Al respecto, los polifenoles como el resveratrol y la quercetina pueden incrementar la actividad de SIRT1 provocando una represión de la inflamación, a través de la regulación de la actividad de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Labinsky y cols., 2006; Chung y cols., 2010). En este sentido, se ha constatado en modelos de enfermedades inflamatorias crónicas, que los polifenoles pueden inhibir la inflamación mediante la activación de SIRT1, que desacetila $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Yeung y cols, 2004; Birrell y cols., 2005; Milne y cols, 2007 y 2008; Rajendrasozhan y cols, 2008). De acuerdo con estos hallazgos, la reducción de los niveles de SIRT1 se correlaciona con el desarrollo y progresión de muchas enfermedades inflamatorias; así como por lo contrario la activación

farmacológica de SIRT1 puede prevenir respuestas inflamatorias en ratones (Zhang y cols., 2010; Gillum y cols., 2011; Yao y cols., 2012).

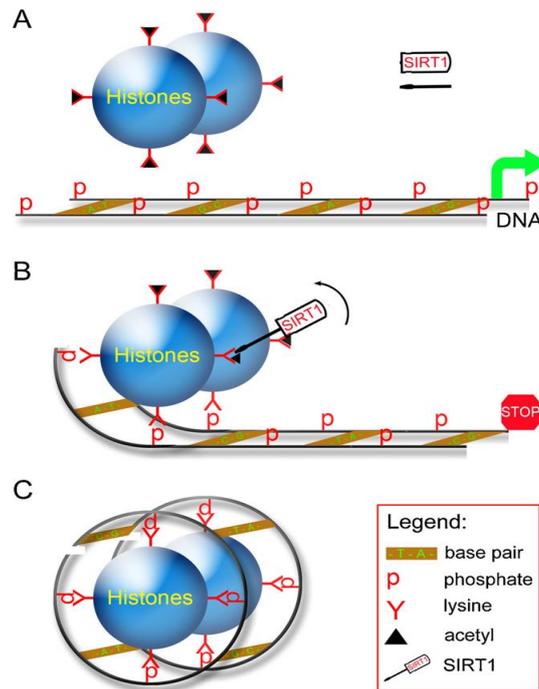


Figura 16. Mecanismo de acción de SIRT1: A) las histonas acetiladas no pueden unirse al ADN, dejándolo libre lo que permite la transcripción de genes. B) cuando SIRT1 se activa desacetila las lisinas de las histonas, dejándolas libres para unirse a los fosfatos del ADN, lo que impide la transcripción de genes. C) al unirse las histonas al ADN, este se enrolla sobre las histonas provocando el silenciamiento de genes (Zhang y cols., 2011).

Se ha demostrado que SIRT1 tiene funciones importantes a nivel cerebral, ya que regula el metabolismo energético y los ritmos circadianos, el crecimiento axonal, la formación de dendritas y por tanto la plasticidad neuronal, la supervivencia neuronal frente al estrés y ejerce protección contra la neurodegeneración y el deterioro cognitivo asociado a la edad (Ng y cols., 2015). Por este motivo la disminución de la expresión de SIRT1 en el hipocampo y en la corteza de rata debido al estrés oxidativo genera deterioro cognitivo (Wu y cols., 2006). Además, tras la activación de SIRT1 se han encontrado efectos neuroprotectores en enfermedades neurológicas agudas y crónicas (como isquemia cerebral, daño axonal, Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, y esclerosis múltiple) (Zhang y cols., 2011, Herskovits y Guarante, 2014). Por ejemplo se ha constatado que la activación de SIRT1 puede regular la patogénesis de enfermedades como el Alzheimer tanto en cultivos celulares como en modelos de animales de esta enfermedad, ya que la activación de SIRT1 inhibe las proteínas p53, NF κ B, factor de transcripción *forkhead box 3* (FOXO3), receptor de ácido retinoico beta (RAR β) y coactivador transcripcional 1 alfa (PGC1- α) impidiendo la amiloidogénesis, reduciendo el estrés oxidativo e incrementando la resistencia a la apoptosis e inflamación (Bonda y cols., 2011, Ng y cols., 2015). Debido al papel neuroprotector y al rol antagónico de SIRT1 en la progresión de los procesos neurodegenerativos, se creía que sus efectos sobre la plasticidad sináptica y las funciones

cognitivas estaban asociadas al efecto de contrarrestar las condiciones neuropatológicas que deterioran el aprendizaje y la memoria (Ng y cols., 2015). Sin embargo, en ratones *knockout* para SIRT1 en el hipocampo se comprobó que estos animales sufren deterioro de la memoria a corto plazo, la memoria asociativa, y el aprendizaje espacial comparado a ratones control (Michán y cols., 2010). También en el hipocampo de estos ratones se detectaron deficiencias en la potenciación a largo plazo (LTP), descenso en los niveles de sinaptofisina y en la densidad de espinas dendríticas (Gao y cols., 2010). Lo que en conjunto sugiere que SIRT1 regula la plasticidad sináptica y las funciones cognitivas.

En el estudio de estos animales se ha constatado que SIRT1 regula a nivel epigenético la expresión de neurotrofinas implicadas en la funcionalidad de las sinápsis. Por ejemplo, cuando descienden los niveles de SIRT1 también se produce una reducción de los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*), que se encarga de regular el tamaño y morfología de las espinas dendríticas. SIRT1 tiene diferentes mecanismos de regulación de la expresión de estas neurotrofinas, una de ellas es la desacetilación de BDNF (Zocchi y Sassone-Corsi, 2012). Por estas razones se cree que el déficit de SIRT1 en el hipocampo de animales viejos puede dar lugar a deficiencias a nivel cognitivo. Durante el envejecimiento en humanos un mecanismo compensatorio del deterioro de áreas como el hipocampo puede ser el aumento de las interacciones entre diferentes áreas cerebrales no especializadas en procesos cognitivos (Cabeza y cols., 2002; Bishop y cols., 2010).

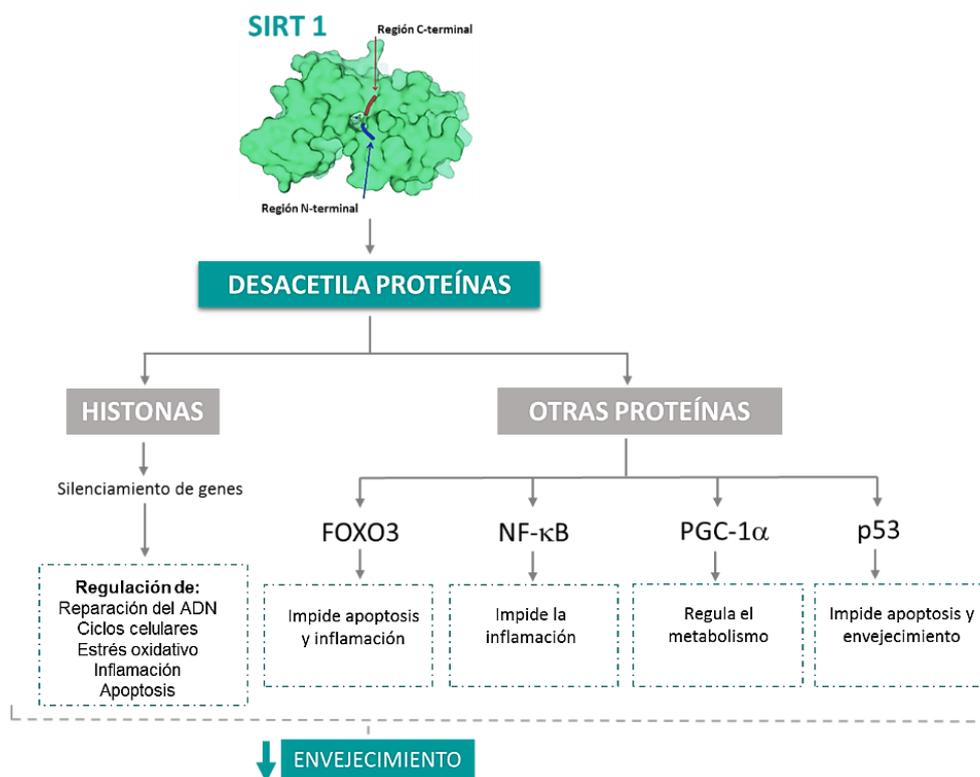


Figura 17. Esquema del papel de SIRT1 como regulador de varios procesos celulares por medio de la desacetilación de histonas y otras proteínas no histonas, controlando procesos como la inflamación y el envejecimiento.

Otros mecanismos de acción de sirtuínas: SIRT 75 kDa

Se ha descrito en condrocitos articulares humanos que el tratamiento con $\text{TNF-}\alpha$ produce una reducción de la actividad de SIRT1 (110 kDa), que está acompañada de su fragmentación proteolítica donde se produce un fragmento estable de 75 kDa (Dvir-Ginzberg y cols., 2011). Este fragmento a diferencia de la forma completa de la proteína SIRT1 (110 kDa) es incapaz de unirse a la cromatina y a los coactivadores asociados a la cromatina. Sin embargo, se ha visto que durante la respuesta inflamatoria la formación de este fragmento de 75 kDa de SIRT1 tiene la función biológica de proteger las células contra la muerte celular por apoptosis, bloqueando el ensamblaje del apoptosoma al unirse al citocromo C (Oppenheimer y cols., 2012) (**Figura 18**). Este estudio llega a la conclusión que para que se produzca una respuesta inflamatoria es necesaria la inactivación de SIRT1, pero aunque esto ocurra SIRT1 tienen un mecanismo biológico alternativo que consiste en la capacidad de evitar la muerte celular por medio de la acción de su fragmento de 75 kDa (Dvir-Ginzberg y cols., 2011).

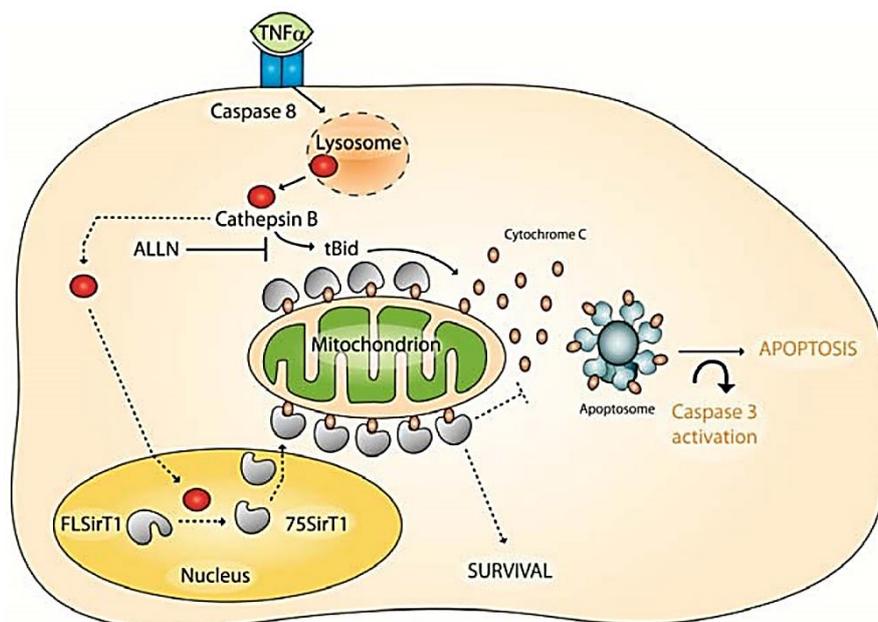


Figura 18. En condrocitos articulares humanos después de la estimulación con $\text{TNF-}\alpha$ se produce permeabilidad lisosomal dependiente de caspasa 8. La permeabilidad lisosomal aumenta los niveles de la catepsina B en el citoplasma y el núcleo de la célula. Cuando se activa la catepsina B se escinde SIRT1 (FLSirT1) nuclear para generar un fragmento de 75 kDa (75SirT1) estable pero inactivo. Este fragmento migra al citoplasma donde interacciona con el citocromo C en la membrana mitocondrial y bloquea el ensamblaje del apoptosoma. Las flechas negras continuas indican como se produciría el proceso de inflamación tras el tratamiento con $\text{TNF-}\alpha$. Moléculas como ALLN pueden bloquear la inflamación evitando la generación del fragmento de 75 kDa (Oppenheimer y cols., 2012).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El aumento de la proporción de la población envejecida conlleva un aumento en el número de personas que sufren deterioro cognitivo y enfermedades neurodegenerativas. El envejecimiento provoca modificaciones en distintos niveles en el organismo. Dentro de estas modificaciones, se encuentra el deterioro en diferentes funciones y sistemas a nivel cerebral, que afectan a los sistemas de neurotransmisión, así como generan neuroinflamación; lo que en conjunto da lugar a un declive cognitivo y motor. Por otro lado se ha visto que el uso de antioxidantes, como son los polifenoles, puede mejorar las funciones cognitivas en algunos modelos de enfermedades neurodegenerativas. A partir de estos datos, nos planteamos la siguiente hipótesis: el tratamiento con antioxidantes de tipo polifenoles podría ejercer un efecto protector a nivel cerebral, previniendo ciertos cambios que de forma natural ocurren en el envejecimiento; en particular cambios a nivel cognitivo y motor, prevención de la disminución de neurotransmisores, así como la modulación de la neuroinflamación, por medio de la regulación de proteínas implicadas en envejecimiento e inflamación como son SIRT1 y NF- κ B (entre otros).

Por tanto, el objetivo general del trabajo fue estudiar los efectos del envejecimiento a nivel cerebral; así como analizar los posibles efectos protectores de los tratamientos exógenos con polifenoles (resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina) sobre los cambios cerebrales que ocurren en el envejecimiento y también analizar los mecanismos de acción implicados.

De esta manera se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto *in vivo* de los tratamientos crónicos con los compuestos polifenólicos resveratrol, silimarina, quercetina, y naringenina sobre las capacidades cognitivas (memoria de trabajo espacial y episódica, aprendizaje viso-espacial) y la coordinación motora, durante el envejecimiento normal en ratas.
2. Estudiar el efecto de los tratamientos crónicos con antioxidantes resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre la síntesis y metabolismo *in vivo* de neurotransmisores monoaminérgicos (sistemas catecolaminérgico y serotoninérgico), en diversas regiones cerebrales (hipocampo y estriado) involucradas en el procesamiento de las funciones cognitivas y motoras, durante el envejecimiento normal en ratas.
3. Estudiar el efecto de los tratamientos crónicos con antioxidantes resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre proteínas/vías de señalización implicadas en envejecimiento e inflamación (PI3K/Akt/mTOR, MEK1/2/ERK1/2, NF- κ B, SIRT1), con especial énfasis en el análisis de SIRT1 y NF- κ B acetilada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas albinas (*Rattus norvegicus*) macho libres de patógenos (SPF) y no consanguíneas, de las siguientes edades: ratas jóvenes (3 meses, 250-350 gr), ratas adultas (9 meses, 450-550 gr) y ratas viejas (18 y 20 meses, 500-550 gr) (Charles River, Barcelona, España). Los animales se mantuvieron en un período de cuarentena previo a la fase de manipulación y experimentación. Durante el período de cuarentena y de experimentación los animales permanecieron en el estabulario de la Facultat de Ciències de la Universitat de les Illes Balears (Tipo II, Institute for Laboratory Animal Research (ILAR)) apropiado para mantenimiento de animales SPF. Los animales se mantuvieron en jaulas de polipropileno o metacrilato translúcidas de dimensión 50x30x12 cm (Panlab®, Barcelona), con viruta de madera como material de nidificación (Ultrasorb, Panlab). Permanecieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luz de 8:00 a 20:00 horas), en condiciones ambientales controladas (temperatura: 22±2 °C; humedad: 50-60 %). Recibieron bebida (agua corriente) y una dieta estándar tipo A04 (Panlab®) *ad libitum* recomendada para roedores con una aportación calórica de 2900 kcal/kg y la siguiente composición nutritiva (Tabla 5):

Composición	Contenido (%)
Humedad	12
Lípidos	3
Minerales y cenizas	5
Fibra	4
Proteína	16
Glúcidos	60 (41 es almidón)

Tabla 5. Composición de la dieta estándar A04 (Panlab®). Los valores se proporcionan a título indicativo. Se trata de un promedio. Datos extraídos de la ficha técnica de la dieta estándar A04 Panlab.

Los animales fueron manipulados durante varios días previos a la realización de los experimentos con el objetivo de minimizar el efecto del estrés debido a la manipulación durante las pruebas *in vivo*. Todos los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo durante las horas del día, realizando las pruebas comportamentales siempre de 9:00 a 13:00 horas.

Los animales se pesaron periódicamente durante el período completo de duración de cada tratamiento, en el momento exactamente anterior a recibir la correspondiente inyección intraperitoneal (i.p), con el objetivo de poder ajustar al peso real la dosis de los tratamientos, así como realizar un seguimiento adecuado de los cambios en el peso corporal de los animales. Todos los procedimientos experimentales con animales se realizaron de acuerdo con las directrices éticas

establecidas en la Convención Europea para la Protección de Animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos (Directiva 86/609/EEC) y con el informe favorable del Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universitat de les Illes Balears.

3.2 Tratamientos farmacológicos

Con el objetivo de estudiar el presumible efecto beneficioso de los antioxidantes a nivel cerebral durante el envejecimiento, se realizaron diversos tratamientos farmacológicos agudos y crónicos en ratas, con los siguientes polifenoles: resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina. Durante los tratamientos, se estudió su efecto *in vivo* sobre las capacidades cognitivas, mediante la realización de diversas pruebas: *radial maze* (laberinto radial), reconocimiento de objetos, laberinto de Barnes y *rotarod* (cilindro rotatorio). Finalizados los tratamientos, los animales fueron sacrificados y se diseccionó el cerebro, para posteriormente congelar a -80°C las diferentes regiones hasta el momento de ser analizadas. A partir de las muestras cerebrales obtenidas, se analizó el efecto de estos tratamientos sobre la síntesis y los niveles de diferentes monoaminas en varias regiones del cerebro de rata relacionadas con las funciones cognitivas y motoras; y ricas en terminales nerviosos noradrenérgicos y serotoninérgicos, que es el caso del hipocampo; así como en el estriado que es una región rica en terminales dopaminérgicos y serotoninérgicos. También se analizaron la síntesis y niveles serotoninérgicos en la glándula pineal. Para ello, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección electroquímica. Para determinar la tasa de síntesis de estas monoaminas *in vivo*, se evaluó la actividad tirosina hidroxilasa (TH) y triptófano hidroxilasa (TPH), que son las enzimas limitantes en las vías de síntesis de monoaminas. Con este objetivo, se administró un inhibidor de la enzima carboxilasa de aminoácidos aromáticos (NSD 1015) 30 min antes del sacrificio de los animales. Por otro lado, también se analizaron los niveles de las proteínas (ERK1/2, MEK1/2, Akt, mTOR, SIRT1 (110 kDa y 75 kDa) y NF-κB) en el hipocampo y en determinados casos también en estriado, corteza frontal, así como corteza parietal de rata mediante la técnica de *Western blot* (WB).

De este modo se realizaron los siguientes tratamientos:

Tratamiento agudo con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas macho Sprague-Dawley, de 18 meses de edad (500-550 g). Se utilizó una dosis de 20 mg/kg, i.p de cada uno de los siguientes polifenoles de forma independiente: resveratrol (n=5), silimarina (n=5), quercetina (n=7), naringenina (n=6), además de sus controles del mismo peso, edad y cepa (n=6) tratados con aceite de maíz (1 ml/kg, i.p). Todos los fármacos se prepararon por disolución en aceite de maíz. Los fármacos se administraron 60 minutos antes de realizar la prueba comportamental de *radial maze*.

Para los *tratamientos crónicos con los fármacos resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina*, los animales recibieron por vía intraperitoneal (i.p.) una dosis diaria del fármaco correspondiente de 20 mg/kg, entre las 8:00-9:00 a.m. Dado el carácter lipofílico de los fármacos utilizados y para evitar su oxidación, se prepararon diariamente y se administraron suspendidos en aceite de maíz. Los animales control recibieron aceite de maíz, ajustado al peso del animal (1ml/kg/día i.p), durante el mismo tiempo que los tratados.

Tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas Wistar, de 20 meses de edad (500-550 g) al inicio del tratamiento, durante 30 días (n=6). Se utilizaron como controles animales del mismo peso, edad y cepa (n=6), además de ratas jóvenes de 3 meses (250-350 g, n=8) de la misma cepa para comprobar el efecto de la edad.

Tratamiento crónico con resveratrol en ratas adultas Wistar, de 9 meses de edad (450-550 g) al inicio del tratamiento durante 15 días (n=6). Se utilizaron como controles animales del mismo peso, edad y cepa (n=5), además de ratas jóvenes de 3 meses (250-350 g, n=8) de la misma cepa para comprobar el efecto de la edad.

Tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina, durante 30 días. Para los tratamientos crónicos con silimarina (n=5), quercetina (n=7) y naringenina (n=6), se utilizaron ratas viejas Sprague-Dawley, de 18 meses de edad al inicio del tratamiento (500-550 g) (Charles River, Barcelona, España). Se utilizaron como controles animales del mismo peso, edad y cepa (n=6), además de ratas jóvenes de 3 meses (250-350 g, n=8) de la misma cepa para comprobar el efecto de la edad.

Los animales fueron sacrificados por decapitación 1 día después de la última inyección, a primera hora de la mañana (7:00-8:00), con el objetivo de evitar interferencias del cambio de hora en el ciclo biológico de los animales. Todos los animales utilizados para estudiar la modulación de la síntesis de monoaminas también recibieron una inyección del inhibidor de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos NSD 1015 (100 mg/kg, i.p.) 30 min antes de su sacrificio (ver apartado 3.4 *Determinación cromatográfica de la actividad tirosina hidroxilasa (síntesis de DOPA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HTP) in vivo*).

Durante el tratamiento crónico de 30 días con resveratrol, a parte de registrar el peso corporal, también se registró la temperatura corporal de las ratas viejas tratadas y control mediante un termistor (DS 192 1H thermocron® iButton® Maxim) colocado en el abdomen mediante cirugía, realizada bajo anestesia general con isoflurano, en condiciones de asepsia, 3 días antes del inicio de los tratamientos. De esta forma, se dejó un tiempo adecuado para que los animales se

recuperaran de la cirugía, y así evitar interferencias de esta operación en los resultados de las pruebas que se han realizado. El termistor registró la temperatura cada 30 min, durante los 30 días de tratamiento. Además, en estas mismas ratas se realizó un registro continuo de la actividad locomotora espontánea durante el tratamiento crónico. Para ello, se utilizaron marcos de registro de actividad locomotora de dimensiones 20x20 cm² de diámetro, equipado con dos rayos infrarrojos localizados a 70 mm de altura. El movimiento de los animales fue digitalizado y guardado en un ordenador equipado con un software específico, registrando la suma del número de veces que el animal interfiere con el rayo y el sensor no detecta el rayo durante intervalos de 15 min. El análisis de la actividad motora se realizó con el programa diseñado para cronobiología *El Temps* (©Díez-Noguera, Universidad de Barcelona).

3.3 Análisis conductual (pruebas comportamentales)

Para estudiar el efecto de los tratamientos agudos con polifenoles (resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina) a nivel cognitivo, se realizó la prueba comportamental de *radial maze* (laberinto radial) 60 minutos después de la aplicación i.p. de los fármacos. Para estudiar el efecto de los tratamientos crónicos con los mismos polifenoles citados anteriormente a nivel cognitivo, se realizaron las siguientes pruebas comportamentales: *radial maze*, reconocimiento de objetos, y laberinto de Barnes. Así como la prueba de *rotarod* (cilindro rotatorio) de coordinación motora. Todas estas pruebas, excepto el laberinto de Barnes (para evitar un posible efecto de aprendizaje), se realizaron al inicio (un día antes de iniciar los tratamientos crónicos), a la mitad del tratamiento crónico (15 días) y al final del tratamiento crónico (30 días). En el caso del laberinto de Barnes se realizó a los 15 y 28 días de tratamiento, para no provocar solapamiento temporal entre la realización de las diferentes pruebas el día 30.

3.3.1 Laberinto radial

Para analizar la memoria de trabajo espacial de los animales se utilizó la prueba del laberinto radial, conocida como *radial maze*. Fue diseñado para estudiar el aprendizaje espacial y la memoria en ratas (Olton y Samuelson, 1976). El aparato original consistía en ocho brazos equidistantes de una plataforma central, donde en el extremo de cada brazo se encontraba localizada en pequeños recipientes comida como un refuerzo positivo para favorecer la entrada de los animales en cada brazo. Desde su creación, el laberinto original ha sido modificado con el fin de adaptarlo a diferentes protocolos, según cual sea el objetivo del estudio (aprendizaje, memoria, otros). El *radial maze* es una de las pruebas comportamentales más adecuadas para estudiar memoria de trabajo (Olton y Samuelson, 1976; Tarragon y cols., 2012). La memoria de trabajo permite el recuerdo temporal durante el ejercicio de una tarea determinada. En este caso,

la memoria de trabajo permite al animal recordar que ha entrado recientemente en un brazo. Por lo tanto, las re-entradas y no entradas en los brazos son errores de memoria de trabajo. El diseño del aparato asegura que los animales siempre tengan que volver a la plataforma central, después de visitar cada brazo, lo que obliga al animal a elegir entre ocho posibilidades en cada ocasión. De esta forma los animales no solo utilizan el olfato como referencia, si no también las referencias visuales. Diversos estudios demuestran la utilidad de este dispositivo para investigar el efecto de diversos tratamientos sobre la memoria (Olton y cols., 1976 -1978).

El laberinto radial (Panlab, S.L. Barcelona, España) utilizado en este estudio consiste en una plataforma central octogonal (28 cm de diámetro) a partir de la cual surgen 8 brazos (70x11 cm) equidistantes (**Figura 19**), en cuyos extremos se encuentran unos pequeños recipientes en los que se coloca una pequeña cantidad de comida, para que actúe como refuerzo positivo para favorecer la entrada del animal. En las paredes de la sala donde se encuentra el laberinto hay una serie de señales de referencia que ayudan a los animales a ubicar cada uno de los brazos. Estas señales externas al laberinto contribuyen a la memoria espacial de los animales.

Antes de iniciar la prueba, los animales se mantienen 48 h (en animales viejos) o 24 h (en animales jóvenes) en ayuno con suministro de agua, para reforzar la necesidad de los animales de buscar comida y por tanto completar la prueba. La prueba se inicia colocando el animal en el centro del laberinto permitiéndole explorarlo durante un tiempo máximo de 20 min, durante el cual se anotan los brazos visitados. La prueba se considera finalizada cuando el animal haya visitado todos los brazos, en cuyo caso se considera el tiempo transcurrido desde el inicio, o hasta que hayan transcurrido los 20 min. Cada una de las pruebas es registrada mediante una cámara de video digital conectada a un ordenador. Los datos adquiridos de este modo son analizados con el programa específico para esta prueba (Smart v2.5, Panlab, S.L, Barcelona, España). Se analizan los siguientes parámetros: el tiempo total transcurrido para que el animal complete la prueba, el número total de errores y la distancia recorrida. Se consideran errores cada uno de los brazos no visitados por el animal y cada una de las repeticiones en los brazos previamente visitados (re-entradas) a lo largo de toda la prueba. Finalizada la prueba, el laberinto se limpia con etanol 95 % antes de realizar la prueba a un nuevo animal con el fin de evitar posibles errores por interferencias entre un animal y otro.

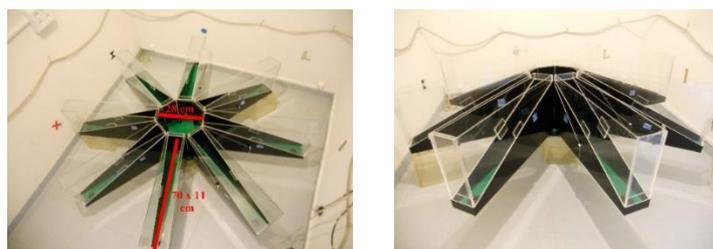


Figura 19. Laberinto radial.

3.3.2 Reconocimiento de objetos

Se realizó el test comportamental de reconocimiento de objetos para estudiar el efecto de los tratamientos con antioxidantes sobre la memoria episódica. Esta prueba consiste en la valoración de la diferencia del tiempo de exploración de un objeto nuevo y uno conocido o familiar durante un período de tiempo determinado en el contexto de un campo abierto. Esta prueba se basa en la capacidad exploratoria espontánea innata de los roedores hacia la novedad, de forma que el comportamiento puede verse alterado por la interacción con un objeto nuevo; provocando respuestas de estrés, o de acercamiento al objeto nuevo, así como un incremento en los niveles de corticosterona en plasma, indicador de estrés en ratas (Antunes y Biala, 2012). Básicamente se observa la memoria del animal al reconocer el objeto familiar y la novedad que supone el objeto desconocido. El reconocimiento del objeto nuevo puede evaluarse por la diferencia en el tiempo de exploración de los objetos nuevo y familiar.

Ennaceur y Delacour en 1988 estudiaron por primera vez la prueba de reconocimiento de objetos en roedores, donde llegaron a la conclusión de que esta prueba es un ensayo conductual simple de la memoria basado principalmente en el comportamiento exploratorio innato de un roedor en ausencia de reglas o de refuerzos aplicados externamente. Esta prueba se ha convertido en un modelo ampliamente utilizado para la investigación de las alteraciones de memoria tras tratamientos farmacológicos, daño cerebral y para estudiar las bases neuronales de la memoria (Goulart y cols. 2010). Modificando ciertos parámetros, como son el tiempo entre fases, la colocación y tipo de objetos (material, forma, color), así como el entorno donde se realiza la prueba, se puede configurar para medir la memoria episódica, la atención y la ansiedad en roedores (Goulart y cols., 2010; Silvers y cols., 2007).

La medida de reconocimiento se ve influida por el intervalo entre el tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo y el tiempo explorando el objeto familiar, así como el tiempo transcurrido entre las fases del experimento que se explican a continuación (Ennaceur y Delacour, 1988). Cuando los animales están en contacto con un objeto familiar y otro nuevo, tienen una tendencia innata a pasar más tiempo en el objeto nuevo que en el familiar (Ennaceur, 2010). Este test no requiere motivaciones externas de refuerzo, solamente es necesario un período de habituación con el objeto familiar y con el lugar donde se realiza la prueba que puede ser llevado a cabo en un período corto de tiempo (Silvers y cols., 2007). Esta habituación es necesaria, porque el ambiente en el que se realiza la prueba puede modificar la conducta del animal. La preferencia por el objeto nuevo significa que la presentación del objeto familiar existe en la memoria del animal, entonces lo que medimos es la memoria episódica, que consiste en la capacidad de recordar sucesos ocurridos anteriormente durante un cierto período de tiempo (Ennaceur, 2010).

En este trabajo la prueba se realizó en un campo abierto de (93x93x61 cm de altura) construido con madera, con una base de fórmica que contiene un dibujo de 2 círculos concéntricos dibujados sobre un fondo blanco. Sujetos a la base se colocan equidistantes dos objetos, que pueden ser iguales o diferentes en tamaño, color y forma dependiendo de la fase del experimento (**Figura 20**). El campo abierto y los objetos se limpiaron con etanol 95 % antes de comenzar el test con otra rata. Los círculos concéntricos permitieron dividir el dispositivo en zonas (periféricas y centrales) cuyas visitas también fueron medidas así como las micciones y defecaciones del animal durante la prueba, constituyendo una medida del grado de ansiedad del animal.

Esta prueba consta de las siguientes fases:

Habitación: con el fin de acostumbrar los animales al lugar donde se realiza la prueba, se coloca cada animal en el campo abierto, durante 5 min diarios, los 5 días previos a la prueba. Permitiendo la exploración y habitación con el lugar donde se realizará la prueba.

Rehabitación: el día de la prueba, se coloca cada animal en el campo abierto durante 1 min, permitiendo el reconocimiento del ambiente por parte del animal.

Familiarización: se sitúan dos objetos (cubos de plástico de 6x6 cm) a 16 cm de la pared y separados 37 cm entre ellos. A continuación se coloca el animal permitiendo la exploración de estos dos objetos hasta que el animal consiga 30 s de exploración total, o en el caso de no conseguir 30 s, se deja que el animal este en el campo abierto hasta un máximo de 10 min, anotando el tiempo total de exploración de cada objeto. Se consideró como tiempo de exploración el tiempo en el que la nariz o la boca de los animales estuvieron en contacto con el objeto. Este tiempo fue cronometrado y registrado por el investigador que realizó la prueba. Durante la sesión de familiarización ambos objetos son nuevos, por lo que el tiempo empleado en la exploración de ambos objetos debe ser similar. Los objetos eran de plástico con tres formas diferentes que no tenían relevancia para los animales ni por su forma ni por su color y nunca habían estado asociados con refuerzo, ni los habían visto antes.

Período de retraso: se dejaron transcurrir 10 min desde la fase de familiarización hasta la fase de prueba (memoria a corto plazo); durante este tiempo los animales estuvieron en sus jaulas.

Prueba: se colocan a igual distancia en el centro del campo abierto dos objetos (en el mismo lugar que los objetos de la fase de familiarización), uno de ellos igual a los colocados en la fase de familiarización (objeto familiar) y otro de diferente forma y color. A continuación, se coloca en el centro del campo abierto la rata y se apunta el tiempo de exploración de cada objeto, hasta

alcanzar un total de 30 s, correspondientes a la suma del tiempo de exploración de ambos objetos, o hasta un tiempo máximo de 10 min si no consigue completar 30 s de exploración entre los dos objetos. Se anota el tiempo dedicado a la exploración del objeto nuevo y el objeto familiar.

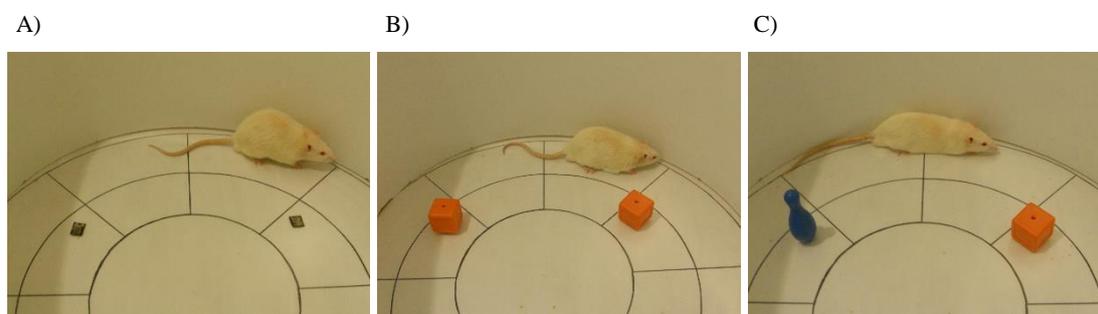


Figura 20. Campo abierto. A) Fase de habituación, B) Fase de familiarización, C) Fase de prueba.

3.3.3 Laberinto de Barnes

Se realizó la prueba comportamental del laberinto de Barnes, también conocido como *Barnes maze*, para estudiar el efecto de los antioxidantes en el aprendizaje espacial a los 15 días y a los 28 días de tratamiento.

El laberinto de Barnes fue creado por Carol A. Barnes en 1979. Es un laberinto utilizado en investigación para estudiar aprendizaje espacial. La función básica del laberinto de Barnes es determinar la habilidad de los animales para aprender y recordar la localización de la caja diana o de escape (*target*), utilizando señales de referencia localizadas en la sala donde está colocado el laberinto. Esta tarea depende de la tendencia de los animales para escapar de un ambiente aversivo en búsqueda de protección y de la capacidad de memoria espacial dependiente del hipocampo (Harrison y cols., 2009). Esta prueba no invasiva es también útil para estudiar el efecto de sustancias químicas o lesiones neurológicas sobre la cognición, así como para detectar cambios cognitivos en patologías neurodegenerativas (Barnes, 1979).

En este trabajo se utilizó una plataforma circular de madera que se encuentra a 73,5 cm por encima del suelo, color azul opaco (130 cm de diámetro) con 18 agujeros (10 cm de diámetro) equidistantes (10 cm entre orificios) ubicados en el perímetro de la plataforma. Debajo de uno de los agujeros se encuentra una caja de escape (28x18x9,5 cm) a la que nos referimos como *target* (objetivo) o caja de escape. Desde el centro del laberinto todos los agujeros son idénticos y la caja de escape tampoco se discrimina visualmente desde otros puntos del laberinto. La posición de la caja de escape se mantiene en el mismo lugar durante todo el experimento. Finalmente, para colocar al animal en el centro del laberinto hasta el comienzo del experimento se utiliza una caja de inicio (10 cm de diámetro) (**Figura 21 y 22**). Además, la agorafobia natural de las ratas se

acentúa por la presencia de dos focos de 500 W, colocados 200 cm por encima de la plataforma circular.

Se utilizan diferentes señales visuales con varios colores y formas, que se colocan en las paredes que rodean el laberinto; como referencia espacial para los animales. Además, las ratas tienen otras señales visuales espaciales en la habitación (por ejemplo una cortina, un ordenador). Estas señales no se mueven durante todo el experimento ya que éstos son los puntos de referencia del animal para localizar el *target* o caja de escape (Brown 1996; Deacon y Rawlins 2002; Barret y cols., 2009). A medida que se realizan las pruebas, el experimentador tiene que poder observar directamente el experimento, a la vez que éste es una referencia más para el animal, por este motivo es muy importante que el experimentador permanezca en el mismo lugar durante todo el experimento.

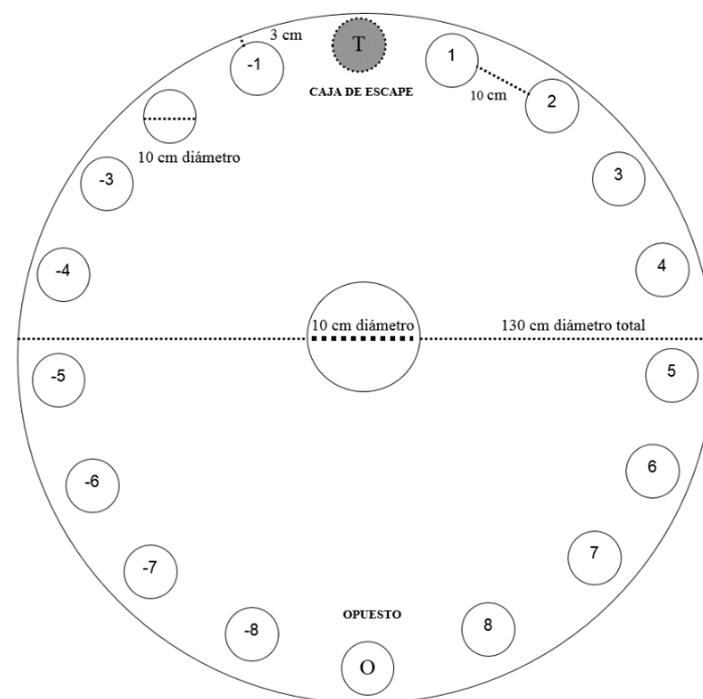


Figura 21. Diagrama del laberinto de Barnes utilizado para evaluar el aprendizaje espacial y la memoria a corto plazo en ratas.

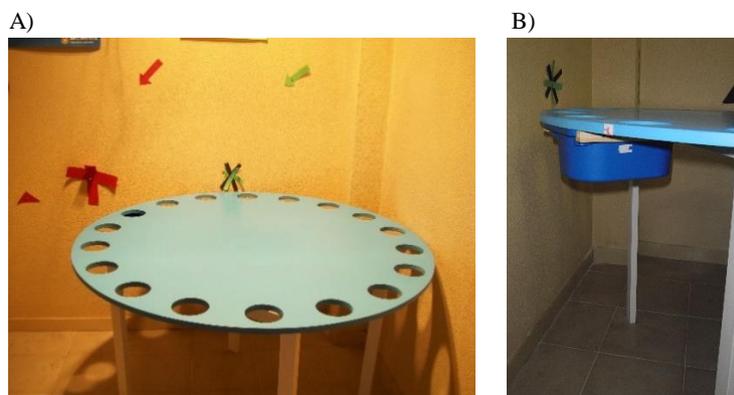


Figura 22. A) Laberinto de Barnes y B) *target* o caja de escape.

En este trabajo se empleó un procedimiento modificado del descrito por Barnes (1979). Consiste en varias fases: familiarización, entrenamiento y test.

Familiarización: el día antes de la prueba (día 1, 24 h antes del experimento), las ratas se someten a una rutina de familiarización para habituarlas al laberinto y la caja de escape. Cada rata se coloca en la caja de inicio que se encuentra justo en el centro del laberinto. Después de 10 s, la caja se levanta, la luz se enciende y el animal tiene 3 min para entrar en la caja de escape. Si no la encuentra, se dirige al animal manualmente a la caja de escape. Una vez que el animal está dentro de la caja de escape la luz se apaga. En esta caja de escape los animales permanecen durante 2 minutos y a continuación, se devuelven a su jaula de origen.

Entrenamiento: el día 2 las ratas reciben una sesión de 3 entrenamientos separados cada uno por un período de 10 min para aprender la ubicación de la caja de escape. El agujero/ubicación de la caja de escape se mantiene constante durante todo el experimento. En cada entrenamiento, la rata se coloca en la caja de inicio en el centro del laberinto, se levanta la caja después de 10 s y la luz se enciende. Cada entrenamiento finaliza cuando el animal encuentra la caja de escape o en su defecto cuando hayan transcurrido 3 minutos como tiempo máximo. En caso de que el animal no haya encontrado la caja de escape se coloca el animal manualmente en la caja, donde permanece durante 1 min. Al final de cada entrenamiento el animal se devuelve a su jaula y después de 10 min comienza el segundo entrenamiento. La superficie del laberinto se limpia con etanol 95 % entre cada animal y sesión.

Test: el objetivo de esta fase es determinar si el animal ha aprendido dónde se encuentra la caja de escape. Tiene lugar 10 minutos después del último entrenamiento. Los animales se colocan en el centro del laberinto dentro de la cámara de inicio. Se levanta la cámara a los 10 s, la luz se enciende y se deja a la rata explorar el laberinto. La prueba finaliza en el momento que el animal encuentra la caja de escape o en su defecto cuando hayan transcurrido 90 s como tiempo máximo.

Parámetros a analizar: se cuantifica el tiempo total de exploración (latencia total) en el laberinto para alcanzar la caja de escape. Además, se registra la estrategia realizada por el animal para encontrarla (Harrison y cols., 2006 y 2009). Existen tres estrategias diferentes con el fin de buscar la caja de escape (Rueda-Orozco y cols., 2008). Estrategia *directa*: las ratas se dirigen directamente a la caja (**Figura 23A**). Estrategia *seriada*: exploran los agujeros siguiendo una dirección de forma secuenciada (uno a continuación del siguiente) (**Figura 23B**). Cualquier otra forma de acercarse a la caja de escape se considera una estrategia *mixta* o *aleatoria* (**Figura 23C**). Por último, también se cuantifica el número total de errores, que es la suma de todos los agujeros

visitados (cada vez que el animal asoma su cabeza por debajo del plano de la superficie de la plataforma) donde no se encuentra la caja de escape.

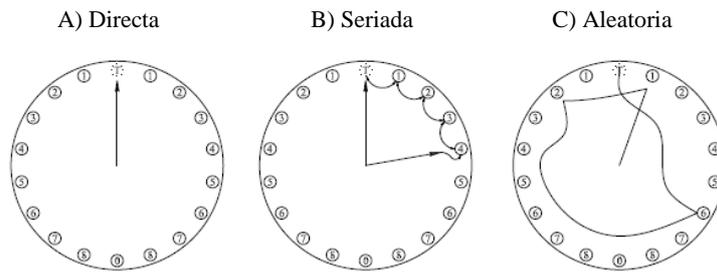


Figura 23. Esquema de los tres tipos de estrategias que el animal puede seguir para encontrar la caja de escape.

3.3.4 Rotarod (cilíndro rotatorio)

Se realizó la prueba del cilindro rotatorio, también conocida como *rotarod*, para probar los efectos sobre la coordinación motora y la resistencia a la fátiga en ratas, al inicio del tratamiento crónico (un día antes de la administración de fármacos), a la mitad del tratamiento crónico (15 días) y al final (30 días) de los tratamientos crónicos con los antioxidantes (resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina). La prueba del cilindro rotatorio es una prueba basada en la habilidad de los roedores para mantener el equilibrio en una rueda rotatoria que puede girar con una velocidad fija o con aceleración. Los animales son colocados en la rueda y la latencia para caer es una medida de su coordinación motora (Bogo y cols., 1981).

En este trabajo, se utilizó la rueda de aceleración modelo *LE8350 Rotarod* para 2 ratas de más de 500 g (Panlab, S.L, Barcelona, España) (**Figura 24**). Consiste en una rueda de aceleración colocada sobre una plataforma. Al caer el animal sobre la plataforma el aparato registra el tiempo transcurrido y deja de girar. El rotarod es controlado por un microprocesador que controla el tiempo de permanencia en la rueda y regula la aceleración. La rotación se ajusta electrónicamente a una velocidad (4-40 rpm) usando un dial en el panel frontal. También se selecciona la tasa de aceleración en un tiempo definido (60 s). El aparato se limpió con etanol 95 % antes de comenzar la prueba con otra rata.



Figura 24. Aparato de *rotarod*.

Previamente a las pruebas se entrenan los animales durante varias sesiones (durante 5 días previos al día de la prueba) en el aparato de *rotarod* con rotación constante hasta conseguir que la rata se mantenga en el aparato un tiempo estable antes de caer. A continuación, el día de la prueba, las ratas se colocan en el aparato en modo de aceleración (incremento de velocidad de 4 a 40 cm/s durante un período de 60 s). Se registra el tiempo que las ratas permanecen en el aparato sin caer. Cada rata realiza la prueba 5 veces y se considera como resultado final de la prueba la media aritmética de las 5 pruebas.

3.4 Determinación cromatográfica de la actividad tirosina hidroxilasa (síntesis de DOPA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HTP) *in vivo*

La actividad *in vivo* de las enzimas tirosina hidroxilasa (TH, tirosina-3-monooxigenasa, EC 1.14.16.2) y triptófano hidroxilasa (TPH, triptófano-5-monooxigenasa, EC 1.14.16.4), enzimas limitantes de la síntesis de catecolaminas y serotonina respectivamente, fue determinada midiendo de forma simultánea la acumulación de 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA) y 5-hidroxitriptófano (5-HTP) en los 30 min siguientes a la inhibición de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos con una dosis efectiva máxima de 100 mg/kg, i.p de 3-hidroxibenzilhidrazina HCl (NSD 1015) (Carlsson y cols. 1972; Nissbrandt y cols. 1988) (**Figura 25**). Este método de la acumulación de los precursores DOPA y 5-HTP es el más usado para evaluar la actividad *in vivo* de las enzimas TH y TPH cerebrales. La DOPA y el 5-HTP formados a partir de la hidroxilación por dichas enzimas endógenas fueron medidos por HPLC con un detector electroquímico.

Existen dos isoformas del enzima TPH: TPH-1 que se expresa principalmente en la glándula pineal y en las células del intestino (Walther y cols., 2003) y TPH-2 que se expresa preferentemente en el resto del cerebro, donde tiene un papel fundamental en la síntesis de serotonina (5-HT) (Zhang y cols., 2004). Por lo tanto, los datos sobre la síntesis de 5-HTP en cerebro se refieren a la actividad de la TPH-2, mientras que las medidas en la pineal hacen referencia a la actividad de la TPH-1. En cuanto a la TH, solo se ha descrito una isoforma, pero debido a que la hidroxilación de la tirosina es un paso común en la síntesis de catecolaminas, la acumulación de DOPA en el cuerpo estriado indica preferentemente la síntesis de dopamina (DA) (Sastre-Coll y cols., 2002), mientras que en el hipocampo, indica principalmente la síntesis de noradrenalina (NA) (Sastre-Coll y cols., 2002).

De esta forma, se determinó la síntesis de NA en hipocampo, una region cerebral rica en terminales nerviosos noradrenérgico. También, la síntesis de DA en el estriado, una región rica en terminales dopaminérgicos. Y la síntesis de 5-HT se midió en ambas regiones cerebrales que

son ricas en terminales nerviosos serotoninérgicos. También se midió la síntesis de 5-HT en la glándula pineal.

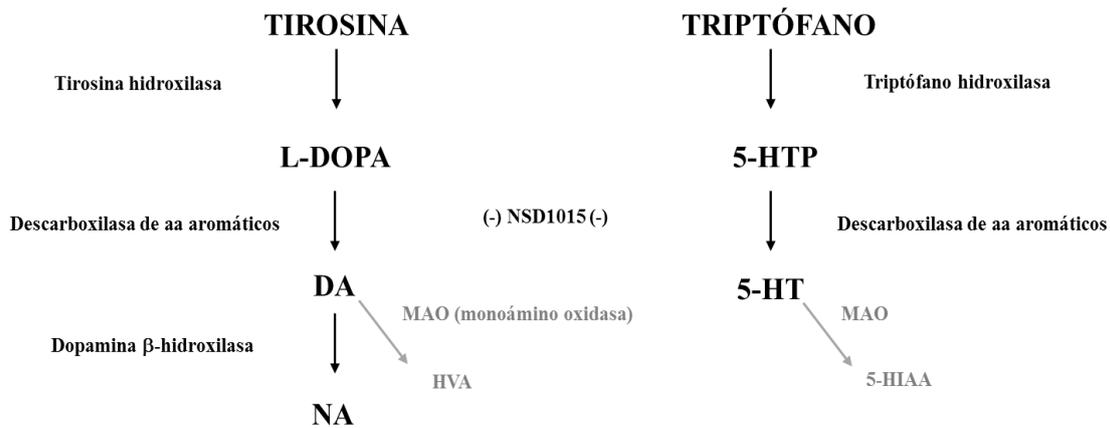


Figura 25. Esquema del efecto del NSD 1015 sobre las vías de síntesis de monoaminas.

3.4.1 Disección y preparación de muestras

Tras decapitar las ratas, los cerebros fueron extraídos rápidamente y se diseccionaron las distintas regiones a estudiar en una placa de aluminio a 4 °C. Se extrajeron el hipocampo, estriado y glándula pineal (**Figura 26**), junto con otras regiones para otros estudios. Estas regiones cerebrales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su procesamiento (Esteban y cols., 2010 a).

Antes de proceder a la homogenización, las regiones fueron pesadas y colocadas individualmente en tubos fríos que contenían 1 ml de tampón de homogenización (HClO₄ 0,4 M, K₂EDTA 0,01 % y Na₂S₂O₅ 0,1 %), y en el caso de la glándula pineal 120 µl de tampón de homogenización. Se utilizó un homogenizador Ultraturax (tipo Tp 18/10) a velocidad máxima durante 30 s. En el caso de la glándula pineal, en lugar de homogenizar, se sonó durante 10 s a una amplitud de onda de 30 %. A continuación las muestras se centrifugaron a 40.000 g durante 20 min a 4°C, y las glándulas pineales a 40.000 g durante 5 min a 4°C (centrífuga refrigerada serie Biocen 22R, con rotor 222) y el sobrenadante se filtró con un filtro de jeringa de teflón de 0,45 µm de diámetro de poro (Spartan-3, Sigma-Aldrich; Millex®-LH; Millipore; Billerica, Mass, USA). Estos sobrenadantes filtrados se volvieron a congelar a -80 °C hasta el momento de su cuantificación por HPLC con detección electroquímica.

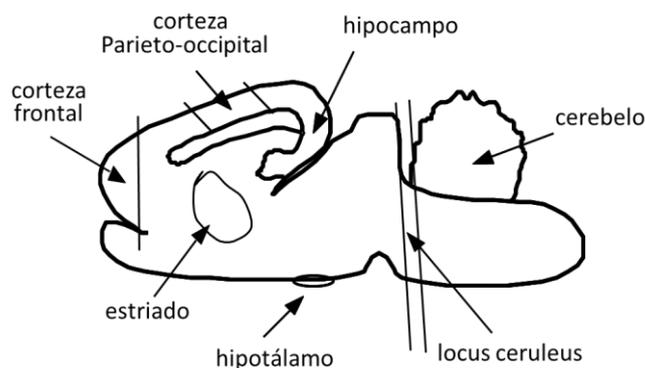


Figura 26. Representación esquematizada de la disección del cerebro de rata (visión sagital).

3.4.2 Análisis cromatográfico

Los niveles de monoaminas, de sus precursores y metabolitos fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), con detección electroquímica (**Figura 27**). Se inyectaron alícuotas de 20-50 μ l de los sobrenadantes de las muestras cerebrales de hipocampo, estriado y glándula pineal. Se determinó simultáneamente noradrenalina (NA), dihidroxifenilalanina (DOPA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), dopamina (DA), 5-hidroxitriptófano (5-HTP), ácido 5-hidroxitriptacético (5-HIAA), ácido homovanílico (HVA) y serotonina (5-HT).



Figura 27. Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Para separar los compuestos anteriormente citados se utilizó una columna de tipo Spherisorb S3 ODS1 (5 μ m de tamaño de partícula, 4,6 mm x 100 mm; Waters) acoplada a una precolumna Tracer ODS2 C18 (2-5 μ m de tamaño de partícula) (Teknokroma). La columna se mantuvo a 35 $^{\circ}$ C, al igual que el detector electroquímico y las muestras se mantuvieron a 4 $^{\circ}$ C. La fase móvil (KH_2PO_4 0,1 M; ácido octano sulfónico (OSA) 2,1 M; K_2EDTA 0,1 M, KCl 2 mM y metanol 10

% (v/v); con pH ajustado al rango 2,72-2,76 con H₃PO₄ 85 %) fue impulsada a un flujo de 0,8 ml/min por una bomba de doble pistón tipo Waters 600 controller. Para evitar la formación de burbujas se burbujeo helio de forma continua en el eluyente.

Los compuestos fueron detectados electroquímicamente, manteniendo un potencial aplicado de + 0,75 V frente al electrodo de referencia *in situ* (Ag/AgCl) (Waters 2465 Electrochemical Detector). La corriente producida fue captada por un ordenador PC gracias al software Empower Pro de Waters®, a través de una interfase tipo WAT busSAT/IN Module (Waters).

Las concentraciones de NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HTP, 5-HIAA, HVA y 5-HT de la muestra inyectada fueron calculadas interpolando la altura del pico correspondiente en la curva estándar realizada diariamente para cada compuesto, con patrones externos (**Figura 28**). Se utilizó el software Empower Pro. Los valores de los compuestos se expresaron en ng/g de tejido húmedo.

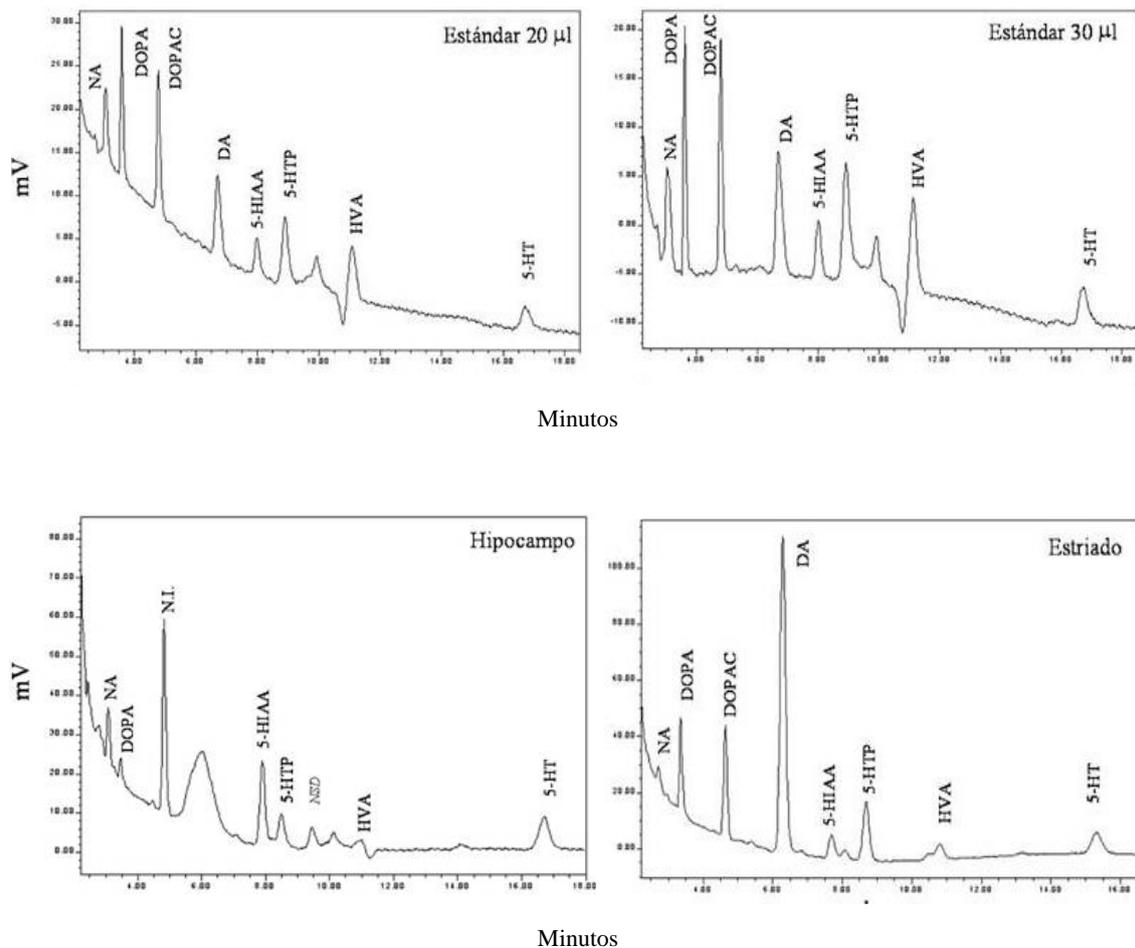


Figura 28. Análisis cromatográficos de distintas preparaciones. Los cromatogramas representan distintas preparaciones estándar (20 y 30 µl) y preparaciones de las regiones hipocampo y estriado del cerebro de ratas control. En estos cromatogramas se identifican los siguientes compuestos por orden de aparición: NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HIAA, 5-HTP, NSD 1015, HVA y 5-HT. N.I. = compuesto no identificado porque no corresponde con el tiempo de retención de ningún compuesto presente en el estándar.

3.5 Detección y cuantificación de la inmunoreactividad de proteínas mediante la técnica de *western blot*

3.5.1 Preparación de las muestras

Para la detección y cuantificación de las distintas proteínas que forman parte de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR, MAPK, SIRT1, NF- κ B se procesaron el hipocampo, el estriado, la corteza frontal y la corteza parietal de animales sometidos a distintos tratamientos con el protocolo descrito a continuación.

Se homogenizaron de 100 a 150 mg de tejido de las distintas regiones cerebrales con un homogenizador de aspas Ultraturax a máxima velocidad, dos veces durante 10 segundos (dejando 5 segundos entre cada homogenización), en una proporción 1:15 peso/volumen de tampón de homogenización: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 2 % SDS y mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas 10 mM. A continuación, las muestras fueron sonicadas tres veces durante 5 segundos. Una alícuota del homogenado fue congelado a - 80 °C hasta su utilización para la determinación del contenido proteico según el método del ácido biciconínico (ver apartado 3.5.2 *Determinación del contenido proteico de las muestras*). Una vez calculado la cantidad de proteína total en cada muestra, los homogenados totales obtenidos se ajustaron con tampón de homogenización a una concentración de 3 μ g/ μ l. A continuación se añadió el mismo volumen de tampón Laemmli de carga (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1,5 % SDS; 10 % glicerol; 2,5 % 2-mercaptoetanol; 0,1 % azul de bromofenol). Las muestras se desnaturalizaron por calor en un baño maría a 95 °C durante 5 min y se almacenaron a - 20 °C hasta su posterior análisis. La preparación de las muestras se llevó a cabo en tandas de unas 10 muestras de las que al menos dos procedían de animales control. En todo momento se controló el tiempo para que todo el tiempo de procesamiento no excediera de 1 hora. La temperatura fue controlada 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 aniónico SDS en el tampón de homogenización, la determinación del contenido proteico se llevó a cabo utilizando el método del ácido biciconínico que es compatible con una concentración de hasta un 1 % de SDS (Smith y cols., 1985). En este método las proteínas reaccionan a través del enlace peptídico con el ión cobre II (Cu^{2+}) reduciéndolo en medio alcalino a cobre I (Cu^{+}) (reacción de Biuret). Dos moléculas de ácido biciconínico reaccionan con una molécula de cobre I para dar una coloración púrpura al medio.

Este complejo soluble en agua posee un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm.

En una placa multipocillos se prepararon la curva patrón y las muestras, para proceder a la lectura de su absorbancia a esta longitud de onda. 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. De forma paralela se prepararon las muestras en las que se quería determinar el contenido proteico. Para ello se diluyeron 20 µl de muestra con 20 µl agua bidestilada, completando un volumen de 40 µl. A continuación se añadieron, tanto a las muestras como a la recta patrón, 2 ml de reactivo BCA (Pierce, U.S.A.) compuesto por 50 volúmenes de reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en 0,1 M de hidróxido de sodio) y un volumen de B (sulfato cúprico). Las muestras se procesaron por triplicado y la recta patrón por duplicado. La placa se incubó a 37 °C durante 30 min y, posteriormente, se dejó reposar a temperatura ambiente. Hasta la lectura se mantuvo la placa en oscuridad para evitar que se degradaran los compuestos presentes en la placa. Los valores de absorbancia se midieron en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemania) a 562 nm. Este espectrofotómetro proporciona automáticamente los valores proteicos de las muestras al extrapolar sus absorbancias con las 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 desnaturizantes SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli, 1970).

Los geles de poliacrilamida son soportes restrictivos que evitan la convección y minimizan la difusión, además participan directamente en el proceso de separación de las muestras. Se preparan de modo que sus poros sean de un tamaño comparable al de las proteínas de manera que produzcan un efecto de tamizado molecular. Los geles de poliacrilamida se preparan a partir de un compuesto monomérico de bajo peso molecular (acrilamida) que polimeriza en largas cadenas. Para unirlos se utiliza la N,N'-metilen bisacrilamida en una relación acrilamida:bisacrilamida constante de 37,5:1. El parámetro decisivo que determina el reticulado del gel es la concentración total de monómeros (acrilamida + bisacrilamida).

Por otra parte, el SDS ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2 = \text{SO}_3\text{Na}^+$) interacciona con la gran mayoría de las proteínas por absorción no específica, formando complejos. En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM cada gramo de proteína une 1,4 g de SDS, lo que equivale a la unión de

una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos. Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (debido a su grupo SO_4^-), las cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas y los complejos proteína/SDS están cargados de forma uniforme. La carga por unidad de masa es prácticamente constante para todos los complejos proteína/SDS e hidrodinámicamente todos se comportan como elipsoides, de unos 18 Å de diámetro menor. Solo difieren en su longitud, acorde con el tamaño de cada proteína. La movilidad electroforética en estas condiciones desnaturizantes está en función de la masa molecular de cada proteína. La separación ocurre principalmente como resultado del tamizado molecular a través del gel, de manera que cuanto menor sea la masa mayor será su movilidad. El campo eléctrico al que se someten las proteínas durante la electroforesis suministra la fuerza impulsora a través del tamizado molecular. La concentración de acrilamida en el gel determinará el rango de separación de las proteínas. El peso molecular de la proteína en estudio puede determinarse comparando su movilidad electroforética con estándares de peso molecular conocido.

Se utilizaron geles con sistemas de tampón discontinuo en los que se pueden diferenciar dos zonas: un gel de concentración de muestras (*stacking*), no restrictivo, 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. Los geles tenían un tamaño de 7x10 cm con 1 mm de espesor y, en ellos, se cargaron entre 5-30 µl de muestra, cargando un volumen final que contuviera 30 µg/µl de proteínas en cada muestra. Así como se cargaron 3 pocillos con un *pool* de 20 µl (30 µg/µl de proteínas) formado por la mezcla de diferentes muestras de corteza parietal o hipocampo de ratas jóvenes, para normalizar los resultados de inmunodensidad obtenidos dentro de cada membrana. 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 para la determinación de los pesos moleculares e identificación de la banda electroforética correspondiente a la proteína en estudio en cada caso. Se utilizó el marcador de peso molecular de proteínas *PiNK* (NIPPON Genetics Europe) constituido por 10 proteínas preteñidas que abarcan un rango de pesos moleculares entre 15 y 175 kDa.

Una vez las muestras fueron cargadas en el gel de concentración 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.



Figura 29. Material para la realización de electroforesis y esquema de un dispositivo de SDS-PAGE, dónde se observa el gel de apilamiento y el gel resolutivo.

3.5.4 Electrotransferencia (*western blot*)

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de $0,45\ \mu\text{m}$, un medio más estable y rígido, aplicando un campo eléctrico perpendicular al plano del gel, proceso conocido como *western blot*. Una vez en la membrana, las proteínas están accesibles (lo que no ocurre en el gel) para interactuar con otras moléculas que permitan su identificación. En este caso se utilizó anticuerpos para su identificación y la técnica recibe el nombre de *immunoblotting*. Esta técnica se basa en la capacidad que poseen los anticuerpos en reconocer de forma específica determinadas proteínas que actúan como antígenos. Es necesario poseer anticuerpos monoclonales o policlonales capaces de reconocer epítopos de antígenos desnaturalizados. Los anticuerpos se unen al epítipo mediante fuerzas de atracción no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas), de modo que el complejo antígeno-anticuerpo está en constante equilibrio con formas libres de ambos componentes.

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 30**).

Transcurrido ese tiempo, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución bloqueadora que consistió en tampón TBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Na₂HPO₄, 1,38 mM KH₂PO₄, 0,1 % tween 20, pH 7,4) que contenía un 5 % de leche en polvo desnatada y 0,1 % Tween 20 (monolaureato de polioxietilensorbitan). Las proteínas de la solución bloqueadora deben unirse inespecíficamente a todas las porciones de membrana que no han adsorbido proteínas procedentes del gel tras la electrotransferencia. Este bloqueo evita la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana e incrementa la probabilidad de que solo se unan a sus respectivos antígenos.

El método de detección utilizado en estos experimentos es el método indirecto. Tras el bloqueo de las uniones inespecíficas las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante unas 13 a 16 horas (*o/n over night*) a 4 °C con una suave y continua agitación, con el anticuerpo primario específico contra la proteína analizada inmovilizada en la membrana. También se repite el mismo proceso, para las proteínas totales y el control de carga α -tubulina. Tras una serie de lavados de las membrana (al menos 3 de 5 min) en tampón TBS-tween, se incubaron con el anticuerpo secundario, que reconoce de forma específica el anticuerpo primario utilizado, durante 2 horas. Este anticuerpo secundario se obtiene contra inmunoglobulinas de la especie animal en la cual se ha obtenido el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios utilizados en estos experimentos reconocen inmunoglobulinas de conejo excepto algún caso en el que reconocen inmunoglobulinas de ratón (por ejemplo para detectar α -tubulina). El anticuerpo secundario está unido covalentemente a un sistema de detección que en este caso fue un sistema enzimático. Se utilizaron anticuerpos secundarios unidos covalentemente a peroxidasa de rábano.

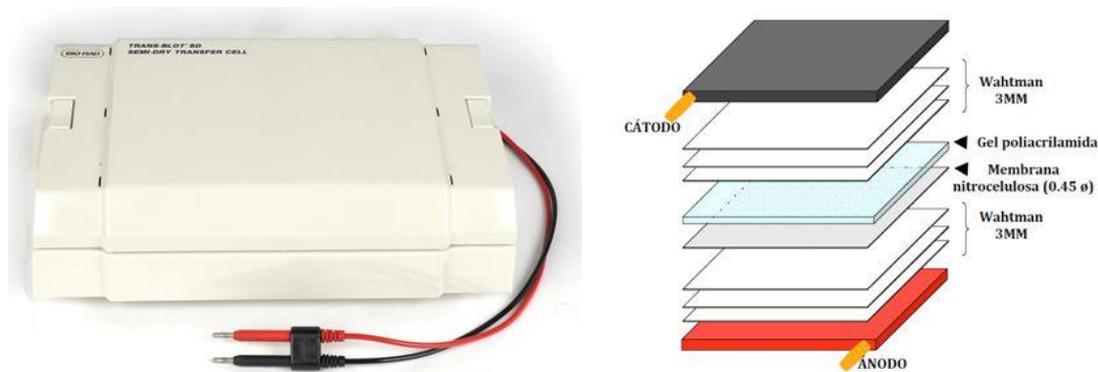


Figura 30. Equipo de transferencia y esquema representativo de la realización de la electrotransferencia.

Por último, se realizaron 3 lavados de 5 min con tampón TBS-tween y se procedió a la detección de la señal quimioluminiscente mediante el uso de un compuesto específico preparado diariamente (en el siguiente apartado se detalla la composición).

Para la detección inmunológica de las proteínas no fosforiladas (totales) se utilizaron las mismas membranas de nitrocelulosa en las que previamente se habían detectado, con los anticuerpos adecuados, las formas fosforiladas de estas proteínas. Para ello, se utilizó la técnica conocida con el nombre de *stripping immunoblot*, que permite eliminar los anticuerpos utilizados previamente y reutilizar las membranas para la detección de otras proteínas. Para realizar *stripping* se mantienen las membranas durante 15 min a 37 °C en el tampón de *stripping* (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM 2-mercaptoetanol; 2 % SDS). A continuación se realizan sucesivos lavados con tampón TBS-tween 20 (3-4 lavados de unos 5 min), hasta eliminar completamente el tampón de *stripping*. Luego se vuelve a bloquear las uniones inespecíficas mediante una solución bloqueadora realizada con tampón TBS-tween y 5 % de leche en polvo desnatada. Y se vuelve a incubar con los anticuerpos primarios y secundarios específicos para las proteínas que se pretende analizar. Se realizaron un máximo de 3 incubaciones con anticuerpos distintos siguiendo siempre la misma secuencia de incubación: forma fosforilada de la proteína analizada, proteína total y por último α -tubulina.

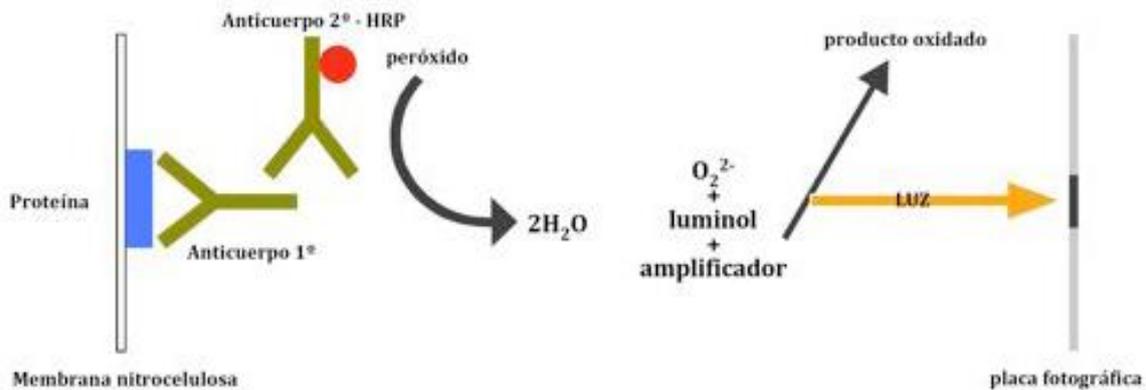
3.5.5 Sistema de detección

La inmunoreactividad fue detectada mediante un sistema de quimioluminiscencia amplificada (ECL, Enhanced Chemiluminescence). Las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante un minuto a temperatura ambiente con los reactivos de revelado compuestos por luminol y ácido cumárico consistente en las siguientes 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. Para el revelado de las membranas se combinaron ambas soluciones a razón 1:1. Uno de los principales componentes de estos reactivos es el luminol. La enzima peroxidasa de rábano que lleva unido el anticuerpo secundario cataliza la reacción de oxidación del luminol (diacilhidracida cíclica) en presencia de peróxido de hidrógeno (**Figura 31A**). Tras esta reacción de oxidación, el luminol pasa a ser un compuesto intermedio inestable que decae con emisión de luz. Un agente fenólico de amplificación, incluido en los reactivos de revelado, es capaz de amplificar más de cien veces la intensidad de esta luz emitida.

La señal quimioluminiscente emitida por este sistema llega a un máximo de intensidad entre los 5-20 primeros minutos y posteriormente decae lentamente con una semivida de emisión de unos 60 min (**Figura 31B**). La mezcla de revelado se vertió entonces sobre la zona de la membrana

donde se encontraban las proteínas de interés y se incubó durante 1 minuto en la oscuridad. A partir de ese momento se analizó la emisión de luz por parte de las membranas mediante el sistema de captura de imágenes por quimioluminiscencia GeneGnome XRQ (Syngene, USA). En el caso de los experimentos presentados en este trabajo el tiempo de exposición fue distinto (entre 1 min y 20 min) dependiendo de la proteína a estudiar y los anticuerpos utilizados.

A)



B)

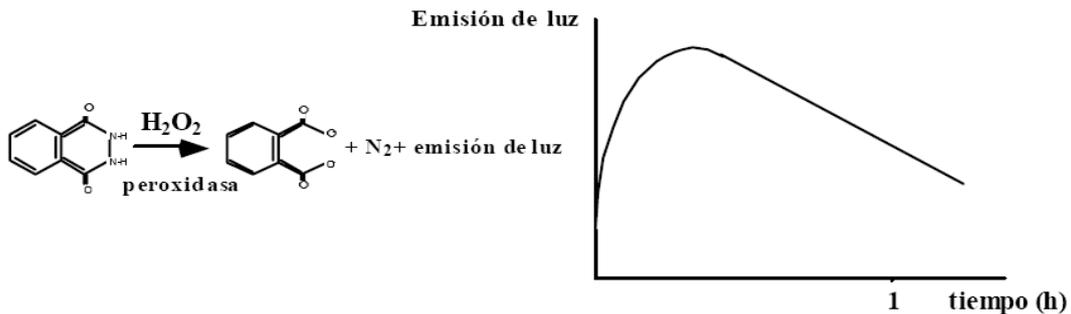


Figura 31. Sistema de detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL. A) Las membranas de nitrocelulosa son incubadas primero con el anticuerpo primario y seguidamente con el anticuerpo secundario conjugado con el enzima peroxidasa de rábano. La luz emitida por quimioluminiscencia es detectada al incubar las membranas con los reactivos ECL y exponerlas a una película fotográfica. B) Reacción de oxidación del luminol por acción del peróxido de hidrógeno catalizado por la peroxidasa de rábano. La luz producida por este sistema llega a un máximo de emisión entre los 5-20 min y decae lentamente con una semivida de 60 min.

3.5.6 Cuantificación fotodensitométrica

El análisis de las imágenes fue realizado con el programa de dominio público *NIH Image program*, desarrollado por U.S. National Institutes of Health y accesible de forma gratuita en la página web <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>. De esta manera se obtienen los valores de densidad óptica integrada (DOI) que resultan de la suma de píxeles 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.

Con el objetivo de normalizar los valores de DOI dentro de cada membrana, se compararon en el mismo gel los niveles de inmunodensidad de la proteína diana en el tejido y tratamiento estudiado respecto un control interno *pool* formado por un mix de muestras de corteza parietal o hipocampo de ratas jóvenes. La cuantificación de cada muestra se realizó al menos 4 veces en diferentes geles; cada gel cargado con diferentes muestras cerebrales de ratas control o tratadas con los distintos fármacos. Finalmente, se calculó la variación en la inmunoreactividad de cada rata sometida a cada tratamiento específico respecto a las muestras control (100 %) en distintos geles. Y se usó el valor promedio como la estimación final.

Se comprobó la linealidad de la DOI frente a la concentración de proteína total, en un rango comprendido entre 15 µg y 52,5 µg. Para ello se utilizaron los anticuerpos anti-SIRT1 y NF-κB. Una vez comprobada la linealidad, se eligió para cargar en cada gel una concentración de proteínas que diera una buena señal, para posteriormente poder cuantificar las imágenes obtenidas de cada experimento. Esta concentración fue de 30 µg de proteína.

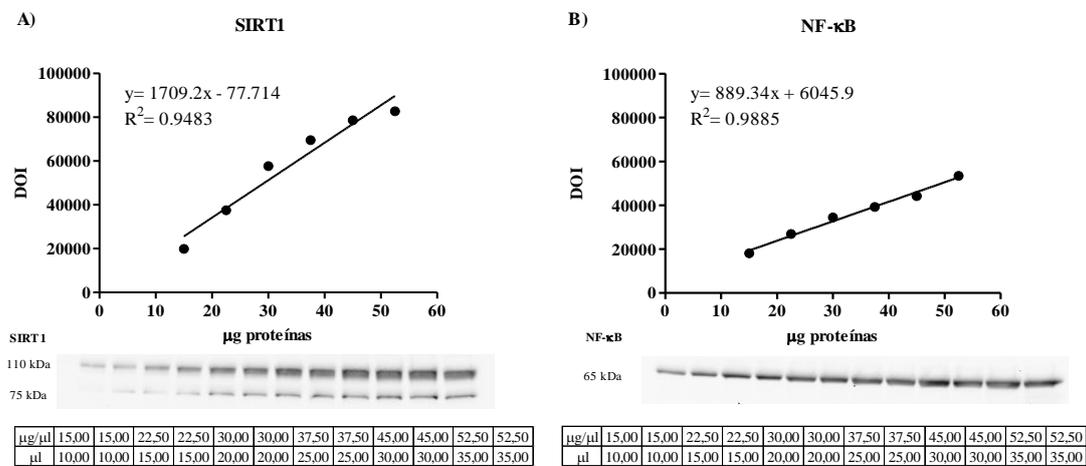


Figura 32. Rectas patrón de pool de hipocampo de ratas jóvenes con los anticuerpos: a) anti-SIRT1 y b) NF-κB. La recta viene dada por los valores promedio de las DOI de las muestras.

3.6 Análisis matemático de los resultados

Todos los resultados fueron analizados con el programa GraphPad Prism™ versión 5.0. (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

Para la evaluación estadística de los resultados se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA), seguido de los test *post hoc* de Scheffé, Newman-Keuls o Fisher cuando se compararon más de dos grupos experimentales, o se utilizó el test t de Student cuando se realizó la comparación estadística de dos grupos de animales. En algunos casos para la comparación estadística de los datos comportamentales (al estudiar diferencias respecto al mismo animal) se utilizó una ANOVA de medidas repetidas seguida de alguno de los test *post hoc* citados anteriormente. Para analizar las estrategias seguidas en el laberinto de Barnes se utilizó el test de chi-cuadrado, por tratarse de una variable cualitativa. El análisis de correlación lineal entre parámetros cuantitativos se expresó mediante el coeficiente de correlación r de Pearson. En todos los casos se consideró como estadísticamente significativo un nivel mínimo de probabilidad *p* igual o inferior a 0,05.

3.7 Fármacos y otros reactivos

A continuación se citan los fármacos y reactivos utilizados en los tratamientos y pruebas descritos anteriormente.

3.7.1 Fármacos

Se realizaron tratamientos crónicos con los siguientes fármacos antioxidantes:

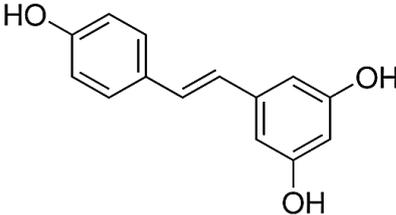
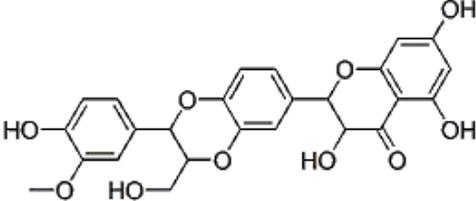
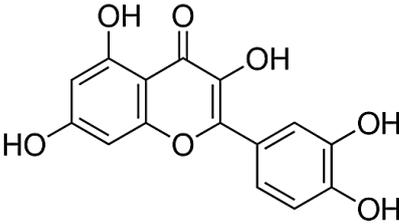
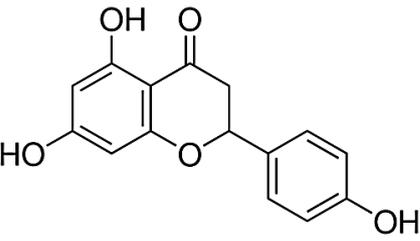
Fármaco	Estructura química
<p>Resveratrol (3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene, 5-((1E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl)-1,3-benzenediol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)</p>	
<p>Silimarina ((2R,3S)-3,5,7-Trihydroxy-2-((2R)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)</p>	
<p>Quercetina (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one, 3,3',4',5,6-Pentahydroxyflavone, Quercetin-3-O-rhamnoside; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)</p>	
<p>Naringenina ((±)-Naringenin, (±)-2,3-Dihydro-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one, 4',5,7-Trihydroxyflavanone ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)</p>	

Tabla 6. Fármacos antioxidantes, nomenclatura y estructura química. Datos extraídos de: <http://www.sigmaaldrich.com>

Para disolver los fármacos anteriores se utilizó aceite de maíz (*corn oil*) como medio de disolución para compuestos grasos solubles (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

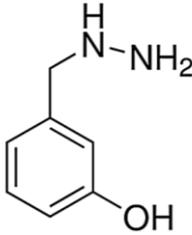
Fármaco	Estructura química
<p>Clorhidrato de 3-hidroxibenzil-hidrazina (NSD 1015) (3-Hydroxybenzylhydrazine dihydrochloride; Sinónimo: α-Hydrazino-<i>m</i>-cresol dihydrochloride, 3-(Hydrazinomethyl)phenol dihydrochloride, NSD- 1015; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)</p>	 <p>HCl HCl</p>

Tabla 7. Nomenclatura y estructura química del NSD 1015.
Datos extraídos de: <http://www.sigmaaldrich.com>

3.7.2 Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios por orden alfabético:

p-Akt

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína fosforilada de 60 kDa p-Akt (Ser473), fue suministrado por Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, USA) (número de catálogo: 9271S, lote: 13). Este anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un fosfopéptido sintético (KLH-acoplado) correspondiente a los residuos colindantes a la Ser473 de Akt de ratón. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

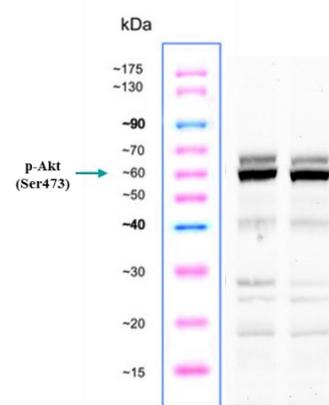


Figura 33. Membrana de *western blot* representativa de la proteína p-Akt.

Akt

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína de 60 kDa Akt, que detecta la proteína Akt independientemente de su estado de fosforilación (Akt total), fue suministrado por Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, USA) (número de catálogo: 9275S, lote: 25). Este anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un péptido sintético correspondiente a la secuencia carboxi-terminal de Akt de ratón. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

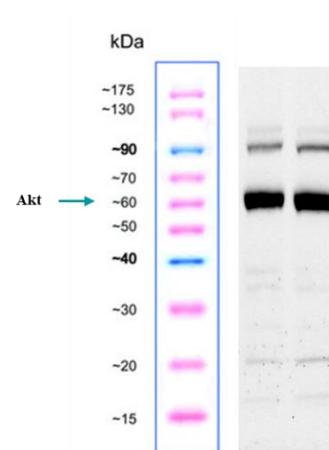


Figura 34. Membrana de *western blot* representativa de la proteína Akt.

p-ERK1/2

El anticuerpo monoclonal (IgG de conejo) contra la proteína fosforilada de 42 y 44 kDa p-p44/42 (p-ERK1/2), fue suministrado por Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, USA) (número de catálogo: 9101S, lote: 27). El anticuerpo reconoce ERK1/2 cuando la Thr202 y/o Tyr204 de ERK1 está fosforilada y/o cuando la Thr185 y la Tyr187 de ERK2 están fosforilada. El anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un péptido sintético correspondiente a los residuos colindantes a Thr202/Tyr204 de p44 MAP quinasa de humanos. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

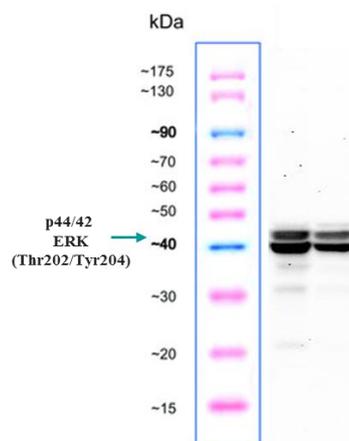


Figura 35. Membrana de *western blot* representativa de la proteína p-ERK1/2.

ERK1/2

El anticuerpo monoclonal (IgG de conejo) contra la proteína total de 42 y 44 kDa, p44/42 (ERK1/2), que detecta la proteína ERK1/2 independientemente de su estado de fosforilación (ERK total), fue suministrado por Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, USA) (número de catálogo: 9102S, lote: 18). Este anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un péptido sintético correspondiente al residuo cercano al extremo C-terminal de p44 MAP quinasa de rata. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20°C hasta su utilización.

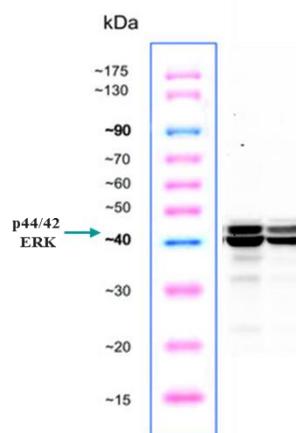


Figura 36. Membrana de *western blot* representativa de la proteína ERK1/2.

p-MEK1/2

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la forma fosforilada de la proteína de 45 kDa p-MEK1/2, fue suministrado por Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, USA) (número de catálogo: 9122, lote: 10). El anticuerpo reconoce MEK1/2 cuando la serina 217 y/o la serina 221 están fosforilada. Los anticuerpos policlonales de p-MEK1/2 se obtienen por inmunización de conejos con un fosfo-péptido sintético (KLH-acoplado) correspondiente a los residuos cercanos a Ser217/221 de MEK1/2 de humanos. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

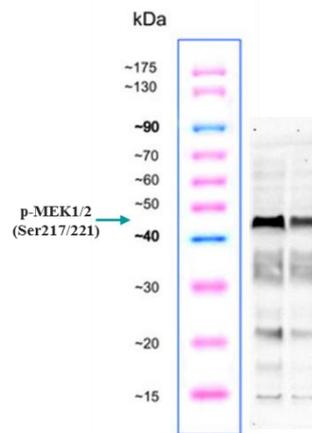


Figura 37. Membrana de *western blot* representativa de la proteína p-MEK1/2.

MEK1/2

El anticuerpo monoclonal (IgG de conejo) contra la proteína de 45 kDa total de MEK1/2, que detecta la proteína MEK1/2 independientemente de su estado de fosforilación (MEK1/2 total), fue suministrado por Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, USA) (número de catálogo: 91215, lote: 19). Este anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un péptido sintético correspondiente a la secuencia MEK1/2 de humanos. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

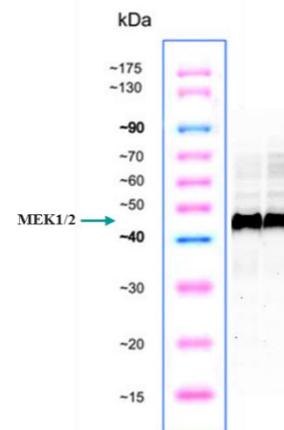


Figura 38. Membrana de *western blot* representativa de la proteína MEK1/2.

p-mTOR

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) que detecta la proteína de 289 kDa p-mTOR (Ser2448), fue suministrado por Millipore (Alemania) (número de catálogo: 09-213, lote: DAM1805276). Reconoce mTOR cuando la Ser2448 está fosforilada. Este anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un fosfopéptido sintético que comprende la Ser2448 fosforilada de mTOR de humanos. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

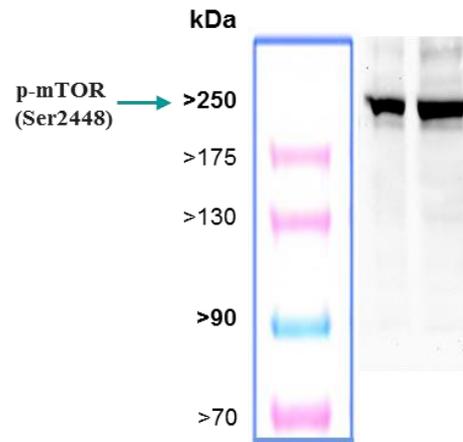


Figura 39. Membrana de *western blot* representativa de la proteína p-mTOR.

p-NF-κB

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína de 65 kDa p-NF-κB (p-p65), que reconoce la fosforilación de la serina (ser276), fue suministrado por Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA) (número de catálogo: sc-101749, lote: C3012). Este anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un fosfopéptido sintético del extremo C-terminal fosforilado de la proteína NF-κB de humanos. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

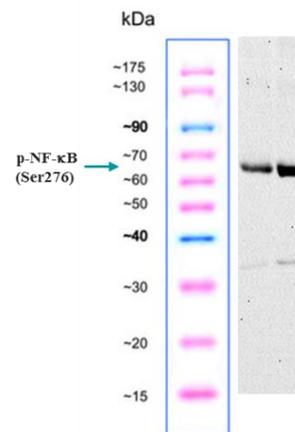


Figura 40. Membrana de *western blot* representativa de la proteína p-NF-κB.

NF- κ B

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína de 65 kDa NF- κ B (p65), que reconoce la serina (ser276) independientemente de su estado de fosforilación, fue suministrado por Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA) (número de catálogo: sc-372, lote: L1610). Este anticuerpo procede de la inmunización de conejos con un fosfopéptido sintético del extremo C-terminal de la proteína NF- κ B de humanos. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

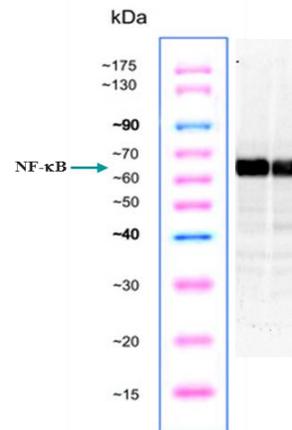


Figura 41. Membrana de *western blot* representativa de la proteína NF- κ B.

NF- κ B p65 (acetyl K310)

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) que reconoce la lisina 310 acetilada de la proteína de 65 kDa NF- κ B p65 (acetyl K310), fue suministrado por Abcam (USA) (número de catálogo: ab52175, lote: GR45081-2S). Se obtiene por purificación de suero de conejo utilizando un epítipo específico para la forma acetilada de la lisina 310 de NF- κ B. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

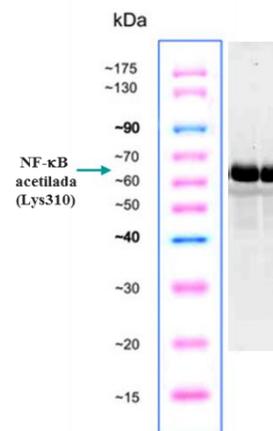


Figura 42. Membrana de *western blot* representativa de la proteína NF- κ B acetilada.

SIRT1

El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) que detecta la proteína de 110 kDa y 75 kDa SIRT1, fue suministrado por Millipore (Alemania) (número de catálogo: 07-131, lote: 2428681). 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 procede de la inmunización de conejos con un péptido sintético que contiene los aminoácidos 1-131 de SIRT1 de ratón. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

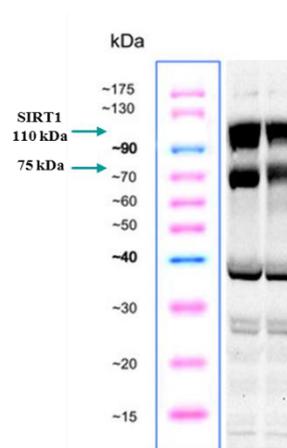


Figura 43. Membrana de *western blot* representativa de la proteína SIRT1.

α -tubulina

El anticuerpo monoclonal (isotipo IgG1 de ratón) que detecta la proteína de 55 kDa α -tubulina, fue suministrado por Pierce (USA) (número de catálogo: PA186602, lote: PJ1886651). Este anticuerpo reconoce un epítipo localizado en el extremo C-terminal de la isoforma de α -tubulina en una variedad de organismos. Este anticuerpo es derivado del hibridoma B-5-1-2 producido por fusión de células de mieloma y esplenocitos, en un ratón inmunizado. Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

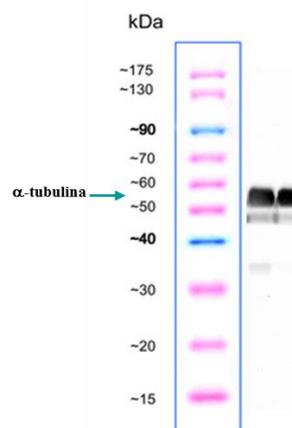


Figura 44. Membrana de *western blot* representativa de la proteína α -tubulina.

Para incubar entre 12-16 horas las membranas de nitrocelulosa, se utilizaron diluciones de 1:1000 para cada anticuerpo primario.

Para detectar todos los anticuerpos primarios anteriores (excepto α -tubulina) se utilizó el anticuerpo secundario conjugado con el enzima peroxidasa de rábano, constituido por anti-inmunoglobulinas de conejo, fue suministrado por Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, USA) (número de catálogo: PA186602, lote: PJ1886651). Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a -20 °C hasta su utilización. La dilución que se utilizó para incubar las membranas con los anticuerpos primarios fue 1:5000.

Para detectar el anticuerpo primario α -tubulina se utilizó el anticuerpo secundario conjugado con el enzima peroxidasa de rábano, constituido por anti-inmunoglobulinas de ratón, que fue suministrado por Pierce (USA) (número de catálogo: 1858413, lote: HA102346). Es apto para usarlo en la técnica inmunológica de *western blot* y se conservó a 4 °C hasta su utilización. La dilución que se utilizó para incubar las membranas fue 1:1000.

3.7.3 Otros reactivos

A continuación se presenta una lista de otros reactivos utilizados en las técnicas anteriormente citadas y las casas comerciales que los suministraron, ordenados alfabéticamente:

2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich); 3-hidroxi-tiramina (DA, dopamina; Sigma-Aldrich); 5-hidroxitriptófano (5-HTP; Sigma-Aldrich); 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina; Sigma-Aldrich); aceite de maíz (*corn oil*; Sigma-Aldrich); ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC; Sigma-Aldrich); ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA; Sigma-Aldrich); ácido homovanílico (HVA; Sigma-Aldrich); ácido octanesulfónico (OSA; Sigma-Aldrich); ácido ortofosfórico 85 % (PO_4H_3 ; Scharlau); ácido p-cumárico (Sigma-Aldrich); ácido perclórico 60 % (HClO_4 ; Scharlau Chemie, Barcelona); ácido bicinconínico (Pierce, U.S.A.); acrilamida/bis-acrilamida (Pronadisa, España); albúmina sérica bovina, fracción V (BSA; Sigma-Aldrich); azul de bromofenol (Sigma-Aldrich); cloruro potásico (CIK; Sigma-Aldrich); cloruro sódico (NaCl ; Sigma-Aldrich); dodecil sulfato sódico (SDS; Scharlau); EDTA dipotásico (K_2 -EDTA; Sigma-Aldrich); fosfato disódico (Na_2HPO_4 ; Sigma-Aldrich); fosfato monopotásico (KH_2PO_4 ; Sigma-Aldrich); fosfato monosódico (NaH_2PO_4 ; Sigma-Aldrich); glicerol (Sigma-Aldrich); glicina (Sigma-Aldrich); H_2O_2 (Sigma-Aldrich); hidróxido sódico (NaOH ; Sigma-Aldrich); L-3,4-dihidroxifenil-alanina (L-DOPA; Sigma-Aldrich); leche en polvo desnatada (Asturiana S.A., España); luminol (Sigma-Aldrich); marcador de pesos moleculares *PiNK* (*NIPPON Genetics Europe*, Alemania); membrana de nitrocelulosa 0,45 μm (Amersham Place, UK); metanol 96 % (Scharlau); metanol

multisolvent (Scharlau); metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; Merck & Co. Inc., Whitehouse station, NJ, USA); mezcla de inhibidores de fosfatasas y proteasas (referencia: 78440, Pierce, USA); (-)-noradrenalina (NA; Sigma-Aldrich); ortovanadato sódico (Sigma-Aldrich); persulfato amónico (APS; Sigma-Aldrich); reactivo BCA (Pierce, U.S.A.) compuesto por reactivo A (carbonato de sodio Na_2CO_3 , bicarbonato de sodio NaHCO_3 , tartrato de sodio $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, hidróxido de sodio NaOH) y B (sulfato cúprico); temed (Bio-Rad); tris-HCl (Sigma-Aldrich); tween-20 (Sigma-Aldrich).

4. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo sobre el estudio del envejecimiento cerebral y del efecto de los tratamientos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas como una posible estrategia para retrasar el envejecimiento cerebral. Los resultados están estructurados en tres grandes ejes correspondientes a los tres primeros objetivos específicos de la tesis, en el siguiente orden: en primer lugar, se presentan los resultados sobre el efecto del envejecimiento y de los polifenoles citados anteriormente sobre las capacidades cognitivas (que incluye la memoria de trabajo espacial, memoria episódica, y aprendizaje viso-espacial) y las capacidades motoras; en segundo lugar sobre la síntesis y metabolismo de neurotransmisores monoaminérgicos (sistema catecolaminérgico y serotoninérgico) en las principales regiones implicadas en los procesos cognitivos como son hipocampo, estriado, y también en la glándula pineal; y por último, sobre la modulación de vías de señalización y proteínas implicadas en envejecimiento e inflamación como son MAPK (ERK, MEK), Akt, mTOR, NF- κ B, SIRT1. Dependiendo de la proteína a estudiar se ha analizado una o varias regiones cerebrales como son hipocampo, estriado, corteza frontal y parietal. Dichos resultados, son precedidos por un breve análisis sobre algunos parámetros generales de los animales de experimentación.

En cada gran apartado se explican primero los resultados de los tratamientos con resveratrol y a continuación los resultados de los tratamientos con los polifenoles silimarina, quercetina, y naringenina. Este orden es debido al orden cronológico en el que se realizaron los experimentos. Además el resveratrol es el polifenol que mayor interés ha suscitado hasta el momento, el más estudiado y por tanto en el que se conocen un mayor número de propiedades beneficiosas (revisión Baur y Sinclair, 2006 b). Los polifenoles silimarina (Nencini y cols., 2007), quercetina (Boots y cols., 2007; Haleagrahara y cols., 2009; Queen y cols., 2010; Toumi y cols., 2013; Angeline y cols., 2014) y naringenina (Hirai y cols., 2007; Chao y cols., 2010; Rahigude y cols., 2012) también se ha demostrado que tienen propiedades beneficiosas sobre la salud, pero existe menos información sobre su mecanismo de acción que en el caso del resveratrol. De esta forma el estudio de los tratamientos con resveratrol nos sirve de base para estudiar el efecto de los tratamientos con los polifenoles silimarina, quercetina y naringenina, además de permitirnos establecer la posible existencia de algún mecanismo de acción común en todos los polifenoles estudiados. En todos los casos se ha incluido un grupo control de ratas jóvenes para mostrar los efectos de la edad en las diferentes pruebas.

4.1 PARÁMETROS FISIOLÓGICOS GENERALES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Durante el envejecimiento las ratas macho alcanzan un peso considerable, así como se observa un cambio en la tonalidad del pelo que se hace amarillento. Además, los animales de edad avanzada son susceptibles a desarrollar enfermedades diversas. Antes y durante los días de tratamientos realizados en este estudio se registraron de forma rutinaria el peso y la ingesta de cada uno de los animales, además se observó el aspecto general de cada uno de ellos durante las manipulaciones a las que fueron sometidos. Una pérdida excesiva de peso o de pelo, así como síntomas de dolor agudo al ser manipuladas, se ha considerado como factores de exclusión para el estudio. A lo largo de uno de los tratamientos con resveratrol además del peso corporal y la ingesta se determinó la temperatura corporal y la actividad locomotora espontánea.

Para estudiar el efecto del envejecimiento y del resveratrol sobre el envejecimiento, se realizó una administración crónica de 30 días con aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p) en ratas control jóvenes (3 meses) y viejas (20 meses), y un tratamiento crónico con resveratrol disuelto en aceite de maíz (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (20 meses) durante el mismo periodo de tiempo. Como era de esperar, el peso de los animales jóvenes control se vio incrementado durante el experimento (de $327 \pm 4,93$ g al inicio del experimento, hasta $438 \pm 6,45$ g el día 30). No se observaron cambios en el peso de los animales viejos control (518 ± 38 g el día inicial de tratamiento y 516 ± 32 g el día final del tratamiento), ni en los animales viejos tratados con resveratrol (537 ± 24 g el día inicial del tratamiento y 524 ± 30 g el día final del tratamiento) (**Figura 45A**).

En concordancia con estos datos, el tratamiento con resveratrol no alteró la ingesta de los animales tratados. La ingesta promedio de comida para el grupo viejas tratadas con resveratrol ($15,6 \pm 0,5$ g de pienso/día) fue similar a la del grupo de ratas viejas control ($14,8 \pm 1,5$ g de pienso/día). Antes de realizar la prueba del laberinto radial fueron sometidos a ayuno todos los animales. El objetivo del ayuno fue conseguir un buen nivel motivacional para que los animales pudieran completar la prueba, ya que al final de cada brazo del laberinto se encontraban pequeñas cantidades de comida que eran el refuerzo para que el animal entrara en cada brazo del laberinto. En concreto, se realizó en tres momentos del tratamiento un período de 24 h de ayuno en ratas jóvenes, y 48 h de ayuno en ratas viejas. Estos períodos de ayuno tuvieron lugar 24 y 48 h antes de iniciar la primera administración de resveratrol, los días 14 y 29 del tratamiento en las ratas jóvenes y los días 13 y 28 del tratamiento en las ratas viejas. En estos períodos de ayuno todos los animales sufrieron una disminución promedio de peso similar: $5,3 \pm 0,3$ g en animales jóvenes a los que se les administro aceite de maíz, $6,07 \pm 0,37$ g en animales viejos control a los que se les administró aceite de maíz, y $5,96 \pm 0,32$ g en animales viejos tratados con resveratrol. A partir

de esta pérdida de peso similar en todos los animales se consideró adecuado el período de ayuno de 24 h para las ratas jóvenes y de 48 h para las viejas.

La temperatura corporal se registró mediante la incorporación de termistores en el abdomen de las ratas (ver materiales y métodos apartado 3.1, para más información sobre el protocolo de inserción de los termistores). Los termistores registraron la temperatura cada 30 min, durante todo el tratamiento. No se observaron cambios significativos en la temperatura corporal a lo largo del tratamiento en las ratas jóvenes y viejas control, ni tras el tratamiento con resveratrol en animales viejos. La temperatura promedio diaria para todos los animales fue $36,9 \pm 0,04$ °C (**Figura 45B**). Sin embargo, si se observó una variación normal de la temperatura corporal a lo largo del día siguiendo ciclos periódicos. Este comportamiento periódico de la temperatura está dentro de la normalidad fisiológica para el tipo de animales con los que se trabajó (Li y cols., 1995).

Además, se registró y analizó cronobiologicamente la actividad locomotora espontánea. La **Figura 45C** muestra un actograma representativo de ratas viejas durante los días de experimento. Este tipo de gráfico es comunmente utilizado en investigación de ritmos circadianos para analizar la actividad frente al tiempo y muestra los ciclos de actividad-reposo. Los actogramas de la **Figura 45C** muestran que los dos grupos experimentales de ratas viejas, controles y tratadas crónicamente con resveratrol, se mantuvieron siguiendo el ciclo normal de luz/oscuridad y no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos. Un actograma similar fue obtenido en el caso de los animales jóvenes (datos no mostrados). Los actogramas que se observan son un típico ejemplo de animales con actividad nocturna, ajustados al ciclo luz-oscuridad, con mayor actividad durante la fase oscura que en la fase de luz.

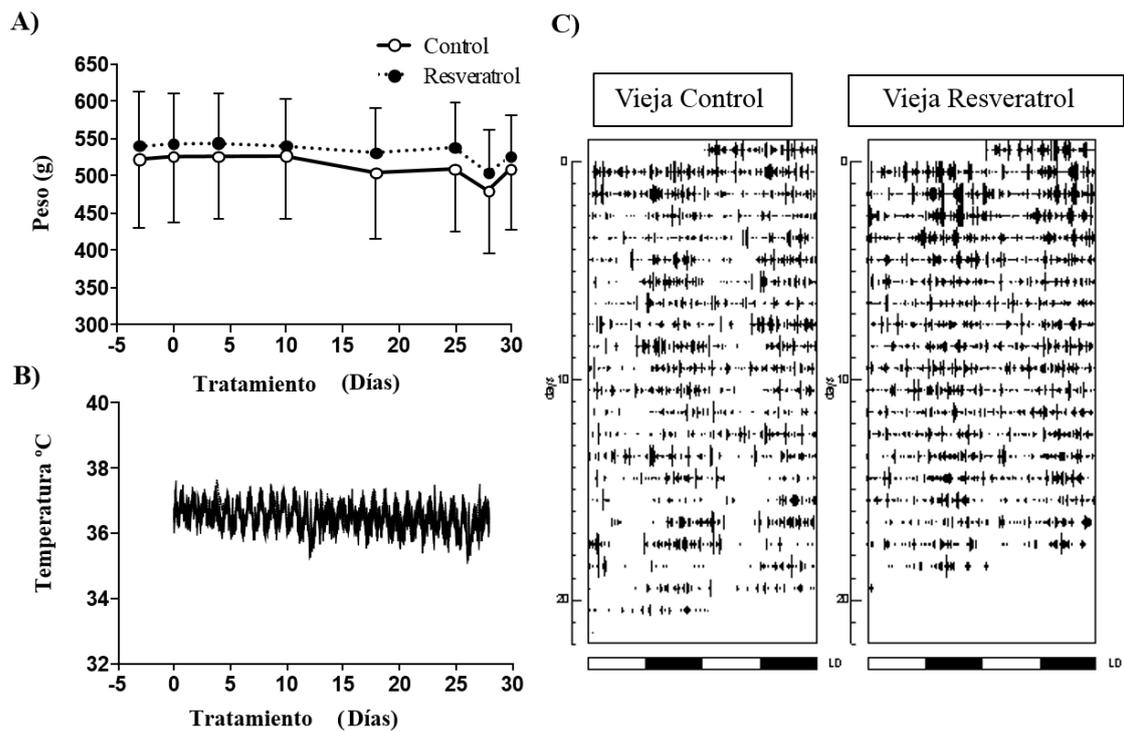


Figura 45. **A)** Peso corporal (promedio \pm SEM; registrado entre las 8:00 y 9:00 h) de los animales viejos ($n=6$) tratados con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p, $n=6$) durante 30 días (línea punteada) y su grupo control al que se le administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p) (línea continua). La reducción del peso corporal observada se debe antes de iniciar los tratamientos, a los 13 y a los 28 días a los períodos de ayuno para adquirir un buen nivel motivacional para realizar la prueba de laberinto radial. **B)** Evolución del promedio de la temperatura corporal en ratas viejas tratadas con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) durante 30 días (línea punteada) y su control al que se le administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p) (línea continua). **C)** Actogramas representativos y sincronización de los animales con el ciclo de luz/oscuridad durante el tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) durante 30 días y su control al que se le administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). Los datos son representados con un actograma de doble plot. Los animales estuvieron en un fotoperíodo de 12/12 horas de luz/oscuridad.

Los tratamientos crónicos de 30 días con silimarina, quercetina y naringenina (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (18 meses) se realizaron simultáneamente, por lo que se utilizó un mismo grupo de animales jóvenes y viejos como control a los que se les administró vehículo (aceite de maíz 1 ml/kg/día, i.p durante 30 días).

Para los animales jóvenes se repiten los mismos cambios citados anteriormente, su peso se vio incrementado durante el experimento (de $317 \pm 6,93$ g al inicio del experimento, hasta $454 \pm 5,58$ g el día 30). No se observaron cambios significativos en el peso de los animales viejos control y tratados a lo largo del tratamiento (Figura 46). Como se observó anteriormente durante el tratamiento con resveratrol (Figura 45), todos los animales sufrieron una disminución de peso debido al ayuno previo a la prueba del laberinto radial. Estos períodos de ayuno tuvieron lugar 48 h antes de iniciar la primera administración del fármaco, el día 13 del tratamiento, y el día 28 del tratamiento en animales viejos. En estos períodos de ayuno todos los animales sufrieron una disminución promedio de peso similar (Figura 46).

En cuanto a la ingesta, en concordancia con los datos de peso corporal la administración de polifenoles no alteró la cantidad de comida ingerida por los animales. La ingesta promedio de comida para el grupo de ratas viejas tratadas con silimarina ($15,2 \pm 1,5$ g de pienso/día), naringenina ($15,0 \pm 1,2$ g de pienso/día) y quercetina ($15,8 \pm 2,1$ g de pienso/día) fue similar a la de las ratas viejas control ($15,5 \pm 1,9$ g de pienso/día).

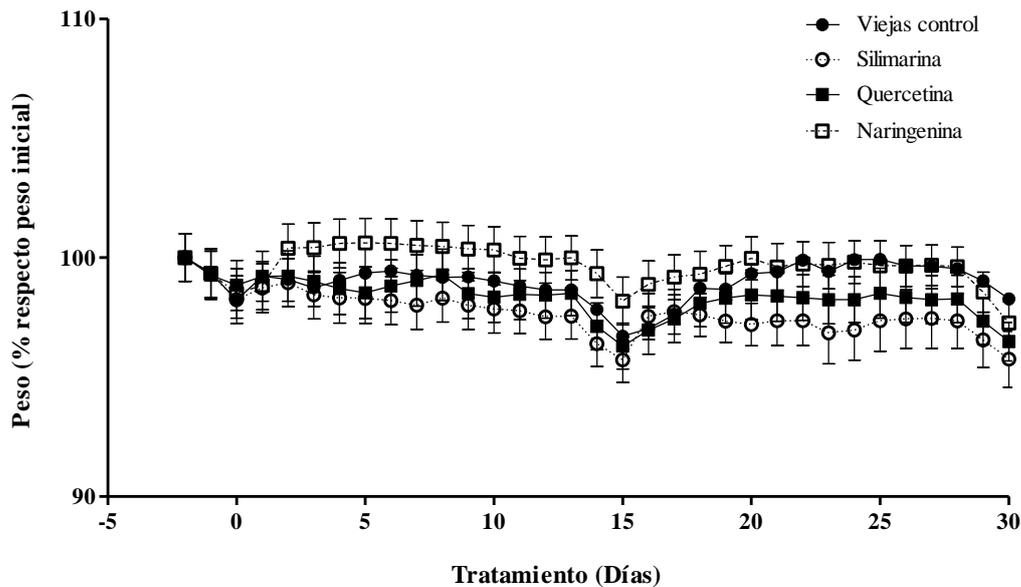


Figura 46. Variación del peso corporal respecto el peso inicial durante los tratamientos crónicos de 30 días con silimarina (n=5), quercetina (n=7) y naringenina (n=6) (20 mg/kg/día, i.p), y el correspondiente grupo control al que se le administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). La gráfica representa el peso corporal (% del promedio \pm SEM respecto el día inicial; medido diariamente entre las 8:00 y 9:00 a.m, justo antes de la administración de los tratamientos) de los animales sujetos a estos tratamientos. Reducción del peso corporal observado antes de iniciar los tratamientos, a los 13 y a los 28 días debido a los períodos de ayuno para adquirir un buen nivel motivacional para realizar la prueba de laberinto radial. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls. No se detectaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

4.2 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON LOS POLIFENOLES RESVERATROL, SILIMARINA, QUERCETINA Y NARINGENINA SOBRE LA CONDUCTA EN RATAS VIEJAS

Para estudiar el efecto del envejecimiento y de los tratamientos con compuestos antioxidantes (resveratrol, silimarina, quercetina, y naringenina) a nivel cognitivo se realizaron una serie de pruebas comportamentales donde se utilizaron ratas jóvenes y viejas que recibieron vehículo y ratas tratadas con dichos polifenoles durante el mismo tiempo. En todos los tratamientos se realizó la prueba del laberinto radial (para estudiar la memoria de trabajo espacial) y la prueba de reconocimiento de objetos (para estudiar la memoria episódica), al inicio (el día anterior a la primera administración de fármacos), y final de tratamiento, y en algunos casos a los 15 días de tratamiento. Además, en los tratamientos con los polifenoles silimarina, quercetina y naringenina se añadió una prueba más, que es la prueba del laberinto de Barnes (para estudiar memoria espacial y aprendizaje), que se realizó a los 15 y 28 días de tratamiento. Por otro lado, en este apartado se presentarán los resultados de las pruebas sobre coordinación motora en todos los tratamientos al inicio, a los 15 y 30 días de tratamiento, ya que la coordinación motora también se ve muy afectada por el envejecimiento cerebral.

4.2.1 Efecto agudo en ratas viejas de los tratamientos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina sobre la memoria de trabajo (laberinto radial)

En primer lugar, se realizó un tratamiento agudo con los distintos polifenoles objeto de estudio. Después de 60 minutos de la administración de aceite de maíz (1 ml/kg i.p) a las ratas control y de cada uno de los polifenoles, resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina (20 mg/kg i.p) en ratas viejas (18 meses) de la misma edad, se realizó la prueba del laberinto radial. Se comprobó que no existen efectos agudos en la memoria de trabajo tras la aplicación de estos antioxidantes, ya que no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, ni tampoco respecto al grupo control ni en el tiempo para completar la prueba, ni en el número de errores cometidos durante la misma (tiempo: $F(4, 28)=0,94$, $p=0,45$; errores: $F(4, 28)=0,35$, $p=0,84$) (**Figura 47**). Por ello, no se realizaron otras pruebas comportamentales y se centró el estudio en el efecto de los tratamientos crónicos.

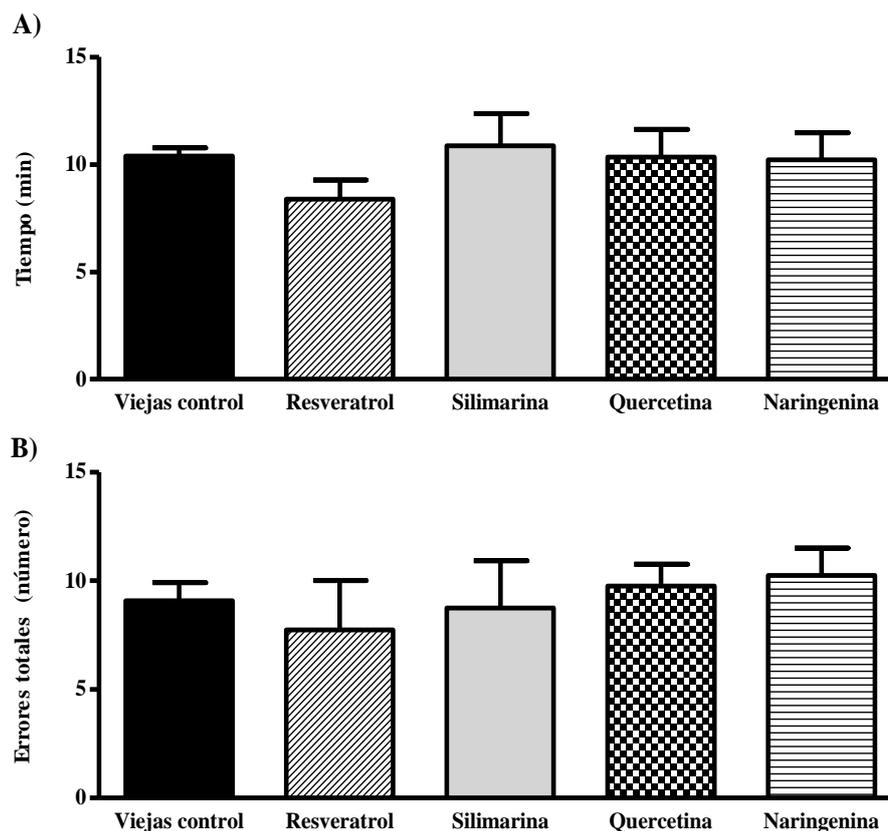


Figura 47. Efecto agudo sobre la memoria de trabajo en la prueba de laberinto radial en ratas viejas (18 meses) después de 60 minutos de la administración de resveratrol (n=5), silimarina (n=5), quercetina (n=7), y naringenina (n=6) (20 mg/kg i.p), comparando con el grupo control viejas tratadas con aceite de maíz (1 ml/kg, i.p, n=6). Las barras representan el promedio \pm SEM que se obtiene de (A) tiempo necesario para completar la prueba, y (B) la suma de errores (suma de brazos no visitados y repetidos) durante la prueba. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls. No se detectaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

4.2.2 Efecto del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas adultas y viejas sobre la memoria de trabajo (laberinto radial)

La prueba del laberinto radial se utiliza para evaluar la memoria de trabajo espacial en ratas. En este caso se utilizó para comprobar el deterioro que sufren los animales al envejecer, y estudiar el efecto del resveratrol en ratas adultas y viejas.

Se estudió en primer lugar el efecto del tratamiento crónico durante 15 días con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) en ratas adultas de 9 meses. El objetivo fue estudiar el efecto de la edad, y del tratamiento con resveratrol en una etapa intermedia de la vida de los animales, donde ya han llegado a la madurez de las capacidades cognitivas, pero aún están lejos del comienzo del declive cognitivo. Y de esta forma poder comparar resultados sobre la memoria de trabajo en tres momentos diferentes de la vida de los animales (a los 3 meses cuando son jóvenes, a los 9 meses cuando son adultos, y a los 20 cuando son viejos). Se realizó la prueba del laberinto radial un día

antes de iniciar la primera administración del tratamiento. A continuación se distribuyeron al azar los animales en dos grupos a los que se les administraron durante 15 días: aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p) en ratas adultas control y resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) en ratas de la misma edad. Al final del tratamiento con resveratrol, los animales disminuyeron significativamente (24,7 %) el tiempo necesario para completar la prueba así como el número de errores (42 %), respecto a su mismo grupo al inicio de tratamiento (tiempo: $p=0,015$; errores $p=0,0014$) (**Figura 48**). Como era de esperar las ratas jóvenes y adultas control a las que se les administró aceite de maíz no mostraron cambios a lo largo del tratamiento. Al final del tratamiento con resveratrol hubo una disminución significativa de tiempo (29 % y 25 %) y errores (41,5 % y 49,2 %), respecto al grupo control de jóvenes y de adultas, respectivamente (tiempo: $F(2, 19)=5,51$, $p=0,01$; errores $F(2, 19)=12,42$, $p=0,0007$). Estos resultados podrían sugerir que el resveratrol puede mejorar el rendimiento cognitivo desde períodos anteriores al inicio del declive cognitivo, siendo incluso efectivo un tratamiento de 15 días.

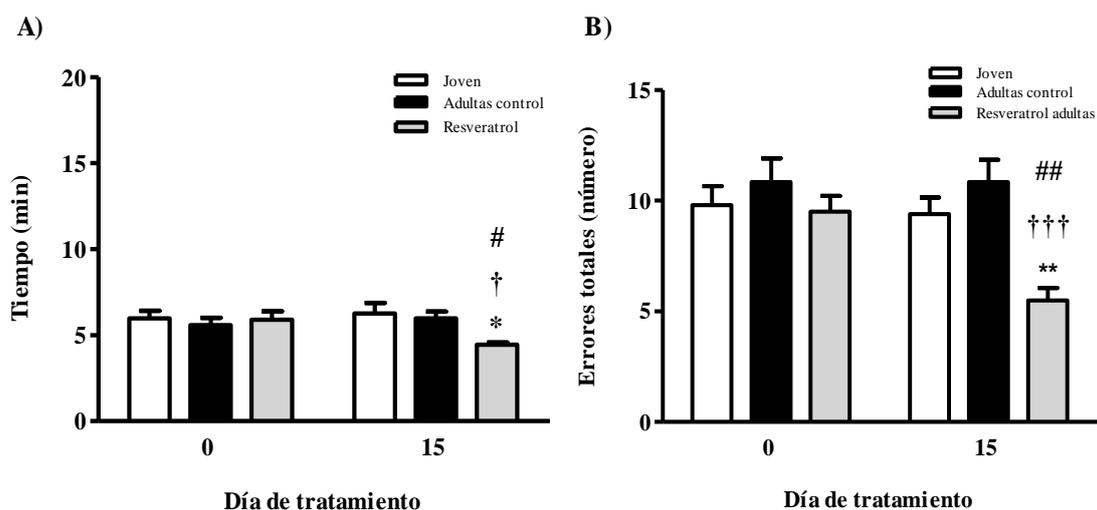


Figura 48. Efecto sobre la memoria de trabajo en el laberinto radial del tratamiento crónico (15 días) con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) en ratas adultas (9 meses, $n=6$), y aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p) en ratas de la misma edad ($n=5$) y jóvenes (3 meses, $n=8$). Las barras representan (promedio \pm SEM) de (A) tiempo para completar la prueba y (B) número total de errores (suma de brazos no visitados y visitados más de una vez). La prueba se llevo a cabo un día antes de iniciar los tratamientos crónicos y después de finalizarlos. Después de la prueba inicial, las ratas adultas se distribuyeron en dos grupos diferentes para iniciar el tratamiento crónico. Para el análisis estadístico se utilizo one-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, cuando comparamos con el grupo control jóvenes el día 15; † $p \leq 0,05$, †† $p \leq 0,001$ comparando con el grupo control adultas el día 15. También t-test: # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ cuando comparamos cada grupo experimental al inicio y después de un tratamiento crónico.

Los análisis iniciales en ratas jóvenes (3 meses) y viejas (20 meses), justo antes de comenzar la administración de los tratamientos crónicos, pusieron de manifiesto un deterioro cognitivo en la memoria de trabajo asociado a la edad. En este sentido, las ratas viejas necesitaron más del doble de tiempo para completar las pruebas que las ratas jóvenes y cometieron más errores (**Figura 49**).

Después de esta prueba inicial, las ratas viejas se distribuyeron al azar en dos grupos experimentales y se inició el tratamiento crónico (30 días) con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) y sus controles que recibieron aceite de maíz (vehículo) (1 ml/kg/día, i.p), al igual que las ratas jóvenes. En el día 15 de tratamiento no se encontraron diferencias significativas entre ratas tratadas con resveratrol y viejas control (no se muestran los resultados). En cambio a los 30 días el tratamiento crónico con resveratrol mejoró la memoria de trabajo. Estos animales al final del tratamiento mostraron una reducción de un 43 % del tiempo para completar la prueba, respecto a las ratas control de la misma edad el mismo día; y además, cometieron un 39 % menos de errores totales respecto a las ratas control de la misma edad también el mismo día (**Figura 49**). Estos resultados sugieren que el tratamiento crónico con resveratrol podría estar relacionado con un efecto de preservación de la capacidad cognitiva, en este caso de la memoria de trabajo, reduciendo el declive cognitivo que normalmente se produce como consecuencia del envejecimiento. No se detectaron mejoras en ninguno de los parámetros del laberinto radial, ni en las ratas viejas ni jóvenes a las que se les administró vehículo; aunque los animales jóvenes cometieron en la prueba final menos errores que en la prueba inicial. Las ratas viejas control tardaron en realizar la prueba tiempos similares al inicio y final, y a los 30 días cometieron casi el doble de errores que las jóvenes (**Figura 49**).

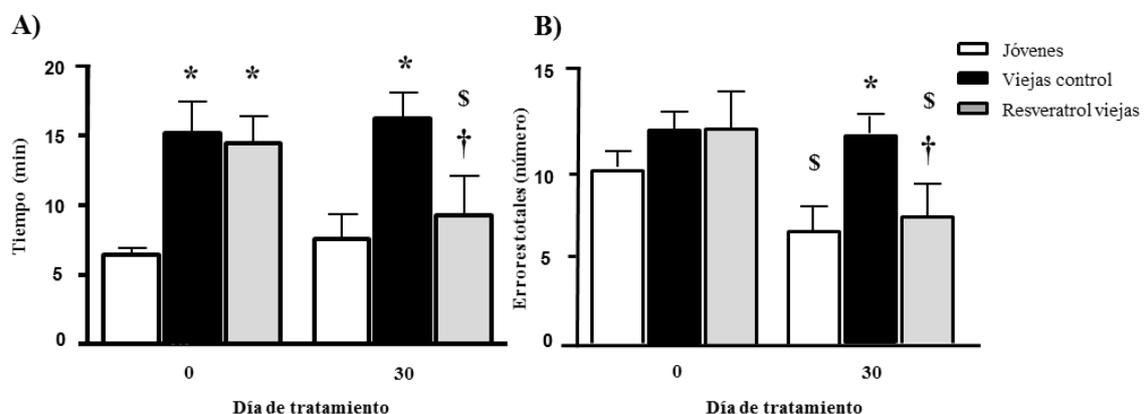


Figura 49. Efecto sobre la memoria de trabajo en el laberinto radial del tratamiento crónico (30 días) con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p, n=6) en ratas viejas (20 meses), y aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p) en ratas jóvenes (3 meses, n=8) y viejas (20 meses, n=6) control. Las barras representan (promedio \pm SEM) de (A) tiempo para completar la prueba y (B) número total de errores (suma de brazos no visitados y visitados más de una vez). La prueba se llevó a cabo antes de iniciar los tratamientos crónicos y después de finalizarlos. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido del test de Fisher: * $p \leq 0,05$, cuando comparamos con el grupo control jóvenes; † $p \leq 0,05$, comparando con el grupo control viejas. También t-test § $p \leq 0,05$, cuando comparamos la prueba final respecto la inicial en cada grupo experimental.

4.2.3 Efecto del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas adultas y viejas sobre la memoria episódica (reconocimiento de objetos)

La prueba de reconocimiento de objetos se utiliza para estudiar la memoria episódica en ratas. Constatando la existencia de cambios en la memoria de trabajo, decidimos comprobar si también hay cambios en la memoria episódica durante el envejecimiento y después de los tratamientos con resveratrol en ratas adultas y viejas. Se presentan los resultados en el mismo orden que en el apartado anterior.

Esta prueba consta de dos grandes fases: fase de familiarización y fase de prueba. En la fase de familiarización, no se observaron diferencias significativas entre el tiempo que utilizaron para explorar los dos objetos idénticos, lo que indica que no hubo ningún tipo de preferencia por el objeto ya que ambos son nuevos para el animal, ni tampoco por su localización (no se muestran estos datos). En la fase de prueba los animales exploraron más el objeto nuevo que el familiar, de acuerdo con el comportamiento innato de exploración de novedad de roedores (Antunes y Biala 2012). Esto mismo lo hemos corroborado en todos los tratamientos (**Figura 50**).

En la **Figura 50**, se muestran los resultados de la prueba de reconocimientos de objetos del tratamiento con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) durante 15 días en ratas adultas (9 meses) comparado con ratas control de la misma edad y jóvenes (3 meses) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). El objetivo fue comprobar si había efectos positivos por parte de este antioxidante durante la etapa adulta de los animales en la memoria episódica. No se observaron efectos significativos de la edad en esta prueba al comparar ratas control de 3 y 9 meses. El grupo tratado con resveratrol mejoró al final del tratamiento respecto a su mismo grupo al inicio, ya que a los 15 días incrementaron un 65,7 % el tiempo de exploración del objeto nuevo respecto a la prueba que se realizó justo antes de iniciar el tratamiento ($p=0,006$). También al final del tratamiento las ratas tratadas con resveratrol incrementaron un 57,5 % el tiempo de exploración del objeto nuevo, respecto al grupo adultas control ($F(2, 11)=4,62, p=0,02$). No se observaron variaciones en las ratas control adultas en la prueba final respecto la inicial ($F(2, 10)=3, p=1$).

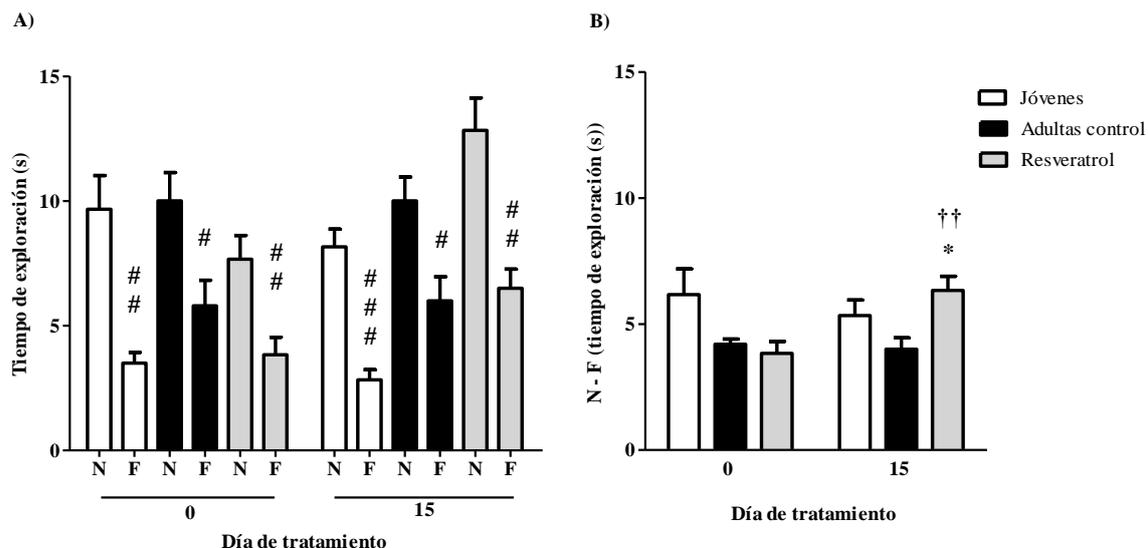


Figura 50. Efecto sobre la memoria episódica en la fase de prueba del reconocimiento de objetos del tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día i.p) en ratas adultas (9 meses, n=6), comparado con ratas de la misma edad (n=5) y jóvenes (3 meses, n=8) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). Las pruebas se realizaron un día antes de iniciar los tratamientos, y a los 15 días. Las barras representan el promedio \pm SEM derivado del tiempo de exploración de los objetos (N= objeto nuevo, F = objeto familiar). **A)** Tiempo explorando el objeto nuevo y el familiar. **B)** Diferencia en el tiempo de exploración del objeto nuevo menos el familiar. Se detectaron diferencias significativas por medio de one-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls: * $p \leq 0,05$ comparando el tratamiento con resveratrol respecto las ratas adultas control. T-test detectó diferencias significativas comparando dentro del grupo resveratrol el día 15 respecto día 0: †† $p \leq 0,01$; entre el tiempo explorando el objeto familiar respecto al nuevo: # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$.

A continuación se presentan los resultados del tratamiento crónico de 30 días en ratas viejas (20 meses) con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p), en comparación con jóvenes (3 meses) y viejas control (20 meses) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). Existen diferencias debidas a la edad entre jóvenes y viejas desde el día inicial ($F(2, 20)=4,49$, $p=0,034$), así las ratas jóvenes presentan una diferencia mayor que las viejas entre el tiempo que exploran el objeto nuevo y el familiar durante la fase de prueba (**Figura 51A y B**). Además, no se observaron diferencias en el tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al familiar a lo largo del periodo de tratamiento en los animales control jóvenes ni en los viejos (jóvenes: $F(2, 24)=0,13$, $p=0,87$; viejos: $F(2, 18)=0,91$, $p=0,42$). Sin embargo, a los 30 días del tratamiento con resveratrol mejoró la memoria episódica de las ratas viejas, ya que en estos animales se observa un aumento en el tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al familiar en comparación con ratas control de la misma edad ($F(2, 20)=6,49$, $p=0,01$) (**Figura 51A y B**).

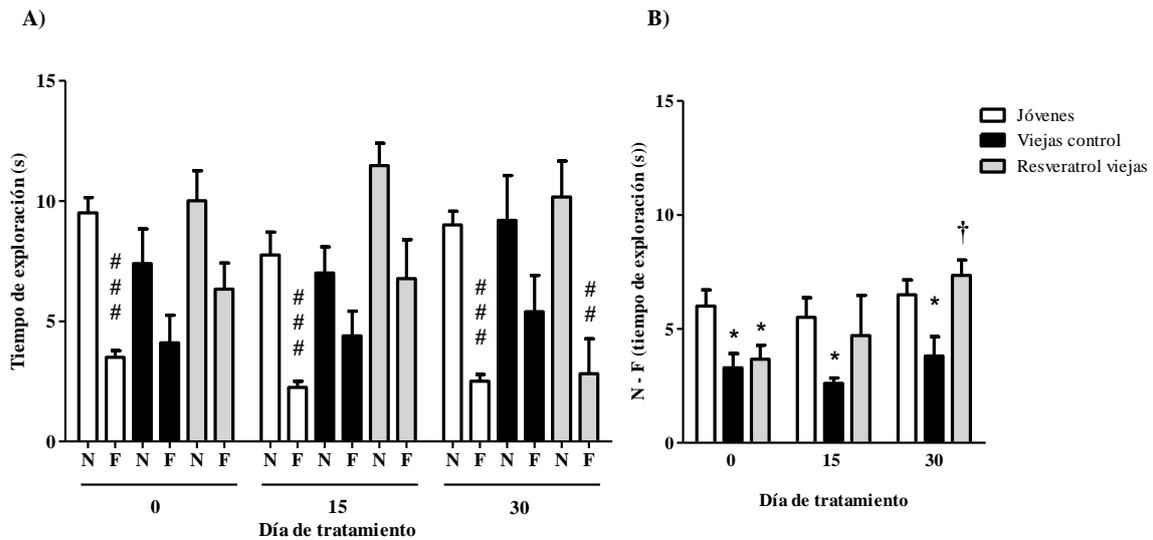


Figura 51. Efecto sobre la memoria episódica en la fase de prueba del reconocimiento de objetos del tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día i.p, n=6) en ratas viejas (20 meses) comparado con ratas de la misma edad (n=6) y jóvenes (3 meses, n=8) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). Las pruebas se realizaron un día antes de iniciar los tratamientos, a los 15 días y a los 30 días. Las barras representan el promedio \pm SEM derivado del tiempo de exploración de los objetos (N= objeto nuevo, F = objeto familiar). **A)** Tiempo explorando el objeto nuevo y el familiar. **B)** Diferencia en el tiempo de exploración del objeto nuevo menos el familiar. One-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls detectó diferencias significativas: * $p \leq 0,05$ respecto las ratas jóvenes; † $p \leq 0,05$ respecto a las ratas viejas control. T-test detectó diferencias significativas en el tiempo explorando el objeto nuevo respecto el familiar: ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$.

4.2.4 Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas sobre la memoria de trabajo (laberinto radial)

De la misma manera que en los casos anteriores, se observó un efecto de la edad en la prueba del laberinto radial, con tiempos de ejecución y errores superiores en el caso de las ratas control viejas respecto a las jóvenes. Los tratamientos con silimarina, quercetina y naringenina mejoraron la memoria de trabajo en ratas viejas de modo similar al observado en el tratamiento con resveratrol en animales viejos. A los 15 días de tratamiento con silimarina, quercetina y naringenina (20 mg/kg/día, i.p) se observó una mejoría en la memoria de trabajo de los animales viejos (18 meses) respecto a las ratas control de la misma edad a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). Los tratamientos con silimarina, quercetina y naringenina redujeron el tiempo necesario para que los animales completaran la prueba (35,3 %, 42,1 %, 43,3 %, respectivamente) respecto al grupo viejas control ($F(4, 31)=6,27$, $p=0,0017$) (**Figura 52A y B**). Estos mismos animales cometieron un 39,5 %, 42,9 %, 26,7 % menos de errores en comparación con el grupo viejas control ($F(4, 31)=7,83$, $p=0,0004$) (**Figura 52A y B**). A los 30 días de tratamiento los animales viejos tratados con estos polifenoles mantuvieron la mejoría de la memoria de trabajo respecto a las ratas viejas control, lo que es evidente por la reducción de tiempo necesario para completar la prueba de 30,1 %, 53,4 %, 60,4 %, respectivamente ($F(4, 31)=8,85$, $p=0,0002$); y la

reducción del número de errores cometidos de un 33,95 %, 56,2 %, 53,8 %, respectivamente ($F(4, 31)=6,018$, $p=0,0022$) (**Figura 52A y B**). A lo largo del tratamiento no se observaron diferencias significativas en el tiempo para completar la prueba y en el número de errores dentro del grupo de ratas jóvenes (tiempo: $F(2, 24)=0,61$, $p=0,55$, número de errores: $F(2, 24)=2,71$, $p=0,12$), ni en las ratas control viejas (tiempo: $F(2, 15)=0,56$, $p=0,58$, número de errores: $F(2, 15)=0,54$, $p=0,60$). En contraste, al comparar los valores con los obtenidos antes de iniciar el tratamiento, en el caso de la silimarina se observó una mejoría significativa dentro del mismo grupo tanto en el tiempo ($F(2, 15)=4,93$, $p=0,04$) como en el número de errores ($F(2, 15)=12,30$, $p=0,0036$). Lo mismo pudo observarse a lo largo del tratamiento con quercetina, que mejora significativamente su comportamiento respecto al tiempo ($F(2, 20)=9,4$, $p=0,0035$) y el número de errores ($F(2, 20)=19,9$, $p=0,0002$). Y también en el grupo de naringenina, donde se reduce significativamente el tiempo ($F(2, 17)=35,8$, $p<0,0001$) necesario para completar la prueba, y el número de errores ($F(2, 17)=10,29$, $p=0,0037$) (**Figura 52A y B**).

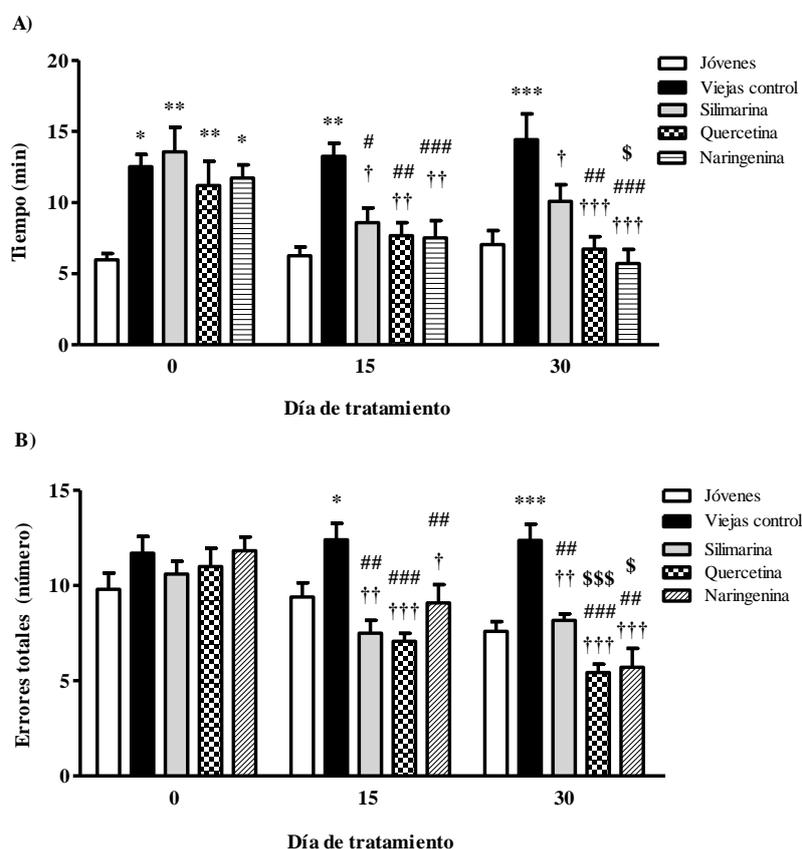


Figura 52. Efecto sobre la memoria de trabajo en la prueba del laberinto radial de los tratamientos crónicos con silimarina ($n=5$), quercetina ($n=7$) y naringenina ($n=6$) (20 mg/kg/día i.p) en ratas viejas (18 meses), y aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p) en ratas de la misma edad ($n=6$) y jóvenes (3 meses, $n=8$). Las pruebas se realizaron un día antes de iniciar los tratamientos, a los 15 y 30 días de tratamiento. Las barras representan el promedio \pm SEM que se obtiene de (A) tiempo necesario para completar la prueba, y (B) la suma de errores durante la prueba (suma de brazos no visitados y repetidos). One-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls detectó diferencias significativas: $*p\leq 0,05$, $**p\leq 0,01$, $***p\leq 0,001$ comparado con ratas jóvenes control a los 15 y 30 días; $\dagger p\leq 0,05$, $\ddagger p\leq 0,01$, $\ddagger\ddagger p\leq 0,001$ comparado con ratas viejas control a los 15 y 30 días. One-way ANOVA de medidas repetidas seguido del test de Newman-Keuls detectó diferencias significativas dentro de cada grupo: $\#p\leq 0,05$, $\#\#\#p\leq 0,001$ al comparar los resultados a los 30 y 15 días respecto al inicio, y $\$p\leq 0,05$, $\$\$\$\$p\leq 0,001$ al comparar el día 30 respecto al día 15.

4.2.5 Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas sobre la memoria episódica (reconocimiento de objetos)

Se estudió el efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (18 meses), sobre la memoria episódica mediante la realización de la prueba de reconocimiento de objetos antes de iniciar el tratamiento, a los 15 días y al final del tratamiento, comparando con ratas control de la misma edad y jóvenes a las que se les administró simultáneamente aceite de maíz (1ml/kg/día, i.p) (**Figura 53A y B**). En la fase de familiarización, no se observaron diferencias significativas entre el tiempo utilizado para explorar cada uno de los dos objetos idénticos, lo que indica que no hubieron preferencias por ningún objeto en particular (no se muestran estos datos). Sin embargo, en la fase de prueba los animales exploraron más el objeto nuevo que el familiar, de acuerdo con el comportamiento innato de exploración de novedad de los roedores (Antunes y Biala 2012) (**Figura 53A y B**). Como hemos demostrado anteriormente, existe un efecto de la edad, así desde el inicio hasta el final de los tratamientos las ratas jóvenes exploran más tiempo el objeto nuevo respecto al familiar que las ratas viejas ($F(4, 31)=2,72, p<0,05$). Además analizando la diferencia de tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al familiar tanto las jóvenes como las viejas control no mejoran respecto a si mismas durante los 30 días (jóvenes: $F(2, 24)=0,13, p=0,87$; viejas: $F(2, 18)=2,33, p=0,15$). En cuanto a los diversos tratamientos con polifenoles, a los 15 días de tratamiento, la diferencia de tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al familiar muestra diferencias estadísticas respecto al grupo viejas control solo en el grupo de silimarina ($F(4, 31)= 3,46, p=0,02$). No obstante, a los 30 días de tratamiento con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas se observó una mejoría significativa en la memoria episódica, lo que es evidente por el incremento en exploración del objeto nuevo respecto al familiar en todos los casos ($F(4, 31)= 6,24, p=0,0016$). Comparando los valores de cada uno de los tratamientos durante 30 días, respecto al inicio del tratamiento, tanto los grupos tratados con silimarina, quercetina como naringenina aumentan el tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al familiar, lo que significa que mejoran la memoria episódica (silimarina: $F(2, 15)=2,19, p=0,019$, quercetina: $F(2, 21)=8,55, p=0,005$, naringenina: $F(2, 18)=6,27, p=0,017$).

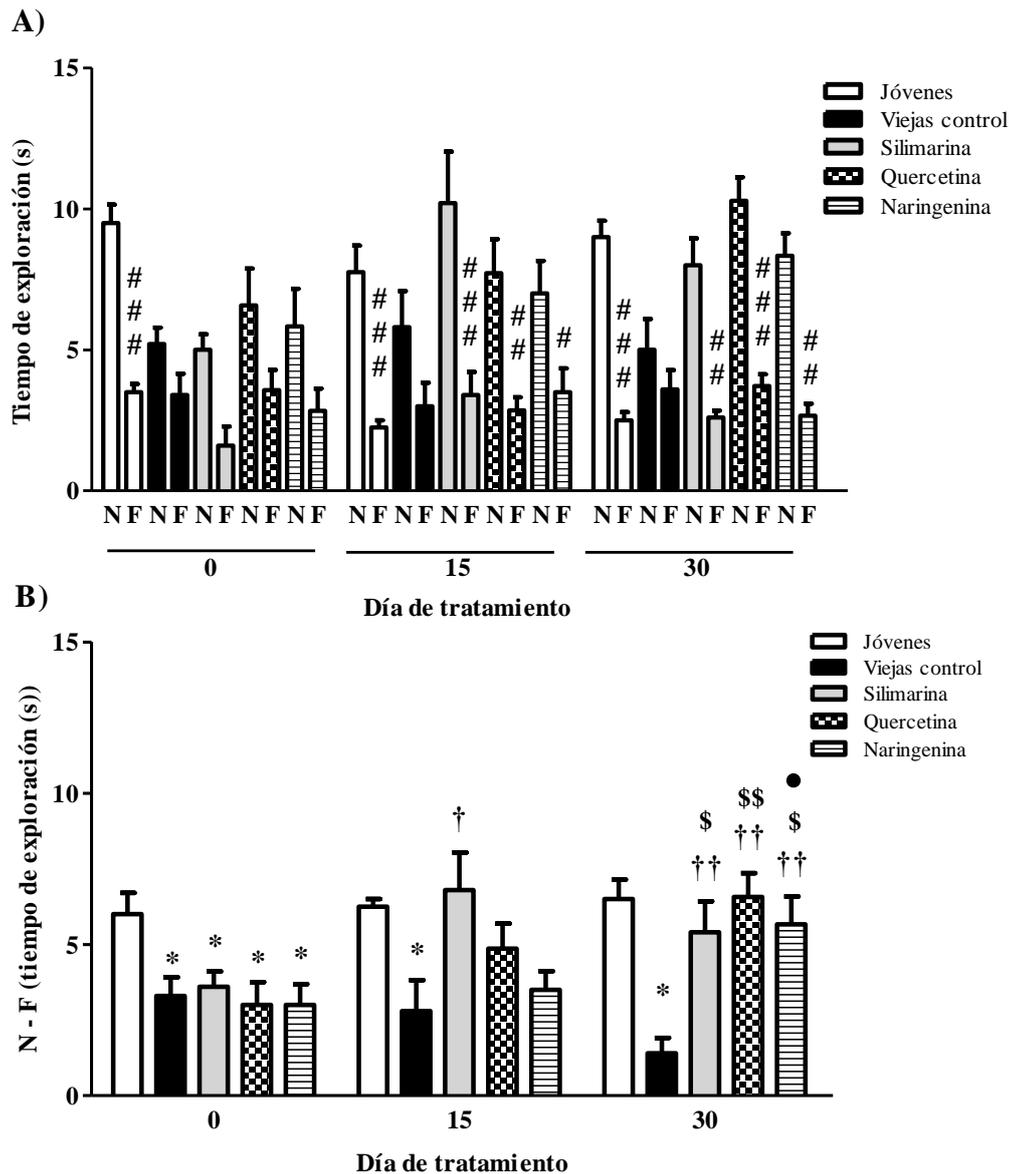


Figura 53. Efecto sobre la memoria episódica en la fase de prueba del reconocimiento de objetos de los tratamientos crónicos con silimarina ($n=5$), quercetina ($n=7$) y naringenina ($n=6$) (20 mg/kg/día i.p), y sus controles jóvenes (3 meses, $n=8$) y viejas (18 meses, $n=6$) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). Las pruebas se realizaron un día antes de iniciar los tratamientos, a los 15 y 30 días. Las barras representan el promedio \pm SEM derivado del tiempo de exploración de los objetos (N= objeto nuevo, F= objeto familiar). **A)** Tiempo explorando el objeto nuevo y el familiar. **B)** Diferencia en el tiempo de exploración del objeto nuevo menos el familiar. One-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls determinó diferencias significativas: $*p \leq 0,05$, comparado con ratas jóvenes; $^\dagger p \leq 0,05$, $^\ddagger p \leq 0,01$, comparado con ratas viejas control. One-way ANOVA de medidas repetidas seguido del test de Newman-Keuls detectó diferencias significativas: $^\$ p \leq 0,05$, $^\$\$ p \leq 0,01$, comparando cada uno de los tratamientos respecto a si mismo a los 30 días respecto día 0, y $p \leq 0,05$ comparando a los 30 días respecto 15 días. T-test detectó diferencias significativas en el tiempo explorando el objeto nuevo respecto el familiar: $^\# p \leq 0,05$, $^\#\# p \leq 0,01$, $^\#\#\# p \leq 0,001$.

4.2.6 Efecto del envejecimiento y de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas sobre la memoria espacial y aprendizaje (laberinto de Barnes)

Para evaluar la memoria y el aprendizaje viso-espacial en los animales tratados con los polifenoles silimarina, quercetina y naringenina se realizó la prueba del laberinto de Barnes. No se realizó esta prueba con los animales tratados con resveratrol, ya que en el momento en que se realizaron estos tratamientos no se disponía del equipamiento necesario.

La prueba del laberinto de Barnes consta de dos fases: una primera fase de entrenamiento, seguido de una fase de prueba final. Se analizan tres parámetros: el tiempo, el número de errores totales hasta finalizar la prueba, y el tipo de estrategia seguido para encontrar la caja de escape o *target*. La fase de entrenamiento es un período de aprendizaje que prepara a los animales para poder realizar la prueba, a partir de la experiencia obtenida con el entrenamiento. Por este motivo se registró el tiempo necesario para finalizar la prueba y el número de errores totales solo en la fase de prueba. En cambio las estrategias de aprendizaje se han registrado en ambas fases (entrenamiento y prueba).

En la **Figura 54** se muestran los resultados de la prueba del laberinto de Barnes en ratas control jóvenes (3 meses) y viejas (18 meses) tratadas con aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p) y en ratas viejas tratadas con silimarina, quercetina y naringenina (20 mg/kg/día, i.p) durante 15 y 28 días de tratamiento. Se analizó la latencia y el número de errores. A los 15 días de tratamiento se observaron diferencias en la latencia y número de errores debidas a la edad entre los animales jóvenes y viejos, así como se observó que los tratamientos con quercetina y naringenina en ratas viejas reducen un 58,3 % y 70,74 % la latencia respecto a ratas control de la misma edad ($F(4, 31)=2,99$, $p=0,035$) (**Figura 54A y B**). A los 15 días de los tratamientos con polifenoles no se observaron cambios en cuanto al número de errores ($F(4, 31)=1,16$, $p=0,34$). A los 28 días, se mantienen las diferencias entre jóvenes y viejas, y todos los tratamientos con polifenoles mejoran la memoria espacial y aprendizaje para encontrar la caja de escape, ya que reducen el tiempo que tardan en encontrarla en comparación con el grupo viejas control (77 % de reducción del tiempo en silimarina, 44 % en quercetina, 54,3 % en naringenina) ($F(4, 31)=6,72$, $p=0,0008$), acompañado de una reducción del número de errores en comparación con el grupo control de ratas viejas (92,3 % en silimarina, 74,4 % en quercetina, y 80,8 % en naringenina) ($F(4, 31)=4,31$, $p=0,0083$).

Respecto a las estrategias de aprendizaje se analizaron la fase de entrenamiento y de prueba. A los 15 días de tratamiento la estrategia dominante en el grupo control viejas fue la aleatoria (**Figura 54C**). Sin embargo, en este mismo período del tratamiento, tanto las ratas jóvenes como las ratas viejas tratadas con silimarina, quercetina y naringenina, mostraron una preferencia por las estrategias seriada y directa. En el mismo sentido, a los 28 días de tratamiento la estrategia dominante seguida por el grupo viejas control siguió siendo la aleatoria, pero las ratas tratadas con polifenoles y las ratas jóvenes incrementaron la preferencia por utilizar estrategias de tipo seriado y directo, en comparación al mismo grupo a los 15 días de tratamiento. Estos resultados demuestran que en el transcurso de los tratamientos con polifenoles, los animales viejos mejoraron la memoria y aprendieron a utilizar estrategias espaciales más eficientes (**Figura 54C**).

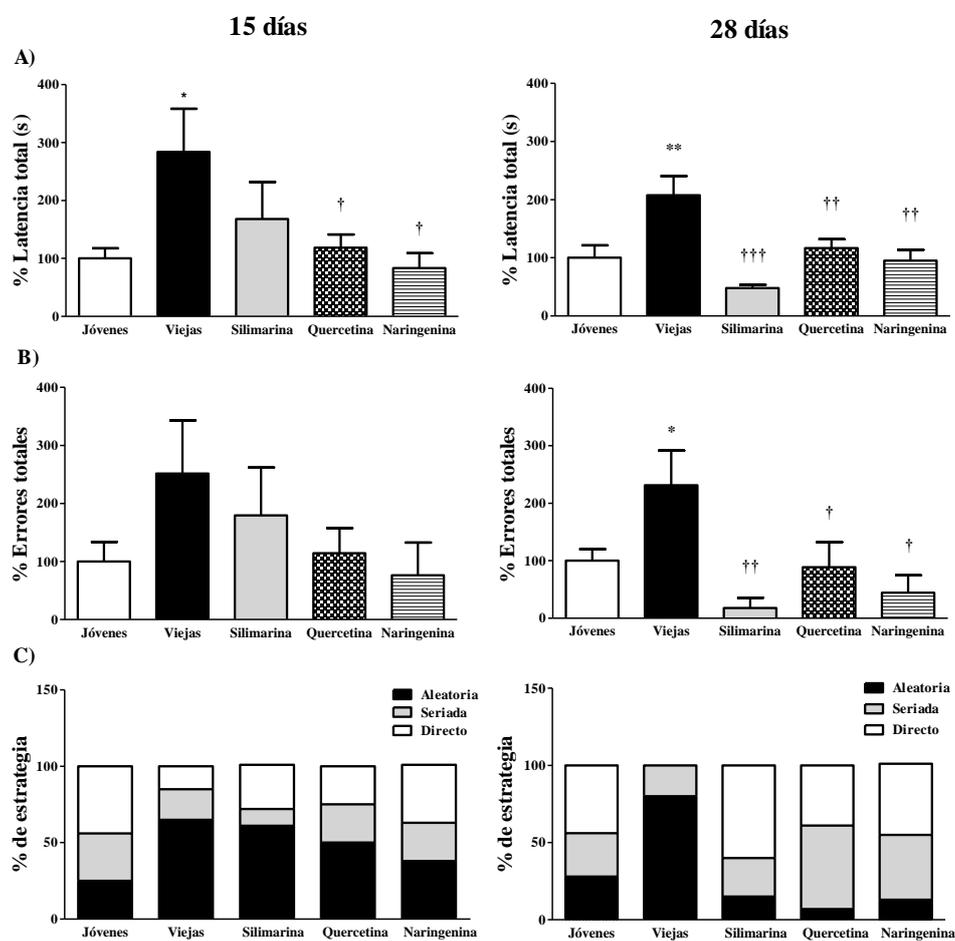


Figura 54. Efectos sobre la memoria espacial y aprendizaje de los tratamientos crónicos durante 28 días con silimarina (n=5), quercetina (n=7) y naringenina (n=6) (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (18 meses) en comparación con ratas de la misma edad (n=6) y jóvenes (3 meses, n=8) tratadas con aceite de maíz (1ml/kg/día, i.p) en la prueba del laberinto de Barnes. **A)** Latencia total a los 15 y 28 días de tratamiento, **B)** Errores totales a los 15 y 28 días de tratamiento. Para el análisis estadístico de la latencia y los errores se utilizó one-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ cuando comparamos con grupo control jóvenes; † $p \leq 0,05$, †† $p \leq 0,01$, ††† $p \leq 0,001$ cuando comparamos con el grupo control viejas. **C)** Estrategia seguida en % respecto el total, a los 15 y 28 días. Para el análisis estadístico se utilizó el test de chi-cuadrado, que encontró diferencias significativas a los 15 días ($p < 0,0001$, $\chi^2 = 49,75$, $df = 8$) y a los 28 días ($p < 0,0001$, $\chi^2 = 200,6$, $df = 8$).

4.2.7 Efecto del envejecimiento y de los tratamientos crónicos con resveratrol en ratas adultas y viejas sobre la coordinación motora (*rotarod*)

Para valorar el efecto de los tratamientos con resveratrol sobre la coordinación motora se realizó la prueba de *rotarod*. Se calculó la media del tiempo que las ratas eran capaces de mantenerse en el cilindro rotatorio, sin caerse, cuando éste permanecía en aceleración. Las pruebas de coordinación motora se realizaron antes y después del tratamiento.

No se observaron cambios en la coordinación motora entre ratas jóvenes y adultas. El tratamiento con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) durante 15 días en ratas adultas de 9 meses (**Figura 55**) mejoró un 39,5 % la coordinación motora respecto a los animales control al final del tratamiento, y también mejoró un 36,05 % respecto a su mismo grupo al inicio del tratamiento ($F(2, 19)=7,7$, $p=0,006$).

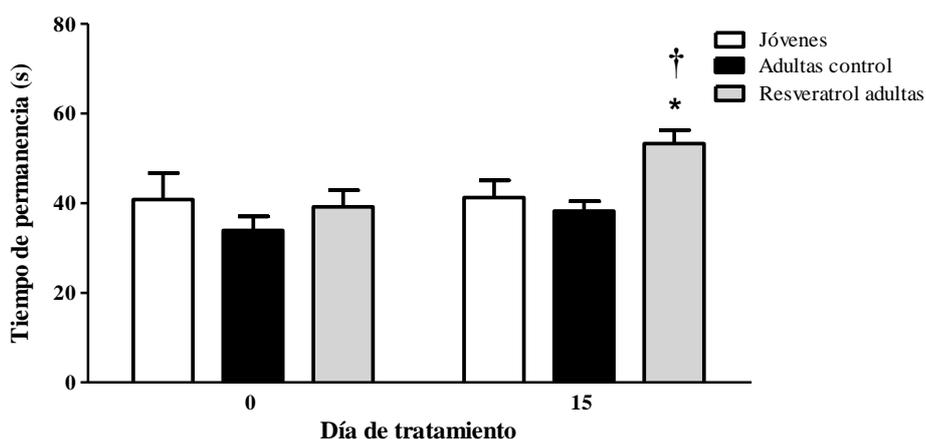


Figura 55. Efecto sobre la coordinación motora en el *rotarod* del tratamiento crónico (15 días) con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) en ratas adultas (9 meses, $n=6$), comparado con el grupo control de la misma edad ($n=5$) y jóvenes (3 meses, $n=8$) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). Las barras representan el promedio \pm SEM derivado del tiempo de permanencia en el aparato. Se detectaron diferencias significativas con one-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls: $*p \leq 0,05$, comparando con ratas control adultas a los 15 días de tratamiento. T-test para comparar el grupo resveratrol adultas respecto si mismas al inicio y final de tratamiento: $†p \leq 0,05$.

La **Figura 56** muestra el tiempo de permanencia en el *rotarod* de las ratas control jóvenes (3 meses) y viejas (20 meses) a las que se administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p), y ratas viejas tratadas con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) durante 30 días. Se observaron diferencias significativas debidas a la edad, así desde el inicio las ratas jóvenes permanecen en la rueda un 77 % más de tiempo que las ratas viejas ($F(2, 19)=39,83$, $p < 0,0001$). A los 15 días de tratamiento, los animales tratados con resveratrol incrementaron el tiempo de permanencia un 58,65 %, respecto al grupo control viejas ($F(2, 19)=39,46$, $p < 0,0001$). Al final del tratamiento esta diferencia se mantuvo ya que los animales tratados con resveratrol soportaron un 58,72 % más

que el grupo control viejas sobre la rueda ($F(2, 19)=41,14, p<0,0001$). Por otro lado, al final del tratamiento se observó una mejoría dentro del grupo de animales tratados con resveratrol respecto al inicio del tratamiento, incrementándose un 74,12 % el tiempo de permanencia en la rueda ($F(2, 18)=7,56, p=0,01$). En los grupos jóvenes y viejas no se observaron diferencias significativas a lo largo del tratamiento, aunque se observó una tendencia a aumentar el tiempo de permanencia, debido al factor entrenamiento en los tres grupos estudiados, que no fue significativo en el caso de los animales jóvenes y viejas control (jóvenes: $F(2, 24)=0,06, p=0,93$; viejas: $F(2, 15)=0,56, p=0,59$).

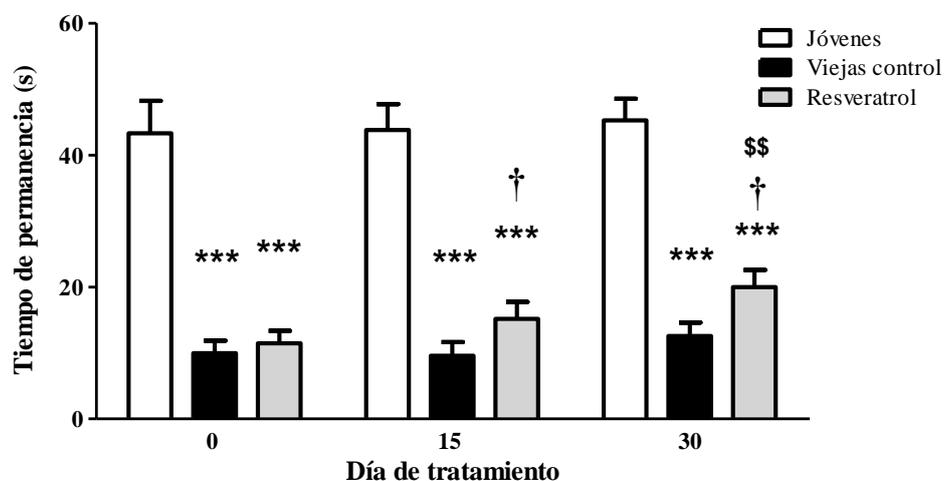


Figura 56. Efecto sobre la coordinación motora en el *rotarod*, del tratamiento crónico (30 días) con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (20 meses, n=6), comparado con el grupo control viejas (n=6) y jóvenes (n=8) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). Las barras representan el promedio \pm SEM derivado del tiempo de permanencia en el aparato. One-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls determinó diferencias significativas: *** $p\leq 0,001$, comparando con ratas jóvenes control a los 15 y 30 días de tratamiento; † $p\leq 0,05$, comparando con ratas viejas control a los 15 y 30 días de tratamiento. One-way ANOVA de medidas repetidas seguido por el test de Newman-Keuls determinó diferencias significativas dentro del grupo resveratrol a los 30 días respecto al día 0: \$\$ $p\leq 0,01$.

4.2.8 Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas sobre la coordinación motora (*rotarod*)

Como se ha observado anteriormente, existe deterioro en la coordinación motora debida a la edad, ya que las ratas viejas permanecen menos tiempo que las ratas jóvenes en la rueda, y no hay diferencias al final del tratamiento respecto al inicio del mismo en las jóvenes ($F(2, 24)=0,066, p=0,93$) ni en las viejas control ($F(2, 18)=0,99, p=0,41$). En cuanto al tratamiento con polifenoles en ratas viejas, a los 15 días no se observaron diferencias en la coordinación motora, comparando ratas tratadas con polifenoles (silimarina, quercetina, naringenina) respecto a las ratas control de la misma edad a las que se les había administrado aceite de maíz (**Figura 57**). Sin embargo, a los

30 días de tratamiento con los polifenoles todas las ratas viejas mejoraron la coordinación motora ($F(4, 31)= 11,06, p<0,0001$). Así los animales viejos tratados con silimarina, quercetina y naringenina permanecieron respectivamente, sobre el cilindro en movimiento un 38 %, 43 %, y 53 % más de tiempo que los animales viejos control. Además, se detectó una mejoría en la coordinación motora a lo largo del tratamiento para cada uno de los grupos respecto al inicio del tratamiento: silimarina ($F(2, 15)=7,43, p=0,01$), quercetina ($F(2, 21)=22,01, p<0,0001$) y naringenina ($F(2, 18)=54,02, p<0,0001$) (**Figura 57**).

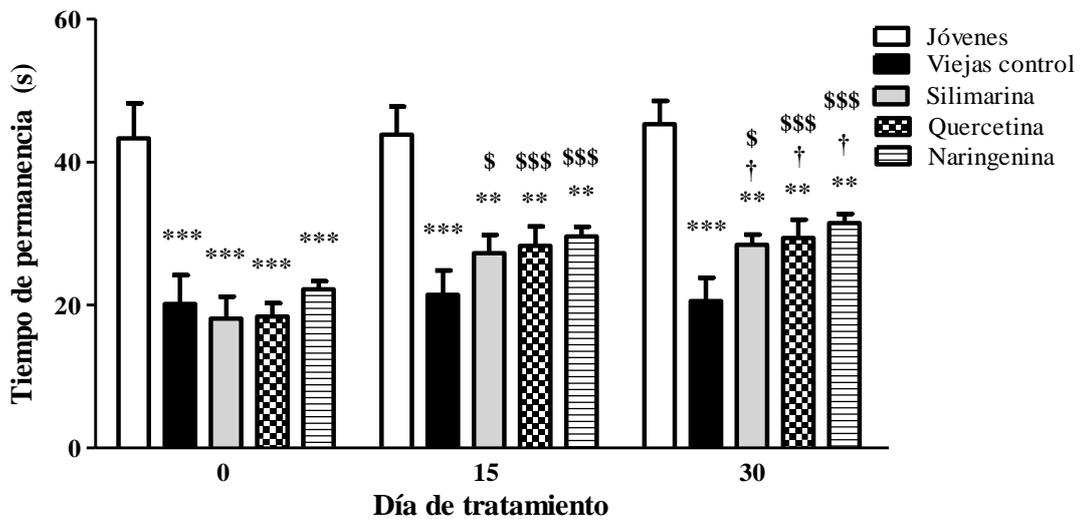


Figura 57. Efecto de los tratamientos crónicos (30 días) con silimarina (n=5), quercetina (n=7) y naringenina (n=6) (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (18 meses) en el aparato de *rotarod*, comparado con el grupo control viejas (n=6) y jóvenes (3 meses, n=8) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p). Las barras representan el promedio \pm SEM derivado del tiempo de permanencia en el aparato. One-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls determinó diferencias significativas: $**p\leq 0,01$, $***p\leq 0,001$, comparando con ratas control jóvenes a los 0, 15 y 30 días; $†p\leq 0,05$, comparando con ratas control viejas a los 30 días. One-way ANOVA de medidas repetidas en todos los tratamientos a los 15 y 30 días respecto día 0: $\$p\leq 0,05$, $$$$p\leq 0,001$.

4.3 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON LOS POLIFENOLES RESVERATROL, SILIMARINA, QUERCETINA Y NARINGENINA SOBRE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS EN RATAS VIEJAS

4.3.1 Efecto del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol sobre la síntesis de catecolaminas en el cerebro de ratas viejas

El hipocampo es una región cerebral rica en terminaciones noradrenérgicas y pobre en dopaminérgicas, por contra el estriado es una región predominantemente dopaminérgica. La síntesis y metabolismo *in vivo* de NA en el hipocampo y la síntesis y metabolismo de DA en el estriado se estimaron mediante determinación de la acumulación del precursor común DOPA en cada una de las regiones debida a la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH) tras la inhibición del enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) con NSD 1015 30 minutos antes del sacrificio de los animales. Las catecolaminas y sus metabolitos se determinaron mediante separación por HPLC con detección electroquímica.

Al comparar los resultados obtenidos a partir del cerebro de ratas jóvenes con el de ratas viejas se observó un claro efecto de la edad sobre los niveles de NA en hipocampo y DA en estriado, así como de sus precursores. La acumulación de DOPA en el hipocampo de las ratas viejas (20 meses) fue significativamente menor que en las jóvenes (3 meses) (**Figura 58**). Ello indica que la tasa de síntesis de NA se encuentra reducida en el hipocampo de las ratas viejas ya que la actividad basal de la enzima TH es más baja en estos animales. Como consecuencia, el contenido de NA en el hipocampo de estos animales se encuentra también reducido. Es importante destacar que el método de HPLC utilizado no permite detectar ningún metabolito de la NA, con lo que no podemos analizar su metabolismo.

Una disminución similar dependiente de la edad se observó en la actividad de TH en el estriado, pero en este caso, reflejando la síntesis de DA, con menos acumulación de DOPA, y menos contenido en DA, y el metabolito HVA en ratas viejas (**Figura 58, estriado**). Estos datos indican una menor síntesis y metabolismo de DA en ratas viejas respecto a las jóvenes.

Todos estos cambios dependientes de la edad fueron contrarrestados por el tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (20 meses) durante 30 días. Este tratamiento indujo un incremento significativo en la acumulación de DOPA (150 %) y contenido en NA (57 %) en hipocampo, respecto a los animales control de la misma edad. Efectos similares fueron observados para el sistema dopaminérgico en estriado, ya que el tratamiento con resveratrol en ratas viejas incrementó la acumulación de DOPA (36 %) y el contenido en DA (53 %) en esta

región; mientras que los niveles del metabolito HVA no cambiaron significativamente, respecto las ratas viejas control (**Figura 58**).

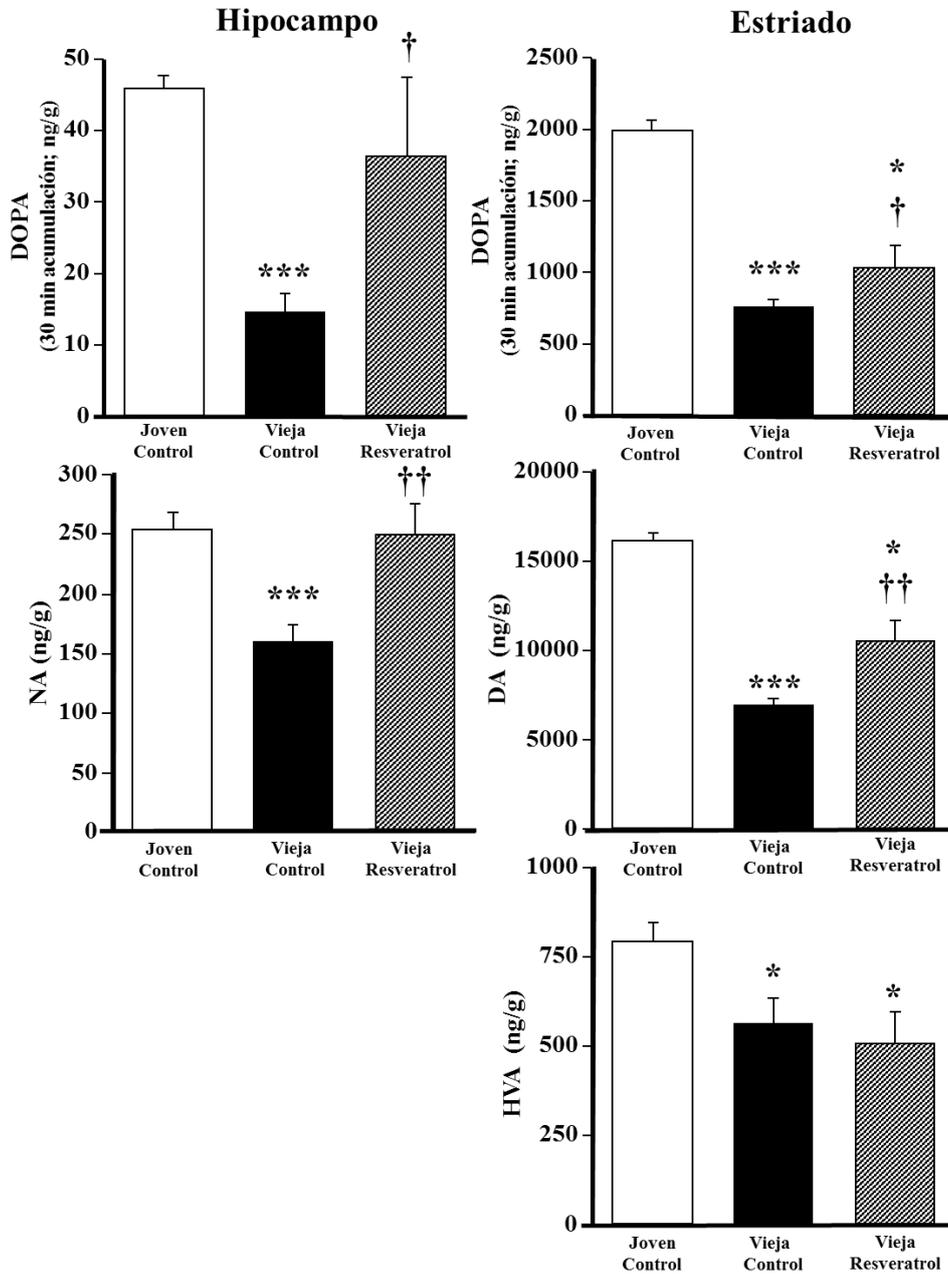


Figura 58. Efecto crónico (30 días) del tratamiento con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (20 meses, n=6), en comparación con ratas ratas viejas (20 meses, n=6) y jóvenes (3 meses, n=8) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p), en el sistema catecolaminérgico de hipocampo y estriado. Las barras representan la acumulación de DOPA (durante 30 minutos después de la inhibición de la enzima descarboxilasa), el contenido en DA o NA, y los niveles del metabolito HVA en estriado. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido del test de Scheffé: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ cuando comparamos con el grupo de ratas jóvenes control; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ cuando comparamos con el grupo control viejas.

El hipocampo es una región predominantemente noradrenérgica, y el estriado una región sobretodo dopaminérgica (Carlsson y cols., 1972; Nissbrandt y cols., 1988), no obstante se pueden detectar cantidades muy bajas de DA en el hipocampo, y de NA en el estriado, cantidades mucho mas bajas en relación a los neurotransmisores predominantes en cada región. La **Figura 59** muestra los valores de estos neurotransmisores obtenidos en los mismos animales de la **Figura 58**. Como puede observarse en ratas jóvenes los valores de DA en hipocampo son 100 veces menores que en el estriado, mientras que los valores de NA en estriado son 4 veces menores que en el hipocampo teniendo en cuenta que parte de la DA cuantificada es precursora en la vía de síntesis de NA, por lo que solo una pequeña cantidad podría ser debida a DA almacenada en terminales dopaminérgicas. Aún así los niveles de DA en hipocampo se encuentran muy por debajo de los niveles en una región netamente dopaminérgica.

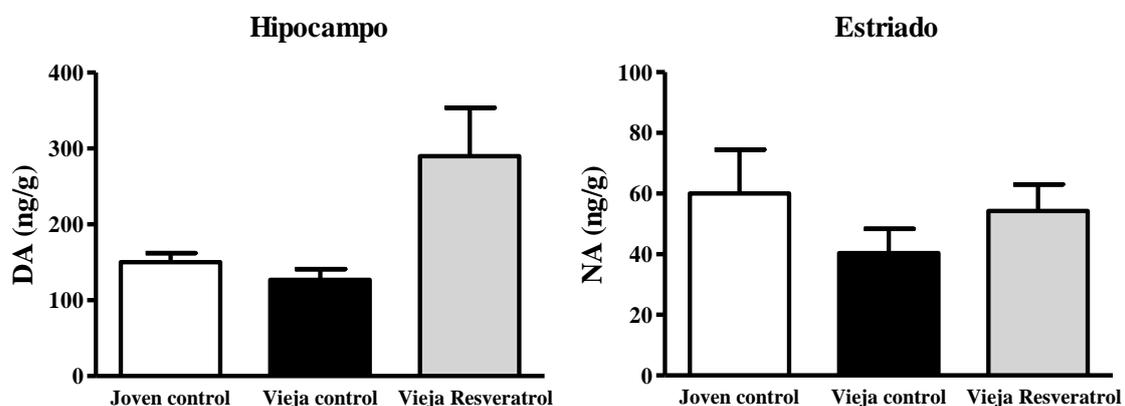


Figura 59. Efecto crónico (30 días) del tratamiento con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (20 meses, n=6), en comparación con ratas viejas (20 meses, n=6) y jóvenes (3 meses, n=8) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p), en los niveles de DA en hipocampo y NA en estriado. Las barras representan el contenido en DA y NA en ratas jóvenes y viejas control, y en ratas viejas tratadas con resveratrol. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls. No se detectaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

4.3.2 Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina sobre la síntesis de catecolaminas en el cerebro de ratas viejas

En la **Figura 60** se muestran los resultados del efecto de los tratamientos crónicos (30 días) con los polifenoles silimarina, quercetina y naringenina (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas de 18 meses de edad, en comparación con ratas viejas control (18 meses) a las que se administró aceite de maíz. Se muestran también los valores de ratas jóvenes (3 meses) para visualizar el efecto de la edad. De esta manera, se corroboró el efecto de la edad sobre la síntesis de catecolaminas observado previamente. En las ratas viejas la actividad basal de la enzima se encuentra disminuida (se observó una acumulación menor de DOPA tanto en hipocampo como en estriado) que provoca que en ambas regiones los niveles de NA y DA sean menores que en las ratas jóvenes.

En el hipocampo los tratamientos con estos polifenoles en ratas viejas revierten el efecto sobre la síntesis de catecolaminas asociado al envejecimiento (**Figura 60**). Tras cada uno de los tratamientos se observó un aumento considerable en la acumulación de DOPA en el hipocampo con valores de 71 % de incremento respecto de las ratas viejas control para la silimarina, 133 % para la quercetina y 169 % para la naringenina ($F(4, 32)=12,39$, $p<0,0001$). Ello pone de manifiesto el incremento de la actividad del enzima TH responsable de la síntesis de NA. Como consecuencia se ve incrementado el contenido de NA un 39 % en el caso de la silimarina, 29 % en la quercetina, 37 % y en la naringenina, respecto a ratas control viejas ($F(4, 32)=7,57$, $p=0,0004$).

Del mismo modo, en el estriado, los tratamientos con estos polifenoles provocaron un incremento en la síntesis y acumulación de DA (28 % tras silimarina, 38 % quercetina, y 39 % naringenina) ($F(4, 32)=55,03$, $p<0,0001$), que puede deberse al incremento en la acumulación de DOPA (63 % tras silimarina, 57 % quercetina, y 42 % naringenina) respecto al grupo control ($F(4, 32)=58,22$, $p<0,0001$) (**Figura 60**) debido a un incremento en la actividad de la enzima TH. En cuanto a los niveles del metabolito HVA (producto de la degradación de DA por medio de la enzima MAO), se observó un descenso en ratas viejas respecto las jóvenes ($F(4, 32)=122,3$, $p<0,0001$). Además en ratas viejas no se observaron cambios significativos en los niveles de este metabolito tras los tratamientos con polifenoles (**Figura 60**).

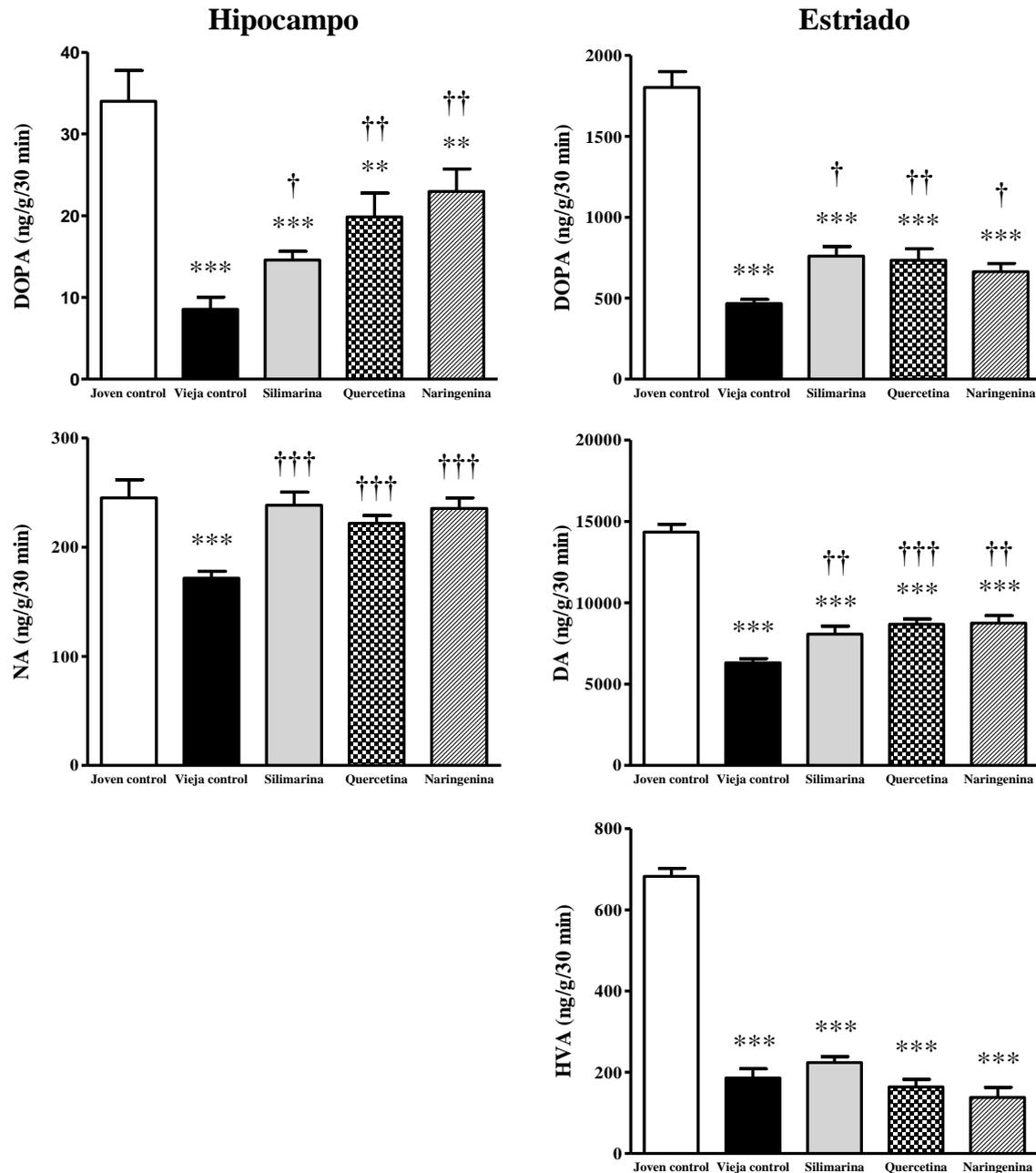


Figura 60. Efecto crónico (30 días) de los tratamientos con silimarina (n=5), quercetina (n=7) y naringenina (n=6) (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (18 meses), en comparación con ratas jóvenes (3 meses, n=8) y viejas (18 meses, n=6) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p) en la acumulación de DOPA (después de la inhibición con NSD 1015 de la enzima AADC durante 30 minutos) y en el contenido en NA en el hipocampo; y niveles de DOPA, DA y HVA en estriado. Las barras representan ng/g (promedio \pm SEM) en tejido húmedo. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ comparando con ratas jóvenes control; † $p \leq 0,05$, †† $p \leq 0,01$, ††† $p \leq 0,001$ comparando con ratas viejas control.

4.3.3 Efecto del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol sobre la síntesis serotoninérgica en el cerebro de ratas viejas

Se midió la síntesis y metabolismo de 5-HT en dos regiones ricas en terminaciones nerviosas serotoninérgicas: hipocampo y estriado. En estas regiones cerebrales, la enzima limitante es la triptófano hidroxilasa (TPH) isoforma TPH2. Por otro lado, también se midió la síntesis y metabolismo de 5-HT en la glándula pineal donde la enzima limitante es la isoforma TPH1. De esta manera, la síntesis de 5-HT fue determinada mediante la acumulación de su precursor 5-HTP durante 30 minutos después de la inhibición de la enzima AADC por medio de la administración de NSD 1015. En estas condiciones, la acumulación de 5-HTP refleja la actividad de la enzima limitante TPH.

La síntesis de 5-HT disminuyó con la edad ya que se vio una reducción de los niveles de 5-HTP, de 5-HT y también de su metabolito 5-HIAA en las tres regiones estudiadas debido al envejecimiento (**Figura 61**). Sin embargo, el tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas incrementó la síntesis de 5-HT ya que aumentó los niveles de 5-HTP un 70 % en hipocampo y un 51 % en estriado, reflejando un aumento en la actividad de la enzima TPH2, así como aumentó el contenido de 5-HT un 55 % en hipocampo y un 76 % en estriado. Además el tratamiento con resveratrol redujo los niveles del metabolito 5-HIAA (22 % y 48 % en hipocampo y estriado, respectivamente) (**Figura 61**). En conjunto los resultados indican una aceleración en la síntesis de 5-HT, y una reducción de su degradación en hipocampo, y estriado de animales viejos tratados con resveratrol. Esto último puede significar que el tratamiento con resveratrol, no solo favorece el aumento de la síntesis, sino también previene la degradación de 5-HT en sus metabolitos, probablemente inhibiendo la enzima MAO.

Por otro lado, también analizamos el efecto del resveratrol sobre la síntesis de 5-HT en la glándula pineal. En este caso, la acumulación de 5-HTP es indicativa de la actividad de la isoforma TPH1. De forma similar a lo observado, para la TPH2, se vio una reducción en la actividad TPH1 dependiente de la edad. Por su parte, el tratamiento con resveratrol durante 30 días incrementó la acumulación de 5-HTP, desde $1,45 \pm 0,67$ ng/g de tejido en ratas viejas control hasta $6,72 \pm 0,54$ ng/g de tejido en ratas tratadas con resveratrol ($p < 0,001$ por t-test), llegando a niveles similares a los de animales jóvenes. Como consecuencia también se incrementó significativamente el contenido de 5-HT en la glándula pineal de ratas viejas. Por último, el tratamiento con resveratrol no modificó los niveles de 5-HIAA en la glándula pineal (**Figura 61**).

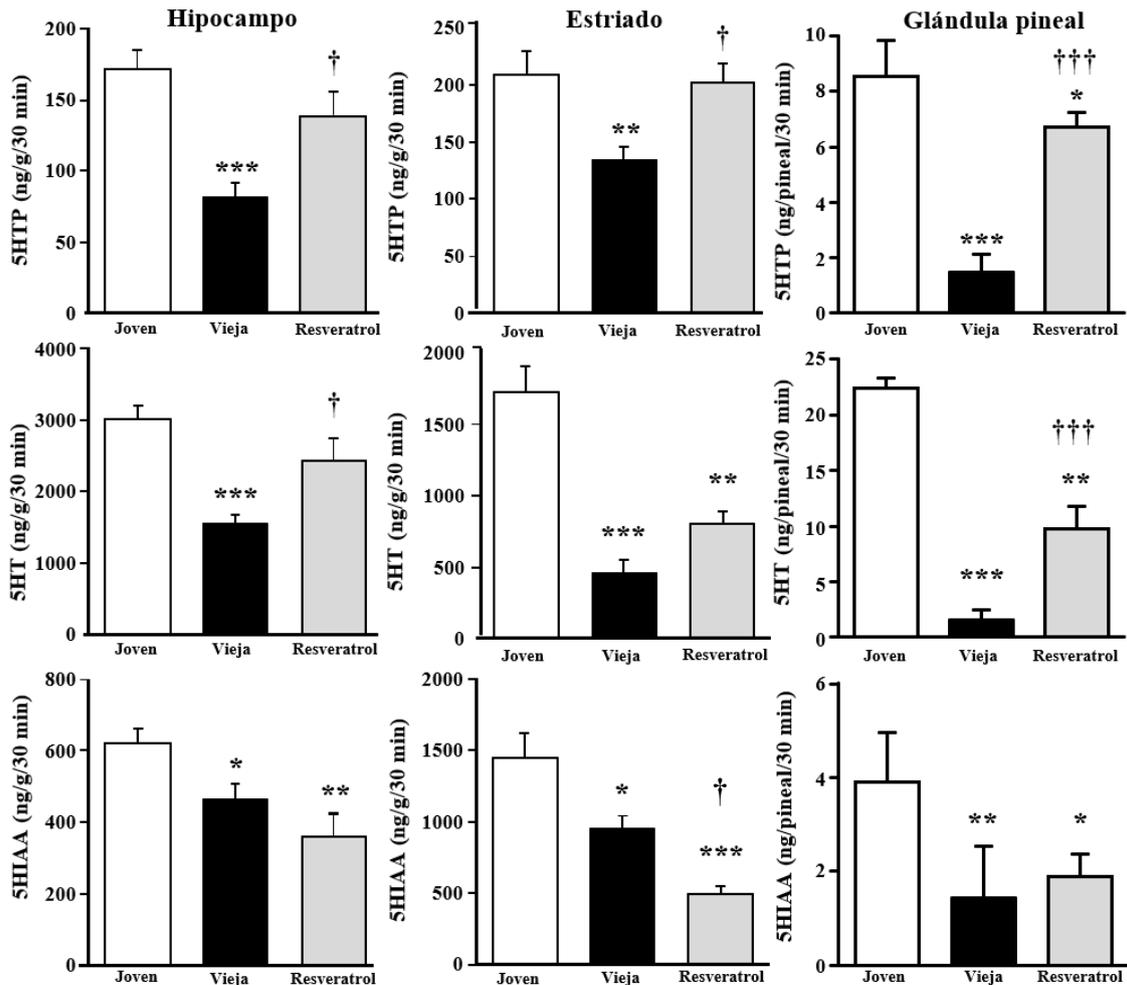


Figura 61. Efecto crónico (30 días) del tratamiento con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (20 meses, n=6), en comparación con ratas control viejas (n=6) y jóvenes (3 meses, n=8) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p), en el sistema serotoninérgico en hipocampo, estriado y glándula pineal. Las barras representan (el promedio \pm SEM en ng/g de tejido húmedo) de la acumulación de 5-HTP (durante 30 min después de la inhibición de la enzima AADC), el contenido de 5-HT y los niveles del metabolito 5-HIAA. Para la evaluación estadística se utilizó one-way ANOVA seguido del test de Scheffé: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ cuando comparamos con el grupo control jóvenes; † $p \leq 0,05$, †† $p \leq 0,001$ comparado con el grupo control viejas.

4.3.4 Efecto de los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina sobre la síntesis serotoninérgica en el cerebro de rata vieja

Se corroboró una reducción de los niveles de 5-HTP, de 5-HT y su metabolito 5-HIAA en las tres regiones estudiadas debido al envejecimiento (**Figura 62**). En ratas viejas el tratamiento crónico con silimarina, quercetina y naringenina incrementó la acumulación de 5-HTP en las tres regiones estudiadas lo que indica un aumento en la síntesis de 5-HT mediado por la TPH por parte de los polifenoles estudiados. En el hipocampo el incremento fue de un 37 % en el caso de la silimarina, 52 % en la quercetina, y 53 % en la naringenina ($F(4, 32)=11,7$, $p < 0,0001$). En el estriado el incremento fue similar, un 36 % en el grupo de la silimarina, 44 % en el de la quercetina, y 53 % en la naringenina ($F(4, 32)=3,69$, $p < 0,0301$). En la glándula pineal el incremento de 5-HTP debido

al aumento de la actividad TPH1 fue de un 239 % en el tratamiento con silimarina, 288 % en el de quercetina, y 238 % en el de naringenina ($F(4, 32)=7,85, p= 0,0003$).

Como consecuencia, estos tratamientos incrementaron el contenido total de 5-HT en las tres regiones (**Figura 62**). En el hipocampo se observó un incremento de 5-HT de un 44 % tras tratamiento con silimarina, 48 % tras quercetina, y 49 % después del tratamiento con naringenina ($F(4, 32)=3,05, p=0,02$). En el estriado el incremento de 5-HT fue de un 77 % en el grupo de la silimarina, 68 % en el de quercetina, y 57 % en el caso de la naringenina ($F(4, 32)=4,82, p=0,01$). En la glándula pineal el incremento de 5-HT fue de un 323 %, 307 % y un 145 % tras los tratamientos con silimarina, quercetina y naringenina respectivamente ($F(4, 32)= 47,46 p<0,0001$).

En cuanto a los niveles del metabolito 5-HIAA, en el hipocampo el tratamiento con quercetina redujo un 14 % los niveles de este metabolito, lo mismo ocurrió con el tratamiento con naringenina que redujo un 37 % los niveles de 5-HIAA respecto ratas viejas ($F(4, 32)=8,17, p=0,0002$), pero no se observaron cambios en los niveles de 5-HIAA debidos al tratamiento con silimarina (**Figura 62**). En el estriado de las ratas viejas tratadas con silimarina, quercetina y naringenina se determinó menos 5-HIAA (58 %, 40 %, 58 %, respectivamente) respecto ratas viejas control ($F(4, 32)=7,8, p=0,0003$) (**Figura 62**). En conjunto, los resultados obtenidos en hipocampo y estriado, pueden sugerir una inhibición por parte de los tratamientos con polifenoles de la enzima MAO, que degrada el 5-HT en 5-HIAA. En la glándula pineal los tratamientos con silimarina, quercetina y naringenina aumentaron la síntesis de 5-HT y mantuvieron niveles similares de 5-HIAA a los de las ratas viejas control, siendo más bajos que los de las jóvenes ($F(4, 32)=29,10 p<0,0001$) (**Figura 62**).

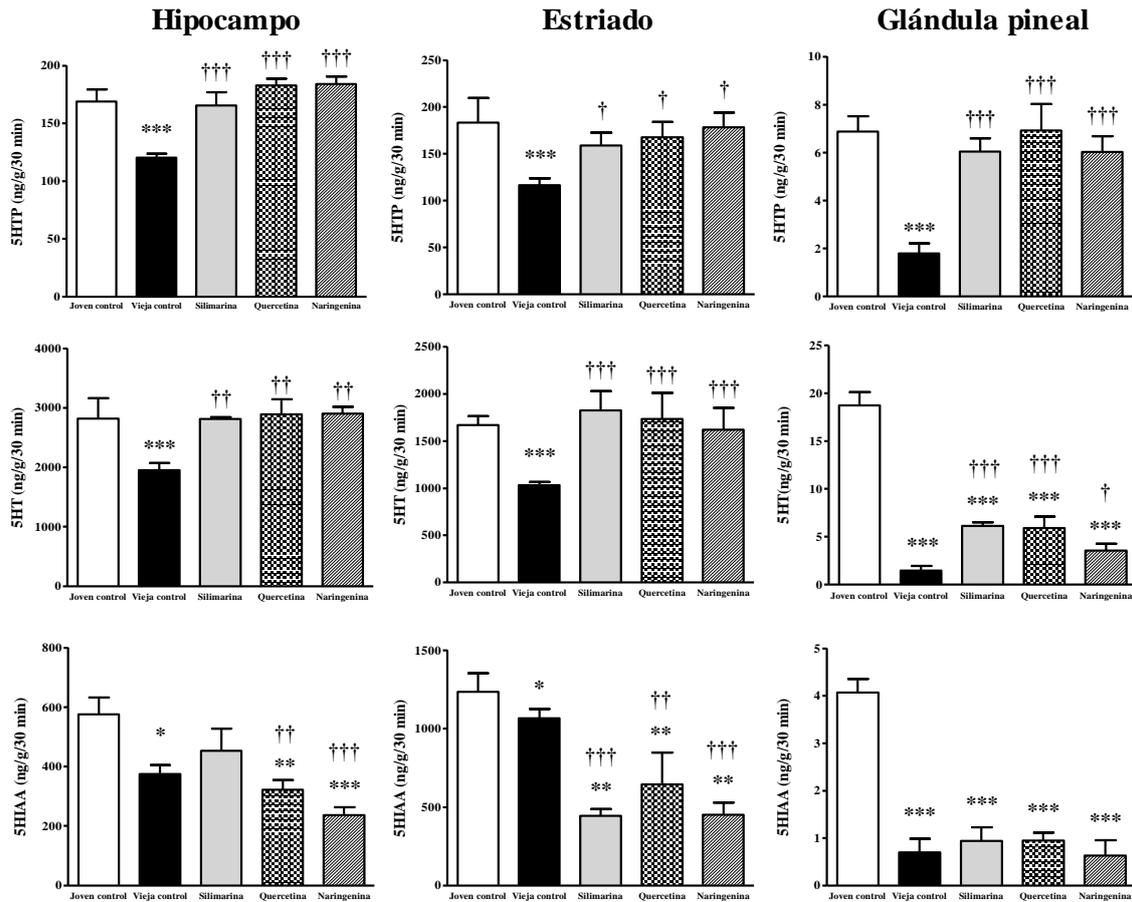


Figura 62. Efecto crónico (30 días) de los tratamientos con silimarina (n=5), quercetina (n=7) y naringenina (n=6)(20 mg/kg/día, i.p) en ratas viejas (18 meses), en comparación con ratas viejas (n=6) y jóvenes (3 meses, n=8) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p), en el sistema serotoninérgico de hipocampo, estriado y glándula pineal, en la acumulación de 5-HTP (después de 30 minutos de la inhibición de la enzima AADC con NSD 1015), contenido en 5-HT y su metabolito 5-HIAA. Las barras representan ng/g (promedio \pm SEM) de tejido húmedo en hipocampo, estriado y glándula pineal. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido del test de Newman-Keuls: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ comparando con ratas jóvenes control; † $p \leq 0,05$, †† $p \leq 0,01$, ††† $p \leq 0,001$ comparando con ratas viejas control.

4.4 EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS CON LOS POLIFENOLES RESVERATROL, SILIMARINA, QUERCETINA Y NARINGENINA SOBRE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL ENVEJECIMIENTO

En los apartados anteriores hemos explicado los cambios que tienen lugar durante el envejecimiento sobre la conducta y la síntesis de monoaminas y los efectos beneficiosos que producen los polifenoles en estos parámetros. En este apartado con el objetivo de profundizar en los mecanismos moleculares responsables de estos efectos se analizaron los niveles de distintas proteínas en los cerebros de esos mismos animales. Se eligieron proteínas relacionadas con mecanismos y/o vías de señalización que se han descrito que están alterados durante los procesos que conducen al envejecimiento.

4.4.1 Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR

La vía de señalización intracelular PI3K/Akt/mTOR está implicada en el control del ciclo celular, la proteostasis, el metabolismo, la autofagia, y la longevidad, entre otras funciones (Manning y cols., 2007). Además esta vía de señalización interactúa con otras vías que participan en los procesos de inflamación (Han y cols., 2010). Por este motivo, las alteraciones en esta vía de señalización pueden dar lugar a enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Hers y cols., 2011). Hemos analizado la inmunoreactividad de algunas proteínas de esta vía, como son la proteína Akt (60 kDa), tanto en su forma activa cuando se fosforila en la serina 473 (p-Akt), como en su forma total (Akt) en el hipocampo y corteza parietal de ratas jóvenes (3 meses) y viejas (20 meses) y viejas tratadas con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p, 30 días). Además, hemos estudiado en las mismas regiones cerebrales y en los mismos animales, los niveles de inmunoreactividad de la proteína mTOR (289 kDa) en su forma activa, cuando ésta proteína está fosforilada en la serina 2448 (p-mTOR). Se estudió el hipocampo por ser una región relacionada con los procesos de memoria y aprendizaje, y la corteza parietal para poder comparar los resultados, con una región de funciones más amplias.

Por medio de la técnica de *western blot* pudo observarse que en el hipocampo de rata se mantienen constantes los niveles de la proteína Akt y de su forma activa (p-Akt) independientemente de la edad (**Figura 63A**). Tras el tratamiento con resveratrol en ratas viejas no se aprecian diferencias en los niveles totales de Akt (**Figura 63B**), pero sí una ligera disminución, no significativa, en la inmunoreactividad de p-Akt (**Figura 63A**). La relación p-AKT/AKT, que puede considerarse como un indicador de la actividad de la vía, no se alteró significativamente con el envejecimiento ni con el tratamiento con resveratrol (**Figura 63C**), por lo que podemos concluir que no se

produce una activación diferencial de esta vía por efecto de la edad, así como tampoco el tratamiento con resveratrol tiene grandes efectos en esta vía de señalización.

En la corteza parietal el envejecimiento no alteró la inmunoreactividad de Akt (**Figura 63E**), sin embargo la inmunoreactividad de p-Akt en los animales viejos fué un 28 % superior a la de los animales jóvenes (**Figura 63D**). Por tanto, durante el envejecimiento se observa un aumento en la proporción entre p-Akt y Akt (**Figura 63F**). Estos resultados indican que los niveles elevados en la inmunoreactividad de p-Akt son debidos a un incremento en el número de proteínas Akt fosforiladas, es decir activas, y no a un incremento en la cantidad total de la proteína. El tratamiento con resveratrol no alteró la inmunoreactividad de p-Akt en los animales viejos, manteniéndose los niveles elevados respecto de los animales jóvenes.

En conjunto estos resultados parecen indicar que en la corteza parietal durante el envejecimiento se produce una activación constitutiva de esta señalización que no se observa en el hipocampo. El tratamiento con resveratrol no provocó cambios importantes lo que parece indicar que los efectos del resveratrol observados sobre las capacidades cognitivas y la síntesis y metabolismo de monoaminas, no estarían mediados de forma significativa por cambios en esta vía de señalización.

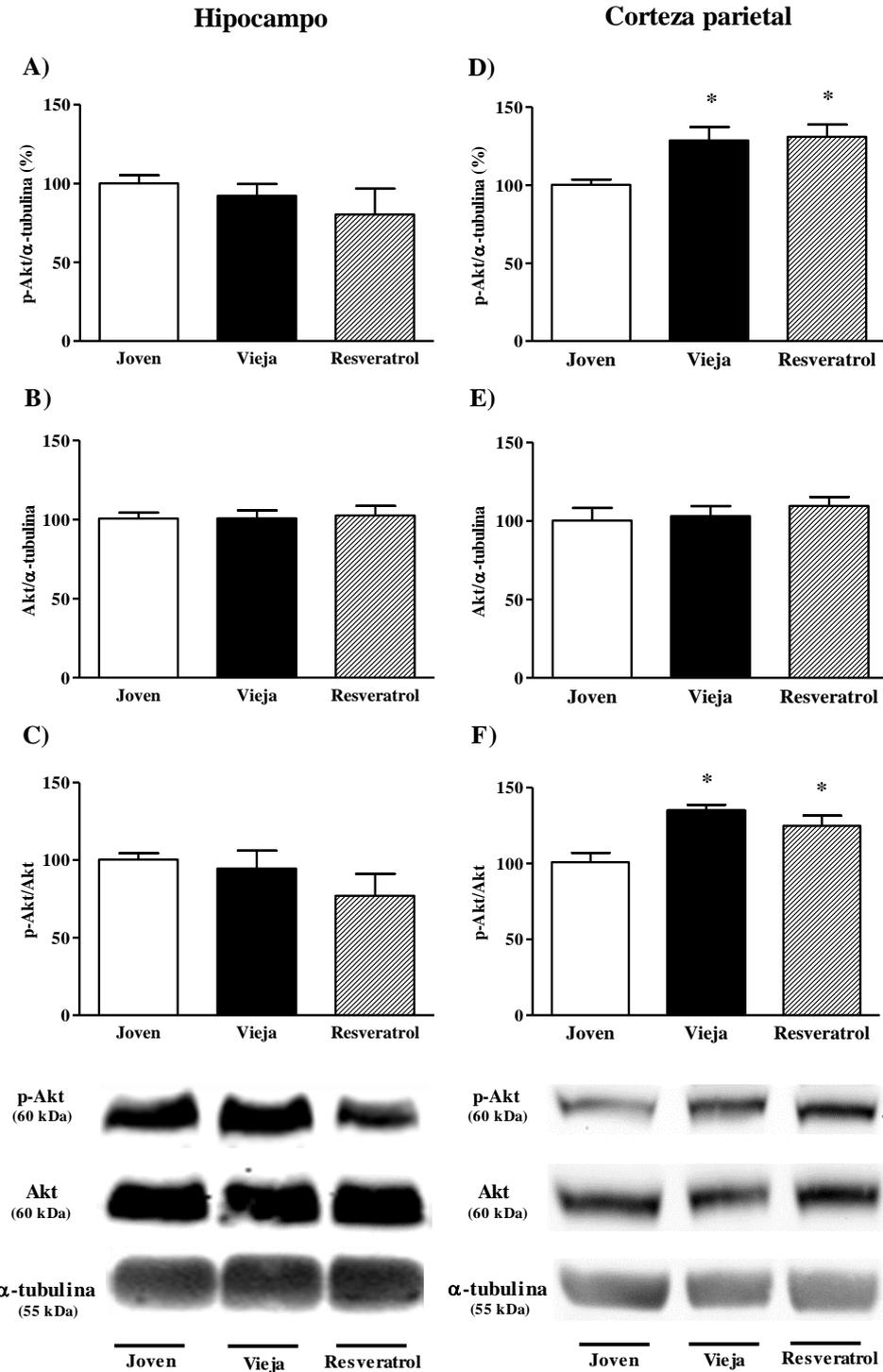


Figura 63. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p., n=6, 30 días) en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de: **A)** p-Akt, **B)** Akt y **C)** p-Akt/Akt en hipocampo; **D)** p-Akt; **E)** Akt y **F)** p-Akt/Akt en corteza parietal. Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (20 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje de las ratas jóvenes control. Se utilizaron las mismas membranas re-bloteadas para la comparación de la forma fosforilada y total de cada proteína, así como para la α -tubulina. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls, que detectó diferencias significativas en p-Akt en la corteza parietal ($F(2, 20)=4,504$; $p=0,034$) y en la proporción p-Akt/Akt en esta región $F(2, 20)=7,17$; $p=0,01$. * $p \leq 0,05$ comparando con ratas jóvenes control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de cada proteína en los distintos grupos experimentales (30 μ g de proteína cargada).

A continuación con el objetivo de comprobar si realmente los efectos del resveratrol no están mediado por cambios en esta vía de señalización se analizaron los niveles de inmunoreactividad de la proteína mTOR en su forma activa, es decir cuando esta proteína está fosforilada (p-mTOR), en hipocampo y corteza parietal de ratas jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y viejas tratadas con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p, 30 días).

En las muestras procedentes de hipocampo de ratas jóvenes, viejas y viejas tratadas con resveratrol no se observaron diferencias significativas en los niveles de inmunoreactividad de p-mTOR ($F(2, 20)=0,1022$; $p=0,9044$) (**Figura 64A**). Tampoco se observó ninguna alteración en los niveles de inmunoreactividad de p-mTOR en la corteza parietal de estos animales ($F(2, 20)=0,248$; $p=0,784$) (**Figura 64B**), a pesar del incremento previamente observado en la inmunoreactividad de p-Akt (**Figura 63D**), que es la quinasa responsable de la activación de mTOR en esta vía de señalización.

Todos estos resultados indican que en el hipocampo la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR probablemente no participa en los procesos moleculares involucrados en el desarrollo del envejecimiento cerebral ni en la mejora de los procesos cognitivos asociados al tratamiento con resveratrol en ratas viejas.

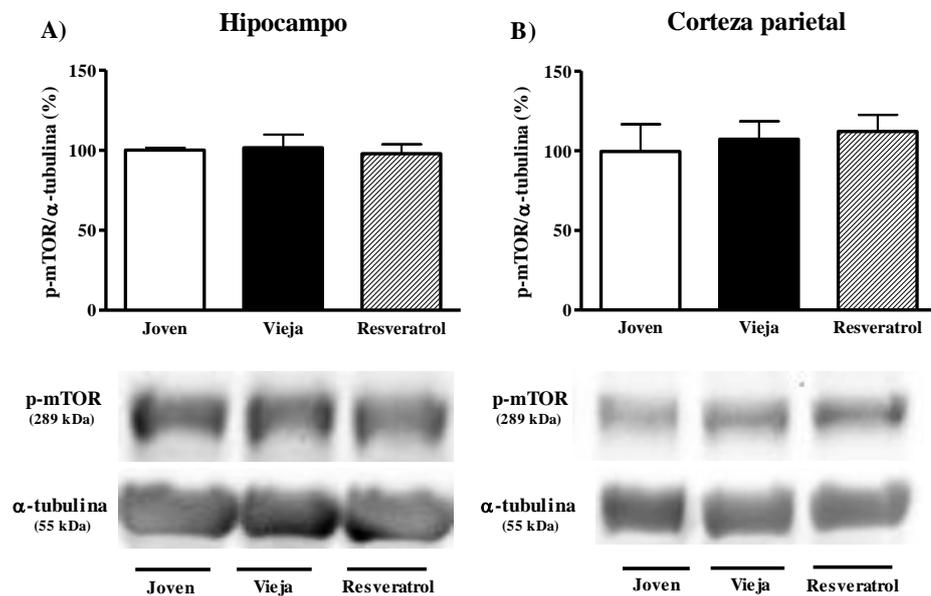


Figura 64. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día, n=6, i.p., 30 días) en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de p-mTOR: **A**) en hipocampo y **B**) en corteza parietal. Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (20 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje de las ratas jóvenes control. Se utilizaron las mismas membranas rebloteadas para p-mTOR y α -tubulina. No se detectaron diferencias estadísticas por medio de one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de cada proteína en los distintos grupos experimentales (30 μ g de proteína cargada).

4.4.2 Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre vías de señalización implicadas en neuroinflamación

El envejecimiento cerebral se ha relacionado con alteraciones en el sistema inmunitario innato y en particular con estados inflamatorios crónicos. En el cerebro, la neuroinflamación es un mecanismo de defensa que el organismo tiene con el objetivo de proteger el SNC contra infecciones y la presencia de moléculas inflamatorias (Spencer y cols, 2012). Se ha descrito un incremento de la neuroinflamación durante el envejecimiento que se traduce en la activación de vías de señalización como la vía de señalización por quinasas mitogénicas MAPK (Bhat y cols., 1998; Culbert y cols., 2006, Spencer y cols., 2009 a), o la vía del factor nuclear NF- κ B que es considerada como la principal vía de señalización proinflamatoria (Adler y cols., 2007; Spencer y cols., 2012). Con el objetivo de analizar los efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol sobre proteínas/vías de señalización implicadas en estados inflamatorios a nivel cerebral se estudiaron estas vías de señalización; centrándonos en el estudio del hipocampo, por ser la principal estructura cerebral relacionada con los procesos cognitivos.

4.4.2.1 Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre la vía de señalización de MAPK/ERK

Se estudió la vía de señalización de MAPK mediante el análisis de la inmunoreactividad de la proteína MEK1/2 (45 kDa) y su forma activa fosforilada en las Ser217/221 (p-MEK1/2), la proteína ERK1/2 (42 y 44 kDa) y su forma activa fosforilada en las Thr202 y/o Tyr204 (de ERK1) y la Thr185 y/o la Tyr187 (de ERK2) mediante el uso de anticuerpos específicos, en el hipocampo de ratas jóvenes (3 meses) y viejas (20 meses) y viejas tratadas con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p, 30 días) (**Figura 65**).

Los resultados obtenidos tras el análisis de la proteína MEK1/2 en el hipocampo de ratas revelaron niveles más elevados (24 %) de la quinasa activa (p-MEK) (**Figura 65A**) así como de los niveles totales de MEK1/2 (15 %) en los animales viejos, respecto de los animales jóvenes (**Figura 65B**). En consonancia con estos resultados, la inmunoreactividad de p-ERK1/2 y ERK1/2 se vieron incrementadas un 39 % y 32 % respectivamente en las ratas viejas respecto de las jóvenes (**Figura 65D y E**). Cabe destacar que la proporción entre la forma fosforilada y total de MEK1/2 y ERK1/2 se mantiene constante a pesar de la edad (**Figura 65C y F**). Todo ello parece sugerir que durante el envejecimiento se produce una mayor activación de la señal inflamatoria, que no es debido a una activación en si de la vía de señalización de MAPK sino a un incremento de la expresión de las proteínas totales y en consecuencia de la forma fosforilada de estas proteínas. Lo que pone de

manifiesto alteraciones adaptativas duraderas en estas vías de señalización durante el envejecimiento.

Por otro lado, el tratamiento con resveratrol en ratas viejas no revierte de forma significativa los efectos del envejecimiento sobre las proteínas MEK y ERK en sus formas totales y fosforiladas.

Estos resultados parecen indicar una sobreexpresión de las proteínas de la vía de las MAPK en el hipocampo de los animales viejos que podría relacionarse con un aumento del estado proinflamatorio durante el envejecimiento. Sin embargo, los efectos beneficiosos durante el envejecimiento del tratamiento con resveratrol no parecen estar tan relacionado con la prevención de estas señales inflamatorias. Por este motivo a continuación se estudió la vía de señalización de NF- κ B, cuya activación es clave para el desarrollo de los procesos inflamatorios.

Hipocampo

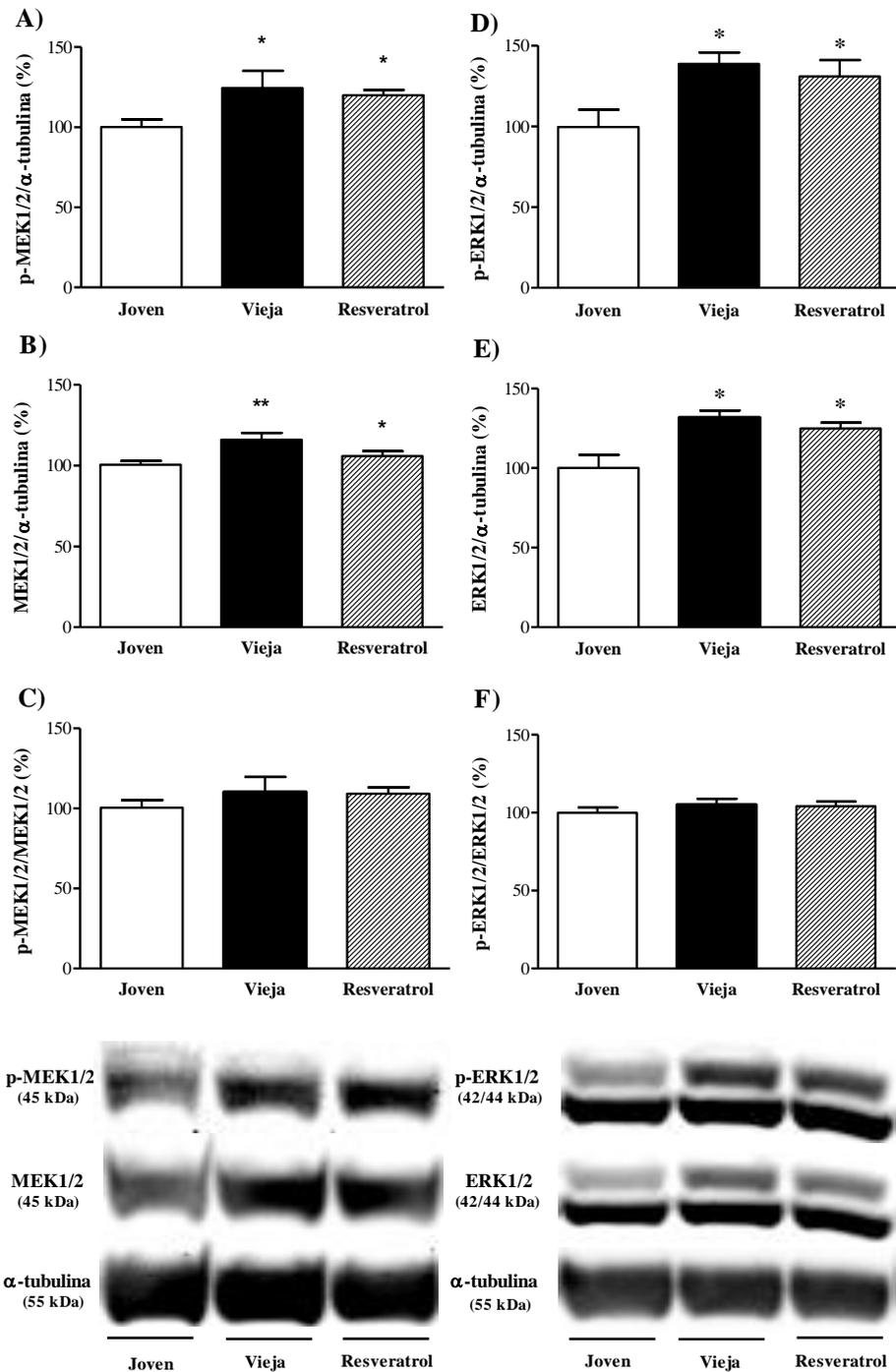


Figura 65. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p., n=6, 30 días) en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de: **A)** p-MEK1/2, **B)** MEK1/2, **C)** p-MEK1/2 respecto MEK1/2, **D)** p-ERK1/2, **E)** ERK1/2 y **F)** p-ERK1/2 respecto ERK1/2 en hipocampo. Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (20 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media ± error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes control. Se utilizaron las mismas membranas re-bloteadas para la comparación de la forma fosforilada y total de cada proteína, así como para la α-tubulina. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls, que detectó diferencias significativas en p-MEK1/2 (F(2, 20)=4,35, p=0,032), MEK1/2 (F(2, 20)=6,63, p=0,0086), p-ERK1/2 (F(2, 20)=4,451, p=0,030), ERK1/2 (F(2, 20)=6,094, p=0,011). *p≤0,05; **p≤0,01 comparando con ratas jóvenes control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de cada proteína en los distintos grupos experimentales.

4.4.2.2 Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol sobre la vía de señalización de NF- κ B

La vía del factor nuclear NF- κ B es considerada como la vía de señalización proinflamatoria prototípica, principalmente por el papel de NF- κ B en la expresión de genes proinflamatorios (Friedman y cols., 2002; Adler y cols., 2007). En el cerebro además, se ha descrito la implicación de NF- κ B en procesos de plasticidad sináptica y memoria (Williams y cols., 2008). NF- κ B está formado por un complejo heterodimérico compuesto por p50/p52 y p65 (Siebenlist y cols., 1994). En el citoplasma, el dímero de NF- κ B se une con la proteína inhibitoria I κ B y de esta forma todo el complejo está inactivo. Los ROS y otras moléculas activan el estado redox de las proteínas quinasas que fosforilan I κ B, de forma que I κ B fosforilada se separa del complejo NF- κ B, activándolo y permitiendo que se transloque al núcleo donde se puede unir al ADN en las regiones promotoras específicas, actuando como un factor de transcripción. Esta unión a las regiones promotoras específicas se ve modulada por modificaciones postranscripcionales en la subunidad p65 como fosforilación en la serina 276 y acetilación en la lisina 310, entre otras (Perkins y cols., 2007). Estos son los puntos de regulación de NF- κ B más frecuentes, aunque se han encontrado proteínas específicas que pueden fosforilar otras serinas (311, 529 y 536) y acetilar otras lisinas (122, 123, 218 y 221) en la subunidad p65 (Oeckinghaus y cols., 2009). En este apartado hemos estudiado los niveles de inmunoreactividad de la proteína NF- κ B (65 kDa) en su forma total, en su forma activa cuando se fosforila en la ser276 (p-NF- κ B) y en su forma acetilada cuando la lisina 310 de la subunidad RelA/p65 está acetilada (NF- κ B acetilada), en el hipocampo de ratas jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y viejas tratadas con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p, 30 días).

Los resultados del estudio de la vía de señalización de NF- κ B muestran que se mantienen niveles similares de inmunoreactividad de p-NF- κ B en el hipocampo de ratas jóvenes y viejas (**Figura 66A**). En estos animales también se mantienen constantes los niveles de la proteína NF- κ B en su forma total (**Figura 66C**). Así, no se observan diferencias en la relación p-NF- κ B/NF- κ B en ratas jóvenes y viejas (**Figura 66D**). Lo que parece indicar que el envejecimiento no induce ningún incremento en el estado basal de la activación de NF- κ B por fosforilación.

El tratamiento con resveratrol no alteró la inmunoreactividad de p-NF- κ B en ratas viejas. Sin embargo, se detectó una ligera disminución, no significativa, de los niveles totales de NF- κ B en los animales tratados, lo que se traduce en un ligero incremento de la relación p-NF- κ B/ NF- κ B (**Figura 66D**), aunque se observa una ligera tendencia que no llega a ser significativa a la reducción de los niveles totales de NF- κ B.

Los resultados obtenidos con el anticuerpo específico contra la forma acetilada de NF- κ B detectaron diferencias debidas al envejecimiento. En las ratas viejas la inmunoreactividad de la forma acetilada de NF- κ B fue significativamente superior (16 %, $p < 0,001$) que en los animales jóvenes (**Figura 66B**). Como los niveles totales de NF- κ B se mantienen constantes, puede afirmarse que durante el envejecimiento se produce un incremento en la forma acetilada de NF- κ B, y que este no es debido a un incremento en la cantidad total de la proteína. Así, la relación entre la forma acetilada y la total de NF- κ B es más elevada en ratas viejas que en jóvenes, lo que podría sugerir que durante el envejecimiento se produce un efecto modulador que afecta la acetilación de la lisina 310 de la subunidad p65 (**Figura 66E**). Resulta sumamente interesante comprobar que este efecto es revertido tras el tratamiento con resveratrol. Las ratas viejas tratadas con resveratrol presentan niveles de NF- κ B acetilada próximos a los que presentan las ratas jóvenes (92 %) (**Figura 66B**). Todo ello indica que, muy probablemente, el resveratrol induce de forma directa o indirecta la desacetilación de NF- κ B. Estos resultados son muy prometedores ya que la acetilación de la subunidad p65 resulta esencial para la actividad del factor de transcripción NF- κ B y el resveratrol permitiría su regulación farmacológica. Aunque son necesarios otros estudios para dilucidar si estos efectos se deben a un mecanismo de acción directo del resveratrol o son consecuencia de efectos secundarios de éste.

Hipocampo

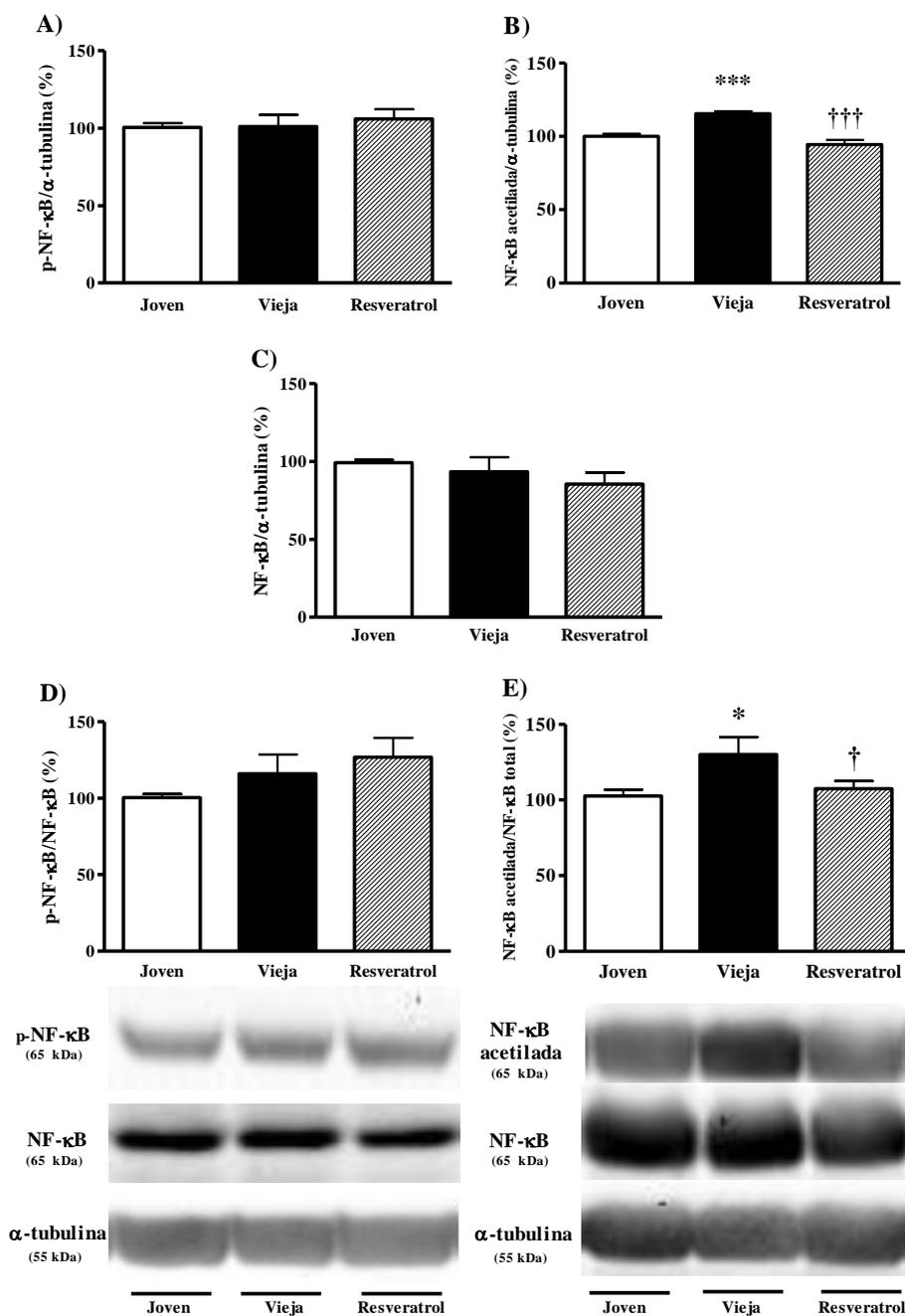


Figura 66. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p., n=6, 30 días) en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad en el hipocampo de rata de: **A)** p-NF-κB, **B)** NF-κB acetilada, **C)** NF-κB, **D)** p-NF-κB/NF-κB y **E)** NF-κB acetilada/NF-κB. Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (20 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media ± error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje de las ratas jóvenes control. Se utilizaron las mismas membranas re-bloteadas para la comparación de la forma fosforilada, acetilada y total de cada proteína, así como para la α-tubulina. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls, que detectó diferencias significativas en NF-κB acetilada ($F(2, 20)=22,74, p<0,0001$) y en NF-κB acetilada/ NF-κB ($F(2, 20)= 4,45, p=0,03$). * $p\leq 0,05$; *** $p\leq 0,001$ comparando con ratas jóvenes control; † $p\leq 0,05$; ††† $p\leq 0,01$ comparando con ratas viejas control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de cada proteína en los distintos grupos experimentales.

4.4.3 Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol en ratas viejas sobre la enzima desacetilasa SIRT1

SIRT1 (110 kDa) es una enzima desacetilasa de histonas y otras proteínas no histonas, que se ha descrito que puede estar implicada en los procesos de envejecimiento (Markus y cols., 2008) e inflamación a través de la desacetilación de proteínas como NF- κ B (Yeung y cols., 2004). En este sentido, en los últimos años muchos autores han considerado que descensos en los niveles de expresión de SIRT1 o la inhibición de su actividad podrían contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento (Qin y cols., 2006; Jiang y cols., 2012; Herkovist y cols., 2013). En este apartado se estudiaron los niveles de inmunoreactividad de la proteína SIRT1 de 110 kDa en hipocampo, cuerpo estriado, corteza frontal y corteza parietal, durante el envejecimiento y tras el tratamiento con resveratrol en ratas viejas.

Se estudiaron en primer lugar los niveles de inmunoreactividad de SIRT1 en el hipocampo, donde se observó en las ratas viejas una reducción de un 35 % de SIRT1 respecto las jóvenes, indicando que el envejecimiento provoca un descenso en los niveles de SIRT1 (**Figura 67A**). El tratamiento con resveratrol parece revertir esta tendencia; así los niveles de SIRT1 en las ratas viejas tratadas con resveratrol fueron similares a los de las ratas jóvenes (90 %) (**Figura 67A**).

Al analizar los niveles de SIRT1 comprobamos que en las membranas de *western blot* aparecían dos bandas inmunoreactivas una a 110 kDa que corresponde a la proteína SIRT1 nativa y otra a 75 kDa que se veía modulada por las distintas condiciones experimentales. Se ha descrito en condrocitos articulares humanos que tras la exposición a factores de estrés, como pueden ser las citoquinas inflamatorias TNF- α o IL-1 β , se produce la fragmentación proteolítica de SIRT1 dando lugar a la formación de un fragmento inactivo de 75 kDa que se mantiene estable (Dvir-Ginzberg y cols., 2011). Hemos podido comprobar que en hipocampo el envejecimiento también provoca una reducción de un 14 % de los niveles del fragmento de 75 kDa (**Figura 67B**). La proporción entre la inmunoreactividad del fragmento de 75 kDa y la proteína nativa de 110 kDa (índice de fragmentación), es mayor en las ratas viejas que en las jóvenes (**Figura 68**). Por otra parte, el tratamiento crónico con resveratrol revierte los efectos del envejecimiento también sobre los valores de inmunoreactividad del fragmento de 75 kDa, que son similares a los de las ratas jóvenes (103 %) (**Figura 67B**). Por lo que el índice de fragmentación de SIRT1 tras el tratamiento con resveratrol desciende hasta valores próximos a los de las ratas jóvenes (**Figura 68**).

Estos resultados indican que en las ratas viejas se produce una disminución sustancial de SIRT1, que además va acompañada de mayor índice de fragmentación. Lo que podría estar relacionado con el aumento del estado proinflamatorio de las ratas viejas. Además, el resveratrol que ha

demostrado su efectividad en la restauración de los déficits cognitivos asociados con la edad, restaura los niveles de SIRT1 en ratas viejas (**Figura 67A**) y reduce significativamente el índice de fragmentación (**Figura 68**).

Hipocampo

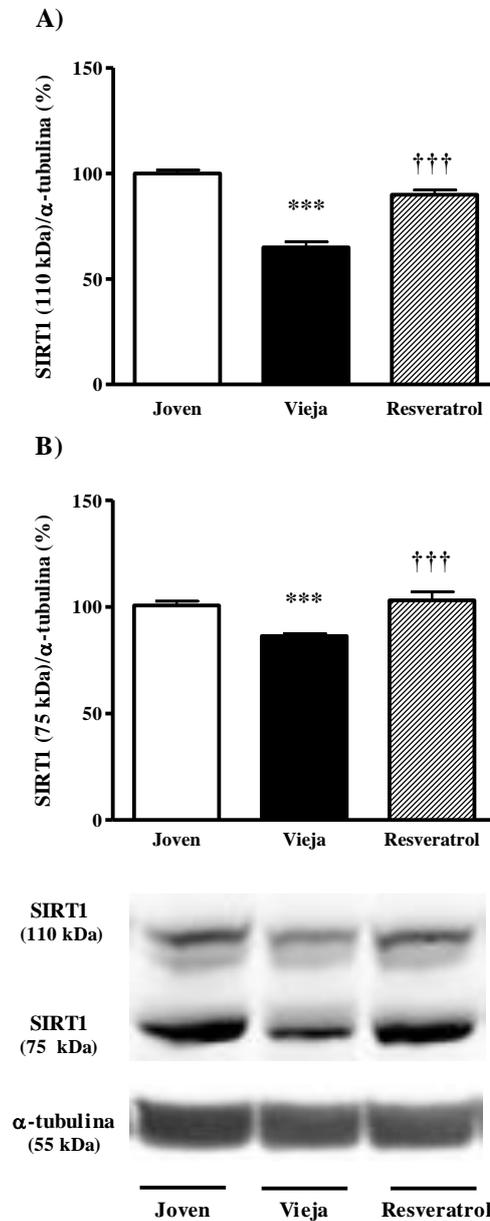


Figura 67. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p., n=6, 30 días) en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad en hipocampo de rata de: **A)** SIRT1 (110 kDa) y **B)** el fragmento de 75 kDa de SIRT1. Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (20 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje de las ratas jóvenes. Las proteínas SIRT1 (110 kDa y 75 kDa) y α -tubulina se analizaron en las mismas membranas para cada muestra. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls, que detectó diferencias significativas en SIRT1 ($F(2, 20) = 78,72$, $p < 0,0001$) y en el fragmento de 75 kDa ($F(2, 20) = 13,39$, $p = 0,0004$). *** $p \leq 0,001$ comparando con ratas jóvenes control; ††† $p \leq 0,001$ comparando con ratas viejas control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de cada proteína en los distintos grupos experimentales (30 μ g de proteína cargada).

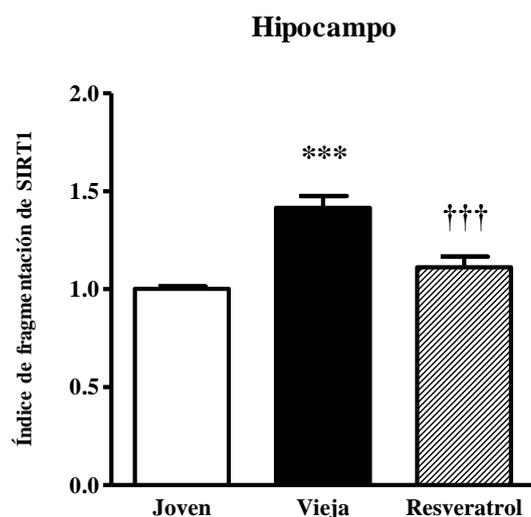


Figura 68. Índice de fragmentación de la proteína SIRT1 de 110 kDa en el fragmento de 75 kDa en hipocampo de ratas jóvenes, viejas y viejas tratadas con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p., n=6, 30 días). Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (20 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan en relación a las ratas jóvenes control. Se utilizaron las mismas membranas con un anticuerpo específico que detecta ambas formas de SIRT1. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls, que detectó diferencias significativas ($F(2, 20)=28,31, p<0,0001$): *** $p\leq 0,001$ comparando con ratas jóvenes control; ††† $p\leq 0,001$ comparando con ratas viejas control.

Tras observar que el envejecimiento provoca cambios significativos en los niveles de la proteína SIRT1 (110 kDa y 75 kDa) en una región especializada en procesos cognitivos como es el hipocampo, y que el tratamiento con resveratrol revierte estas diferencias; decidimos estudiar si este fenómeno ocurre de forma generalizada en todo el cerebro o se trataba de un efecto exclusivo del hipocampo. Por este motivo se analizaron otras regiones que junto con el hipocampo participan en diferentes procesos cognitivos, como son: el cuerpo estriado que está implicado en el aprendizaje y la memoria, y la corteza frontal que es importante en la integración de información y ejecución de la conducta. Además, se estudió la corteza parietal para poder comparar los resultados de las regiones anteriores con los de una región menos implicada en la regulación de los procesos cognitivos.

El envejecimiento también reduce los niveles de SIRT1 en el estriado (47 %) (**Figura 69A**) y en la corteza frontal (29 %) (**Figura 69C**), respecto ratas jóvenes. El tratamiento con resveratrol contrarresta el efecto de la edad, ya que favorece la recuperación de los niveles de SIRT1 en estriado (78 %) (**Figura 69A**) y en corteza frontal (90 %) (**Figura 69C**), también respecto los animales jóvenes.

Además, se observa una reducción del fragmento de 75 kDa de SIRT1 debido al envejecimiento en estriado (22 %) (**Figura 69B**) y corteza frontal (11 %) (**Figura 69D**), respecto ratas jóvenes. Estos descensos son revertidos tras el tratamiento con resveratrol en estriado (114 %) (**Figura**

69B), en corteza frontal (96 %) (**Figura 69D**). En el estriado y en la corteza frontal la proporción del fragmento de 75 kDa respecto a la forma completa de 110 kDa, aumenta en las ratas viejas y disminuye tras el tratamiento con resveratrol (**Figura 70A y B**). Lo que está en consonancia con los resultados obtenidos en el hipocampo. Por otra parte, en la corteza parietal no se observaron cambios significativos en la inmunoreactividad de SIRT1, ni en la forma nativa de 110 kDa ni en el fragmento de 75 kDa (**Figura 69E y F**).

Estos resultados muestran, en primer lugar, una reducción importante de SIRT1 asociada al envejecimiento en regiones cerebrales relevantes para los procesos cognitivos. En segundo lugar, que esta reducción va acompañada de un incremento en el índice de fragmentación de esta proteína. Y en tercer lugar que el resveratrol resulta eficaz para revertir estos efectos en las mismas regiones cerebrales responsables del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento.

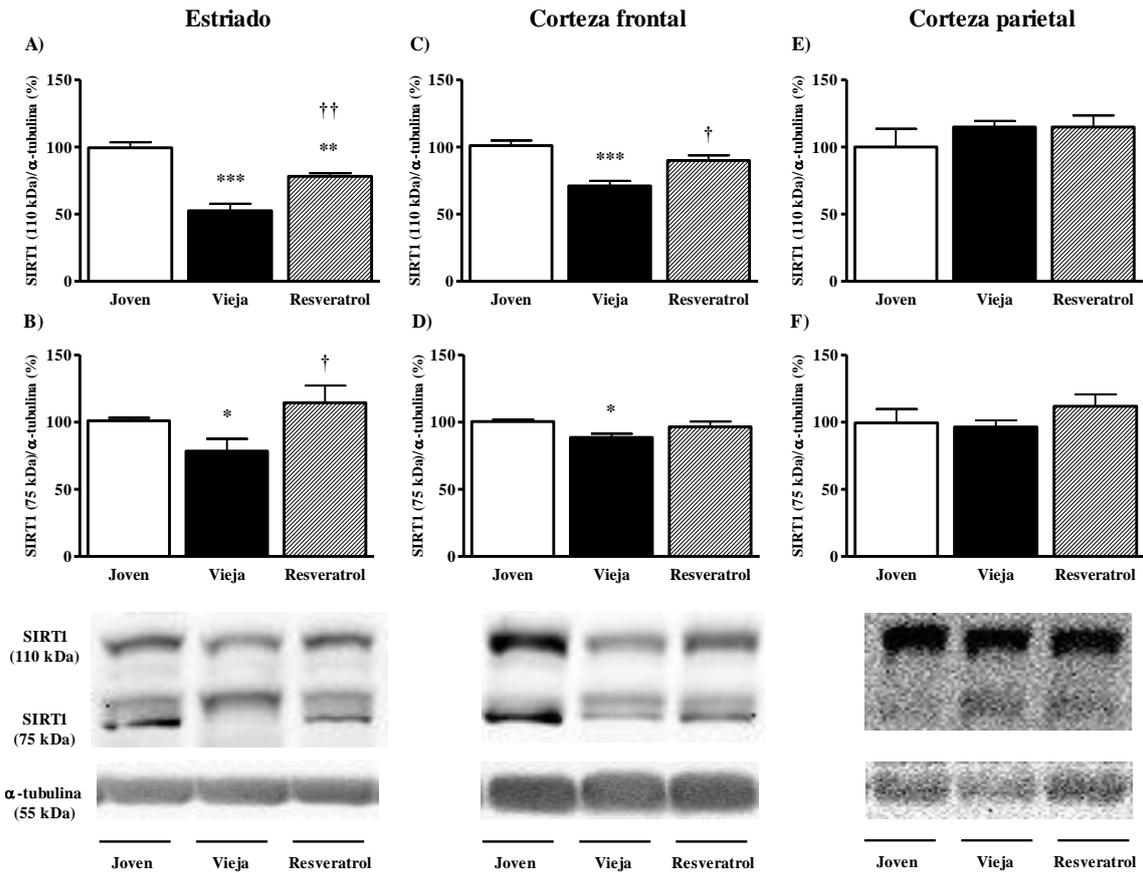


Figura 69. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p., n=6, 30 días) en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de: **A)** SIRT1 (110 kDa) y **B)** SIRT1 (75 kDa) en estriado; **C)** SIRT1 (110 kDa) y **D)** SIRT1 (75 kDa) en corteza frontal; y **E)** SIRT1 (110 kDa) y **F)** SIRT1 (75 kDa) en corteza parietal. Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (20 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje de las ratas jóvenes control. Las proteínas SIRT1 (110 kDa y 75 kDa) y α -tubulina se analizaron en las mismas membranas para cada muestra. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls, que detectó diferencias significativas en estriado (110 kDa: $F(2, 20)=25,33$, $p<0,0001$; 75 kDa: $F(2, 20)=6,176$, $p=0,0130$), y en corteza frontal (110 kDa: $F(2, 20)=13$, $p=0,0008$; 75 kDa: $F(2, 20)=5,38$, $p=0,0173$). * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$ comparando con las ratas jóvenes control, y † $p\leq 0,05$; †† $p\leq 0,01$ comparando con las ratas viejas control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de cada proteína en los distintos grupos experimentales (30 μ g de proteína cargada).

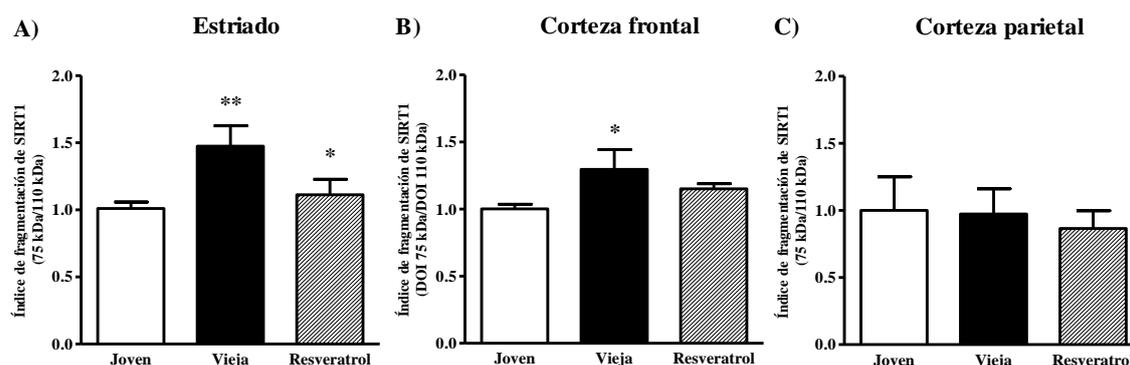


Figura 70. Índice de fragmentación de la proteína SIRT1 de 110 kDa en el fragmento de 75 kDa, en estriado (A), corteza frontal (B) y corteza parietal (C) de ratas jóvenes, viejas y viejas tratadas con resveratrol (20 mg/kg/día, i.p., n=6, 30 días). Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (20 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan en relación a las ratas jóvenes control. Se utilizaron las mismas membranas con un anticuerpo específico que detecta ambas formas de SIRT1. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls, que detectó diferencias significativas en estriado ($F(2, 20)=6,38$, $p=0,01$) y corteza frontal ($F(2, 20)=4,96$, $p=0,02$): * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$ comparando con ratas jóvenes control.

4.4.4 Efecto del tratamiento crónico con silimarina, quercetina y naringenina en hipocampo de ratas viejas sobre la enzima desacetilasa SIRT1

Después de haber comprobado que el tratamiento con resveratrol revierte los efectos del envejecimiento sobre los niveles de SIRT1 en regiones especializadas en procesos cognitivos, decidimos analizar si los tratamientos con otros polifenoles producen los mismos efectos. Y así determinar si este fenotipo es debido al carácter polifenólico del resveratrol (**Figura 71**).

Los resultados que presentamos a continuación corroboran que el envejecimiento tiene el efecto de disminuir los niveles de inmunoreactividad de SIRT1 en hipocampo. Ya que tras el análisis de otros grupos de ratas viejas, constatamos descensos en los niveles de SIRT1 comprendidos entre un 28 % a 43 % (**Figura 71A, C y E**) y de un 12,7 % del fragmento de 75 kDa (**Figura 71B, D y F**), respecto las ratas jóvenes, siendo la proporción entre el fragmento de 75 kDa y la proteína completa (110 kDa) mayor en ratas viejas (**Figura 72**).

Por otro lado, se puede observar como también el tratamiento con silimarina revierte los efectos de la edad, aumentando hasta un 77 % los niveles de SIRT1 (110 kDa) (**Figura 71A**), y consiguiendo que los niveles del fragmento de 75 kDa fueran similares a los de ratas jóvenes control (**Figura 71B**). Por tanto, la proporción entre ambas formas de SIRT1 en los animales tratados con silimarina es similar a la que se observa en las ratas jóvenes (**Figura 72A**). Estos resultados parecen indicar que la silimarina tiene un efecto beneficioso en la recuperación de los niveles de SIRT1 durante el envejecimiento en el hipocampo similar al resveratrol.

El tratamiento con quercetina también tiene un efecto protector en el hipocampo de ratas viejas conservando los niveles de esta proteína en valores próximos a los que presentan las ratas jóvenes (**Figura 71C**). También incrementa los niveles del fragmento de 75 kDa hasta un 115 % respecto a los animales jóvenes (**Figura 71D**). En este caso la proporción entre el fragmento de 75 kDa y la forma nativa de la proteína SIRT1 aumenta debido al envejecimiento, y se ve reducida tras el tratamiento con quercetina, llegando a valores próximos a los de las ratas jóvenes (**Figura 72B**).

El último polifenol que hemos estudiado ha sido la naringenina, que de forma similar a los otros polifenoles revierte el efecto del envejecimiento, restaurando hasta un 92,76 % los niveles de SIRT1 110 kDa en ratas viejas (**Figura 71E**) y hasta un 112,96 % el fragmento de 75 kDa, respecto ratas jóvenes (**Figura 71F**). En cuanto a la proporción del fragmento de 75 kDa respecto a la forma completa de la proteína SIRT1 110 kDa, observamos los mismos efectos que los descritos en los casos anteriores. Es decir, el envejecimiento aumenta esta proporción demostrando un estado proinflamatorio en hipocampo, que es revertido tras el tratamiento con naringenina (**Figura 72C**).

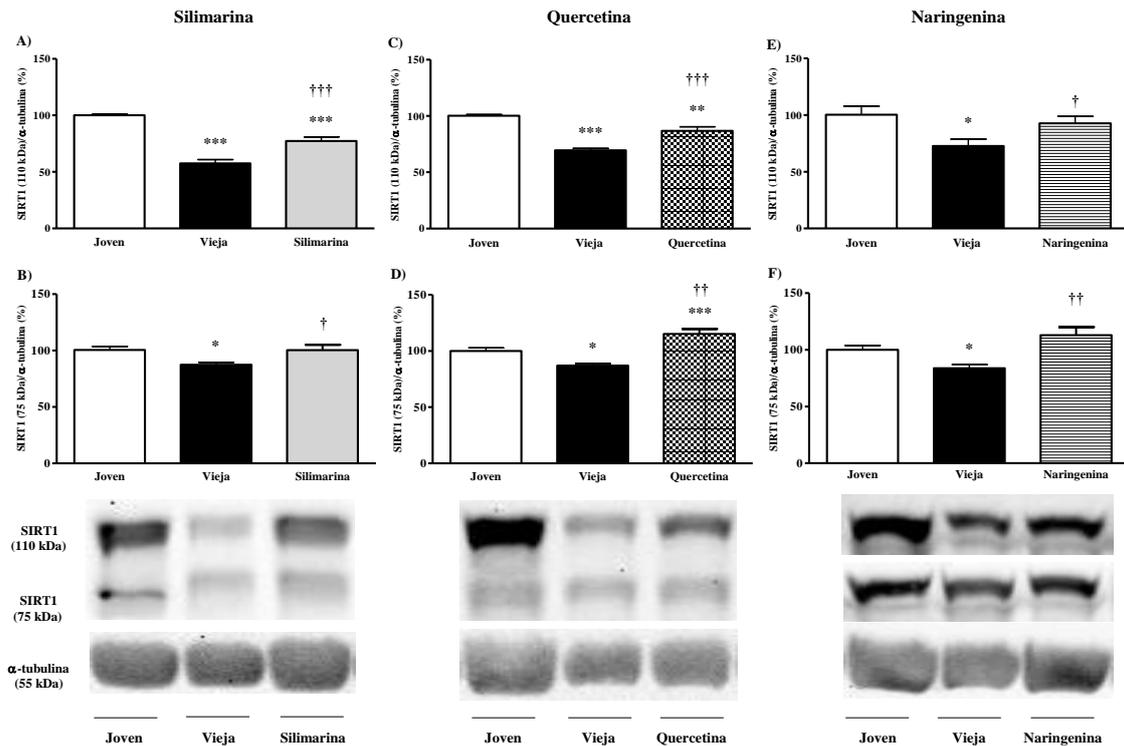


Figura 71. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con silimarina (n=5) (A, B), quercetina (n=7) (C, D) y naringenina (n=6) (E, F) (20 mg/kg/día, i.p., n=5, 30 días) en ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de SIRT1 (110 kDa) y su fragmento de 75 kDa en hipocampo. Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (18 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes control. Se utilizaron las mismas membranas re-bloteadas para la comparación de SIRT1 y α -tubulina. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls, que detectó diferencias significativas entre los grupos de animales jóvenes, viejos y tratados con silimarina (110 kDa: $F(2, 19)=57,17$, $p<0,0001$; 75 kDa: $F(2, 19)=5,64$, $p=0,016$), quercetina (110 kDa: $F(2, 21)=28,19$, $p<0,0001$; 75 kDa: $F(2, 21)=17,43$, $p=0,0001$) y naringenina ($F(2, 20)=4,77$, $p=0,024$; $F(2, 20)=9,45$, $p=0,0025$): * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$ comparando con las ratas jóvenes control, y † $p\leq 0,05$; †† $p\leq 0,01$; ††† $p\leq 0,001$ comparando con las ratas viejas control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de la inmunodensidad de la proteína SIRT1 de 110 kDa, de su fragmento de 75 kDa, y de la proteína α -tubulina en cada uno de los grupos experimentales (30 μ g de proteína cargada).

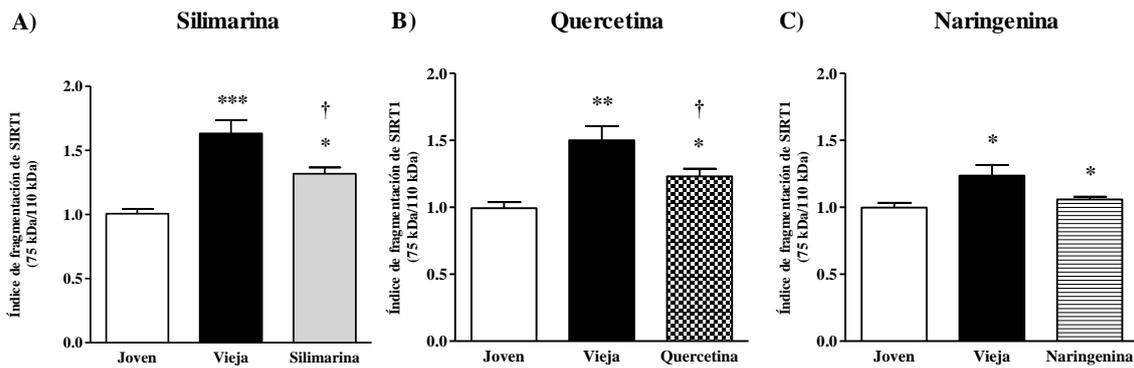


Figura 72. Índice de fragmentación de la proteína SIRT1 de 110 kDa en el fragmento de 75 kDa en hipocampo de ratas jóvenes, viejas y viejas tratadas de forma crónica con silimarina (n=5) (A), quercetina (n=7) (B), y naringenina (n=6) (C) (20 mg/kg/día, i.p., 30 días). Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (20 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan en relación a las ratas jóvenes control. Se analizaron la forma nativa de SIRT1 110 kDa y su fragmento de 75 kDa en las mismas membranas con un anticuerpo específico que detecta ambas formas. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls, que detectó diferencias significativas entre los grupos de animales jóvenes, viejos y tratados con silimarina ($F(2, 19)=19,21, p<0,0001$), quercetina ($F(2, 21)=10,30, p<0,0015$) y naringenina ($F(2, 20)=5,71, p=0,01$): * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$ comparando con ratas jóvenes control; † $p\leq 0,05$ comparando con ratas viejas control.

Por tanto en este apartado comprobamos que el envejecimiento en el hipocampo disminuye entre un 28 y un 48 % los niveles de SIRT1, y entre un 13 % y 16 % los de su fragmento de 75 kDa. Siendo la proporción entre 75 kDa y 110 kDa mayor en ratas viejas, lo que sugiere que el envejecimiento genera un estado proinflamatorio que activa la fragmentación de la proteína SIRT1. En este sentido, los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina revierten los efectos del envejecimiento, conservando la forma nativa de SIRT1, y evitando su fragmentación.

4.4.5 Efecto del tratamiento crónico con silimarina, quercetina y naringenina sobre la acetilación de la proteína NF- κ B en hipocampo de ratas viejas

Una vez comprobado que otros polifenoles inducen efectos similares al resveratrol sobre los niveles de SIRT1 en el envejecimiento, así como que este efecto del resveratrol sobre SIRT1 y del envejecimiento en si, se correlaciona con cambios en los niveles de la forma acetilada de la proteína NF- κ B, nos planteamos analizar si estos otros polifenoles modulan de forma similar la actividad de NF- κ B. Por este motivo estudiamos los niveles totales de inmunoreactividad de la proteína NF- κ B (65 kDa) y cuando está acetilada en la lisina 310 de RelA/p65 (NF- κ B acetilada), en el hipocampo de ratas jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y viejas tratadas con silimarina, quercetina y naringenina (20 mg/kg/día, i.p, 30 días).

Comprobamos en el hipocampo de otros grupos de animales los mismos efectos que en el apartado 4.4.2.2 para la forma acetilada y total de NF- κ B. El envejecimiento provoca un aumento de los niveles de inmunoreactividad de NF- κ B acetilada, que oscila entre un 14 % (**Figura 73A y G**) y 18 % (**Figura 73D**), y no parece afectar los niveles totales de la proteína NF- κ B (**Figura 73B, E y H**). Aumentando la proporción de los niveles de acetilación de NF- κ B respecto los niveles totales de la proteína (**Figura 73C, F y I**).

Una vez corroborados los efectos del envejecimiento sobre NF- κ B estudiamos qué ocurre tras los tratamientos crónicos con polifenoles sobre esta proteína. Se observó que en ratas viejas estos tratamientos reducen de forma significativa los niveles de acetilación de la proteína NF- κ B reduciéndolo a valores similares a los de ratas jóvenes control (73,77 %, 80,85 % y 57,95 % en los tratamientos con silimarina, quercetina y naringenina respectivamente) (**Figura 73A, G y D**). Por tanto, los tratamientos no solo revierten el incremento de la forma acetilada provocado por el envejecimiento, sino que además reduce sus niveles por debajo de los niveles de las ratas jóvenes. De todos modos, este fenómeno se ve acompañando con una reducción en los niveles totales de la proteína NF- κ B respecto a ratas jóvenes y viejas, de un 37,38 % y 24,55 % tras el tratamiento con silimarina (**Figura 73B**), de un 36,84 % y 33,98 % con quercetina (**Figura 73E**) y de un 49,72 % y 43,96 % con naringenina (**Figura 73H**). Con lo que la reducción observada en los niveles de NF- κ B acetilado es principalmente debido a una reducción en la expresión de la proteína total provocada por el tratamiento con polifenoles y no a un cambio en la proporción de proteína acetilada (**Figura 73C, F y I**). Tampoco se puede descartar que la reducción observada en los niveles totales de NF- κ B se deba a un efecto de degradación de NF- κ B por parte de los polifenoles.

Estos resultados en conjunto sugieren que el envejecimiento provoca un aumentando del estado proinflamatorio en el hipocampo, incrementando la acetilación de NF- κ B, al menos en la lisina 310 de la subunidad p65. Sin embargo, los tratamientos con polifenoles parecen contrarrestar estos efectos del envejecimiento sobre la vía de señalización de NF- κ B, reduciendo el fenotipo proinflamatorio en ratas viejas mediante la disminución de los niveles totales de NF- κ B.

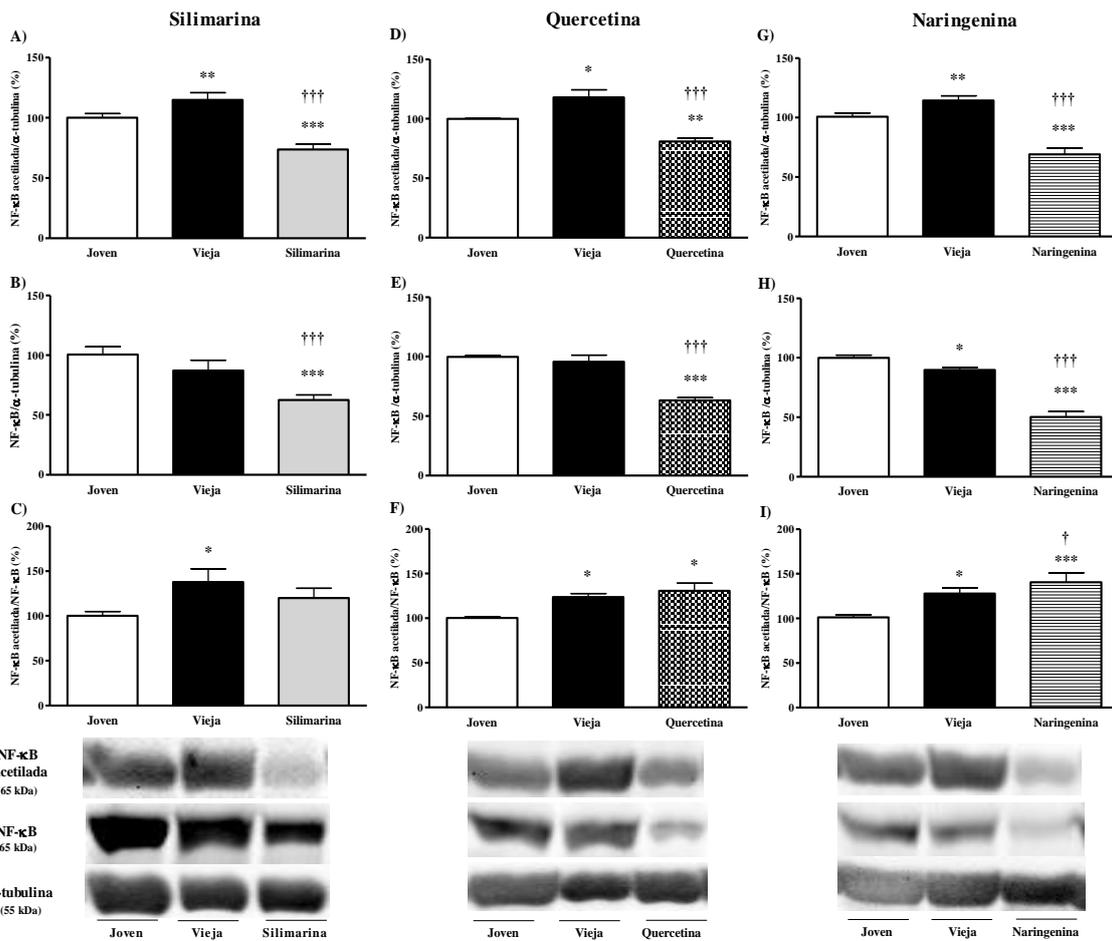


Figura 73. Efectos del envejecimiento y del tratamiento crónico con silimarina (n=5) (A, B, C), quercetina (n=7) (D, E, F) y naringenina (n=6) (G, H, I) (20 mg/kg/día, i.p., n=5, 30 días) en hipocampo de ratas viejas sobre los niveles de inmunodensidad de NF-κB acetilada, NF-κB total, y la relación entre ambas formas. Se utilizaron como controles animales jóvenes (3 meses, n=8) y viejos (18 meses, n=6) a los que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p., 30 días). Las barras representan la media ± error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes control. Se utilizaron las mismas membranas re-bloteadas para la comparación de la forma acetilada y total de cada proteína, así como para la α-tubulina. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls que detectó diferencias significativas en silimarina: A) $F(2, 19)=17,62, p=0,0002$, B) $F(2, 19)=7,2, p=0,0071$, C) $F(2, 19)=3,09, p=0,047$; quercetina D) $F(2, 21)=21,26, p<0,0001$, E) $F(2, 21)=29,53, p<0,0001$, F) $F(2, 21)=6,72, p=0,009$; y naringenina G) $F(2, 20)=59,77, p<0,0001$, H) $F(2, 20)=66,81, p<0,0001$, I) $F(2, 20)=3,74, p=0,04$. * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$ comparando con las ratas jóvenes control, y † $p\leq 0,05$; ††† $p\leq 0,001$ comparando con las ratas viejas control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de la inmunodensidad de NF-κB acetilada, NF-κB y de la proteína α-tubulina en cada uno de los grupos experimentales (30 μg de proteína cargada).

4.4.6 Correlación entre los niveles de las proteínas SIRT1 y NF- κ B durante el envejecimiento y tras los tratamientos con polifenoles

En los resultados presentados anteriormente se observa que los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina parecen ejercer parte de sus propiedades antienvjecimiento a través de la modulación de la proteína SIRT1 y de la vía de señalización de NF- κ B, en regiones cerebrales claves para la funcionalidad de los procesos cognitivos, como el hipocampo. Así, se consideró interesante ver si existe una correlación entre los niveles de estas proteínas. Para ello se analizó de forma conjunta todos los tratamientos realizados en ratas viejas, comparándolo con las ratas jóvenes y viejas control.

Al analizar de forma conjunta todos los grupos de animales jóvenes y viejos, se comprobó que el envejecimiento reduce los niveles de SIRT1 en un 35 % (**Figura 74A**), acompañado de un descenso de un 14 % del fragmento de 75 kDa (**Figura 74B**), respecto las ratas jóvenes. Al respecto, los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina comparten la capacidad de revertir los efectos del envejecimiento, a través de la recuperación del descenso de SIRT1 (110 kDa) y de su fragmento de 75 kDa. De esta forma las ratas viejas tratadas con polifenoles vuelvan a tener cantidades similares de SIRT1 (110 kDa y 75 kDa) a los que presentan las ratas jóvenes control (110 kDa y 75 kDa: 77 % y 100 % en silimarina, 86 % y 115 % en quercetina, 93 % y 113 % en naringenina, 90 % y 103 % en resveratrol, respectivamente). Aunque se observa una ligera variabilidad entre el efecto de los diferentes tratamientos, no hay diferencias significativas entre ellos, por lo que el grado de efectividad parece ser similar en todos los tratamientos.

Hipocampo

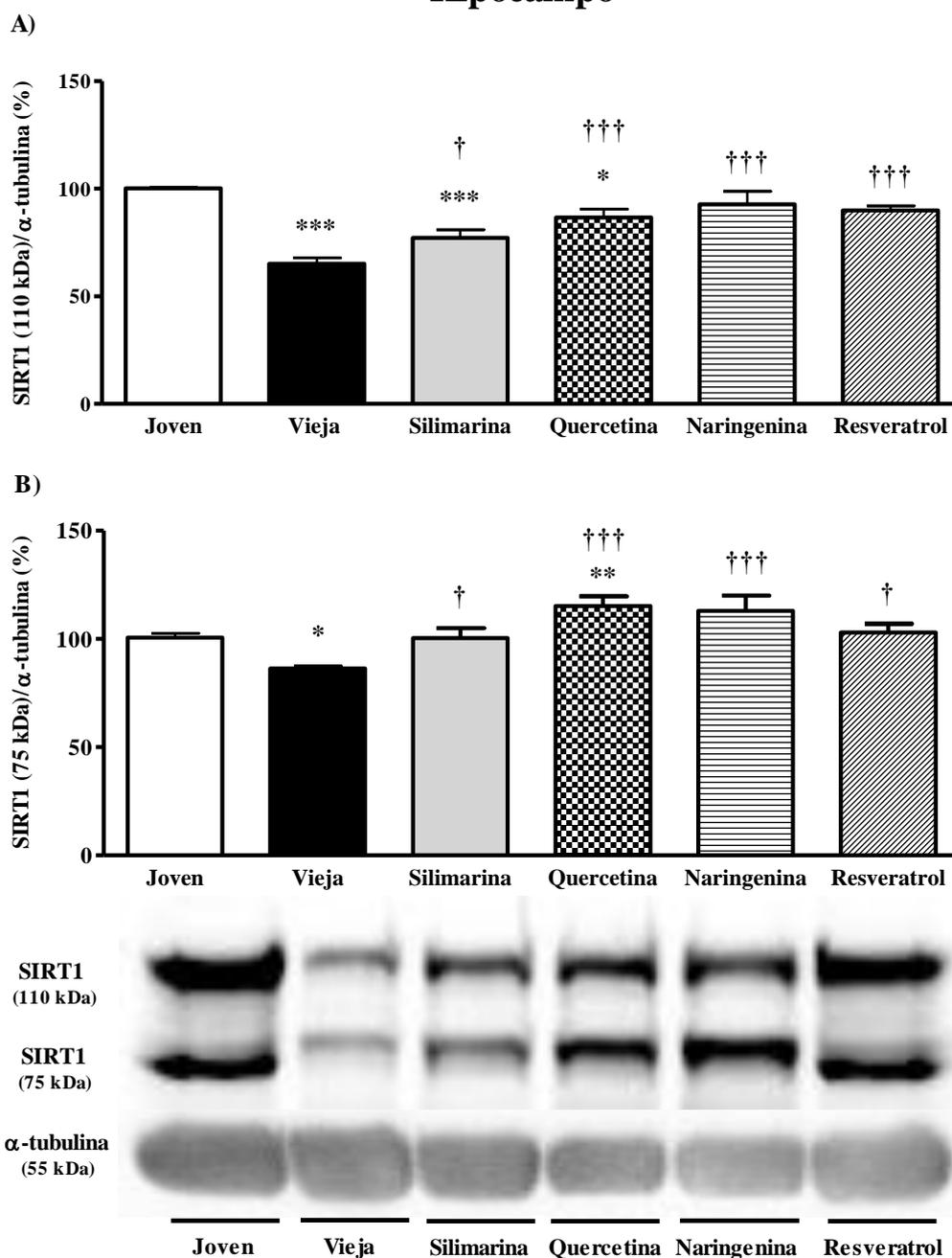


Figura 74. Efectos del envejecimiento y de los tratamientos crónicos con silimarina (n=5), quercetina (n=7), naringenina (n=6) y resveratrol (n=6) (20 mg/kg/día, i.p, 30 días) en hipocampo de ratas viejas sobre la inmunoreactividad de: **A)** SIRT1 (110 kDa) y **B)** SIRT1 (75 kDa), en comparación con ratas jóvenes (3 meses, n=8) y viejas (18-20 meses, n=6) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p, 30 días). Las barras representan la media ± error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes control. Se utilizaron las mismas membranas para la comparación de la proteína SIRT1 (110 kDa y 75 kDa) y su re-blot para α-tubulina. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls, que detectó diferencias significativas en: SIRT1 110 kDa: $F(5, 38)=13,46, p<0,0001$ y 75 kDa: $F(5, 38)=6,89, p=0,0002$. * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$ comparando con las ratas jóvenes control, y † $p\leq 0,05$; †† $p\leq 0,001$ comparando con las ratas viejas control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de la inmunodensidad de SIRT1 (110 kDa), del fragmento de 75 kDa y de la proteína α-tubulina en los distintos grupos experimentales (30 µg de proteína cargada).

La proteína SIRT1 es una enzima desacetilasa de histonas y otras proteínas no histonas, entre sus dianas de desacetilación se encuentra NF- κ B. Siendo la vía de señalización de NF- κ B clave para el desarrollo de los procesos inflamatorios. Por este motivo hemos estudiado si esta vía de señalización puede estar afectada por los cambios que ocurren en SIRT1 durante el envejecimiento y tras los tratamientos con polifenoles.

Al recopilar todos los datos del estudio de la vía de señalización de NF- κ B en el hipocampo de ratas, se observó que el envejecimiento aumentó los niveles de acetilación de NF- κ B (16 %), respecto a ratas jóvenes (**Figura 75A**). Sin embargo, el envejecimiento no provocó alteraciones en los niveles totales de NF- κ B (**Figura 75B**). Por otro lado, los tratamientos con polifenoles inhibieron la acetilación de NF- κ B, que desciende hasta un 74 %, 81 %, 58 %, 92 %, en silimarina, quercetina, naringenina y resveratrol, respectivamente, respecto a las ratas jóvenes. El tratamiento con resveratrol fue el que provocó un efecto menor, en cambio el tratamiento con naringenina fue el más efectivo (**Figura 75A**). A diferencia de lo que ocurre durante el envejecimiento, los tratamientos con polifenoles también provocan un descenso en los niveles totales de NF- κ B (37,38 % en silimarina, 36,88 % en quercetina, 51,28 % en naringenina, y un 14,59 % en resveratrol) (**Figura 75B**).

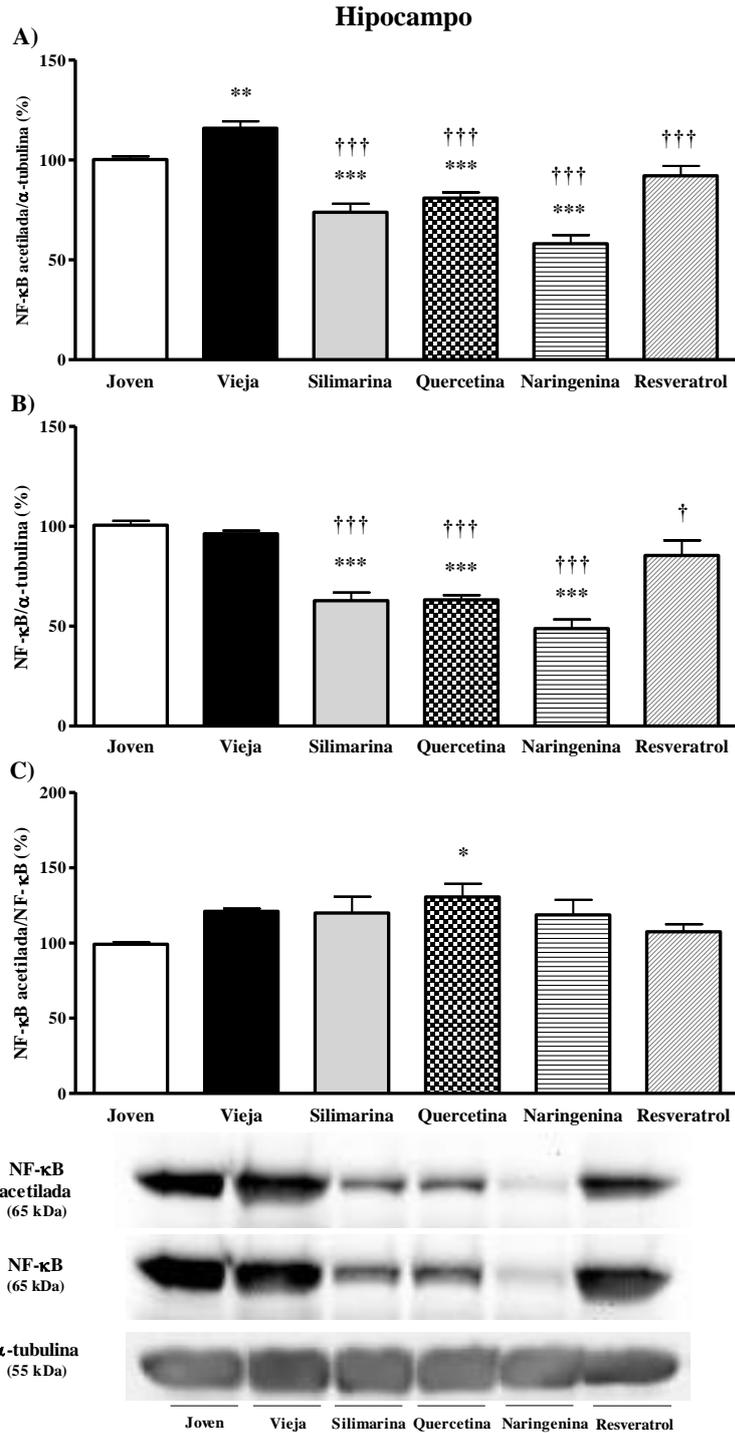


Figura 75. Efectos del envejecimiento y de los tratamientos crónicos con silimarina (n=5), quercetina (n=7), naringenina (n=6) y resveratrol (n=6) (20 mg/kg/día, i.p,30 días) en hipocampo de ratas viejas sobre la inmunoreactividad de: **A)** NF-κB acetilada, **B)** NF-κB, **C)** NF-κB acetilada respecto NF-κB, en comparación con ratas jóvenes (3 meses, n=8) y viejas (18-20 meses, n=6) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p, 30 días). Las barras representan la media ± error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes control. Se utilizaron las mismas membranas re-bloteadas para la comparación de la forma acetilada y total de NF-κB, así como para la α-tubulina. Para el análisis estadístico se utilizó one-way ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls que detectó diferencias significativas en: NF-κB acetilada F(5, 38)=32,40, p<0,0001, NF-κB total F(5, 38)=2,68, p=0,041). *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001 comparando con las ratas jóvenes control, y †††p≤0,001 comparando con las ratas viejas control. En la parte inferior de las gráficas se encuentra un inmunoblot representativo de la inmunodensidad de NF-κB acetilada, NF-κB y la proteína α-tubulina en los distintos grupos experimentales (30 μg de proteína cargada).

La actividad transcripcional de NF- κ B puede regularse modificando entre otros mecanismos los niveles de acetilación de la proteína y/o sus niveles totales, que son dos factores que están relacionados. Por ello se estudió la correlación entre los niveles totales y acetilados de NF- κ B, en ratas tratadas con los diversos polifenoles y se comparan con los de las ratas jóvenes y viejas control (**Figura 76**). Al respecto, de forma muy interesante se observó que todos los tratamientos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina en ratas viejas modulan claramente los niveles totales y acetilados de NF- κ B, observándose una buena correlación entre ambas. Se mantiene la misma proporción entre la forma total y acetilada de NF- κ B que en las ratas jóvenes, por lo que se observa que tras los tratamientos con polifenoles existe una correlación lineal con los resultados de las ratas jóvenes.

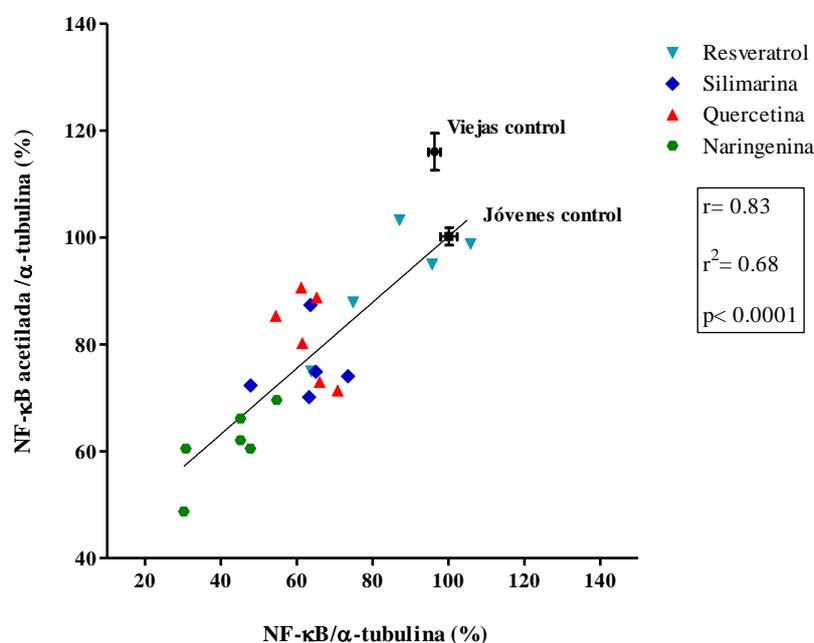


Figura 76. Correlación entre los niveles totales y acetilados de NF- κ B en hipocampo de ratas viejas (18-20 meses) tratadas con resveratrol (n=5), silimarina (n=5), quercetina (n=6), y naringenina (n=6) (20 mg/kg/día, i.p, 30 días) en comparación con ratas control jóvenes (3 meses, n=8) y viejas (18-20 meses, n=6) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p, 30 día).

Como se ha observado en otros estudios la proteína SIRT1 desacetila la subunidad RelA/p65 de NF- κ B (Yeung y cols., 2004; Kwon y cols., 2008). Por lo que una vez comprobados los efectos de los polifenoles en SIRT1 y en la vía de señalización de NF- κ B, estudiamos la correlación entre SIRT1 y los niveles totales y acetilados de NF- κ B (**Figura 77**). Los resultados de este estudio indican que existe una correlación inversa entre los niveles de SIRT1 (110 kDa) y los niveles acetilados (**Figura 77A**) y totales (**Figura 77B**) de NF- κ B. De forma que el aumento de la inmunoreactividad de SIRT1 en las ratas tratadas con polifenoles está acompañado de la

disminución de la inmunoreactividad de NF-κB acetilada y NF-κB total. Sugiriendo que parte de los mecanismos de acción de los tratamientos con polifenoles podrían estar mediados por SIRT1, que parece modular de forma directa o indirecta la vía de señalización de NF-κB, por medio de reducir tanto los niveles totales de la proteína como su acetilación, que como hemos demostrado son dos factores directamente relacionados (**Figura 76**).

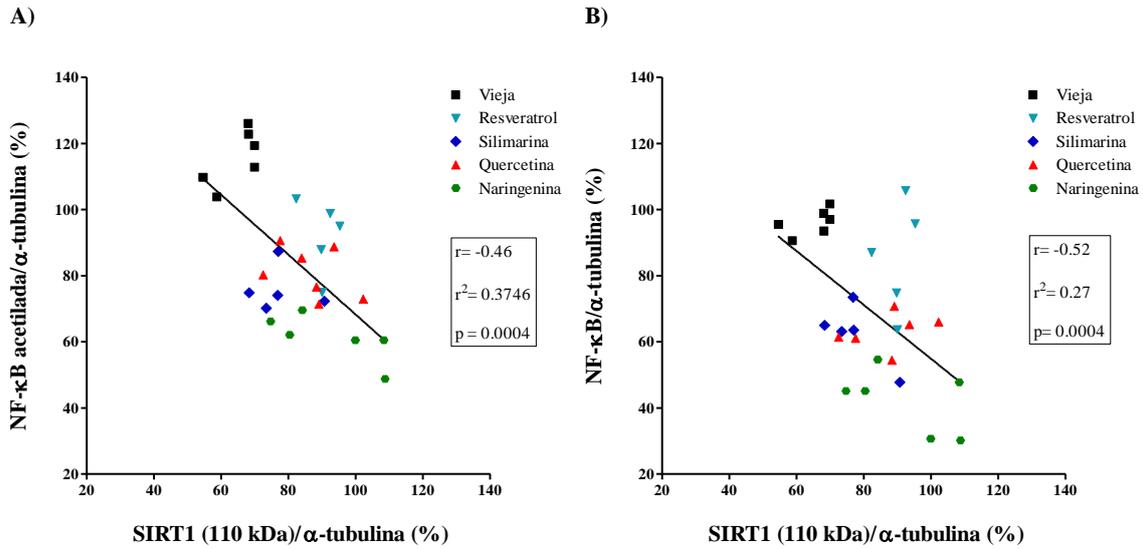


Figura 77. Correlación entre los niveles de inmunoreactividad de SIRT1 (110 kDa) y **A)** NF-κB acetilada, **B)** NF-κB total en hipocampo de ratas viejas (18-20 meses) tratadas con resveratrol (n=5), silimarina (n=5), quercetina (n=6), y naringenina (n=6) (20 mg/kg/día, i.p, 30 días), en comparación con ratas control jóvenes (3 meses, n=8) y viejas (18-20 meses, n=6) a las que se les administró aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p, 30 días).

5. DISCUSIÓN

A lo largo de la historia, el envejecimiento siempre ha sido un tema de interés para la humanidad. Sin embargo, los mayores avances científicos en el estudio de este proceso han ocurrido en las últimas décadas. Algo que se debe en parte al desarrollo de la medicina y la tecnología, que ha favorecido un incremento de la proporción de población longeva a nivel mundial (*World Population Prospects: The 2012 Revision*). Este contexto demográfico ha generado la necesidad de comprender mejor los cambios que ocurren durante el envejecimiento, así como de encontrar estrategias encaminadas a prevenir, atenuar o retrasar sus consecuencias.

El envejecimiento es un fenómeno común en todos los organismos que se caracteriza por un progresivo deterioro en diferentes funciones y sistemas (López-Otín y cols., 2013). Entre sus múltiples causas se encuentran la acumulación de daño oxidativo durante el metabolismo normal (Harman, 1956) y el exceso o desregulación de los procesos de inflamación (Salminen y cols., 2008 a y b). Durante el envejecimiento, el cerebro es una de las estructuras más sensibles al daño oxidativo. Los motivos son un consumo más elevado de oxígeno que otros tejidos en la respiración mitocondrial (Queen y cols., 2010), acompañado de un descenso en la funcionalidad de los sistemas antioxidantes endógenos (Sohal, 1990 a y b; Coyle, 1993; Reiter, 2001; Keller y cols., 2005; Mariani, 2005; Freeman, 2012, Venkataraman y cols., 2013). Con la finalidad de encontrar tratamientos frente a estos cambios, se han realizado estudios epidemiológicos que indican que el consumo de dietas ricas en antioxidantes puede ser una estrategia para reducir el estrés oxidativo, a través de compensar el descenso de defensas antioxidantes (Queen y cols., 2010; Ogle y cols., 2013). Entre los antioxidantes presentes en la dieta, se encuentran los polifenoles (Chung y cols., 2010, Jayasena y cols., 2013). Existen más de 10.000 compuestos polifenólicos (Shakibaei y cols., 2009), algunos de los cuales se ha descrito que tienen propiedades antioxidante y antiinflamatorias a nivel cerebral. Además, otra característica beneficiosa es que son moléculas lipofílicas, lo que les permite cruzar la BBB llegando al SNC (Youdim y cols., 2004; Pandey y Rizvi, 2009). Las propiedades de los polifenoles han sido estudiadas *in vitro* y en modelos *in vivo* de diversas patologías neurodegenerativas. Sin embargo, pocos estudios se han realizado en animales viejos sanos, por lo que se desconocen sus efectos *in vivo* durante el envejecimiento normal.

A partir de estas bases, el objetivo general de este trabajo fue estudiar si determinados polifenoles, como son el resveratrol, la silimarina, la quercetina y la naringenina, podrían generar efectos beneficiosos a nivel cerebral, actuando en los cambios que ocurren en el envejecimiento normal de ratas. Para ello se estudió el efecto de estos compuestos en las funciones cognitiva y motora, en la síntesis y metabolismo de los principales neurotransmisores monoaminérgicos implicados en dichas funciones y en los niveles de algunas proteínas relacionadas con el envejecimiento y la inflamación.

5.1 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES Y SEGUIMIENTO DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS GENERALES

El estudio del envejecimiento a nivel comportamental, requiere el diseño de experimentos donde se utilicen métodos animales *in vivo* que tienen la ventaja de ofrecer información más real sobre los cambios que ocurren en el organismo. Sin embargo, una de sus desventajas, es la variabilidad existente en las respuestas entre individuos. Por lo que en este trabajo, para que los resultados obtenidos fueran equiparables, fue necesario, además de estandarizar las condiciones experimentales (ej. dosis, duración y vía de administración de los tratamientos, edad de los animales), realizar un seguimiento de variable fisiológicas que pudieran influir en nuestros resultados durante los tratamientos.

Para estandarizar las condiciones experimentales y considerando que se trata de un estudio sobre envejecimiento, uno de los puntos clave fue definir las edades de los grupos de animales de experimentación. Se considera que las ratas son jóvenes desde los 30 días (momento en el que acaba la pubertad) hasta los 5 meses. Después de este período son adultas hasta los 18 meses, que es cuando pierden la capacidad reproductora y comienza la vejez. Extrapolando las edades a humanos, se considera que 1 mes en ratas es comparable a 3 años en humanos (20 meses en una rata = 60 años en una persona) (Sengupta, 2011 y 2013). En esta fase de diseño experimental, otro punto importante fue seleccionar un vehículo de administración apropiado, para ello se utilizó aceite de maíz de Sigma-Aldrich, cuya composición varía respecto al aceite de maíz común, en que no presenta tocoferol (Corredor, 2006 y *Corn refiners association*, 2006). Este hecho es importante porque el tocoferol produce efectos a nivel cerebral (Ramis y cols., 2015). También descartamos efectos agudos de los polifenoles en los resultados observados sobre las funciones cognitivas analizadas, ya que la administración aguda de los diversos polifenoles no indujo alteraciones en la memoria. No obstante, en el caso de las pruebas que se realizaban a lo largo del tratamiento, el polifenol era administrado una vez finalizadas las pruebas, en lugar de administrarse a las 9 de la mañana.

A lo largo de todos los tratamientos con polifenoles, se realizó un seguimiento de variables fisiológicas como el peso corporal y la ingesta; además, se registró de forma continua la temperatura corporal y la actividad motora a lo largo del tratamiento con resveratrol. No se observaron alteraciones en dichos parámetros debidas al tratamiento, lo que coincide con otros estudios que han descrito que la administración de polifenoles no provoca cambios en el peso, la ingesta (Juan y cols., 2002; Mayers y cols., 2009; Toumi y cols., 2013), la temperatura corporal (Mayers y cols., 2009) y la actividad motora (Samardžić y cols., 2013). A pesar de ello, en todos los casos se realizaron registros de la actividad motora de forma puntual, para comprobar que los

resultados observados en las pruebas cognitivas no estuvieran relacionados con cambios de actividad motora. Estos datos en conjunto nos permiten descartar que los efectos observados tras los tratamientos con polifenoles estén relacionados con dichas variables fisiológicas.

5.2 EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y DE LOS TRATAMIENTOS CON POLIFENOLES EN LOS PROCESOS COGNITIVOS Y MOTORES

Una de las características más notables del envejecimiento en humanos y roedores a nivel cerebral, es la aparición de un progresivo deterioro cognitivo. Este deterioro es en parte consecuencia del daño oxidativo acumulado en lípidos, proteínas y ácido nucleico a lo largo de la vida (Butterfield y cols., 2006; Haider y cols. 2014). En conjunto ocasiona alteraciones neuronales que determinan deterioro en las funciones cognitivas (Azcoitia y cols., 2005). De esta manera, durante el envejecimiento se ve muy afectada la memoria (Bartus y cols., 1990; Kluger y cols., 1997; Borella y cols., 2008; Ramis y cols., 2013 y 2015) y el aprendizaje (Wilson y cols., 2002), que son dos procesos estrechamente relacionados. En particular, la memoria de trabajo se refiere a la capacidad del cerebro para codificar, mantener y manipular información durante un corto periodo de tiempo (Cowan, 2008). El declive en la memoria de trabajo en el envejecimiento (Payer y cols., 2006; Borella y cols., 2008) es considerado uno de los factores principales que contribuyen al deterioro cognitivo en la vejez (Park y cols., 2002; Borella y cols., 2008; Bizon y cols., 2012). Por lo que la búsqueda de estrategias que puedan revertir o paliar estos cambios ha sido objetivo de numerosas investigaciones (Takeuchi y cols., 2010; Morrison y Chein, 2011; Shipstead y cols., 2010), algunas de las cuales indican que la administración crónica de dietas enriquecidas con frutos rojos, o con determinados polifenoles como la luteolina mejoran la conducta exploratoria, diferentes tipos de memoria (de trabajo, episódica, espacial) y el aprendizaje en roedores viejos (Liu y cols., 2006; Shukitt-Hale y cols., 2009; Blaylock y cols., 2012; Vauzour y cols., 2008). Por ello nos planteamos analizar si los tratamientos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina también podrían compartir algunos de estos efectos beneficiosos con dichos tratamientos, ya que han sido descritos como sustancias con capacidad para reducir el daño oxidativo (Bastianetto y cols., 2000; Yao y cols., 2004, Pandey y Rizvi, 2009; Surai, 2015), así como indagar sobre los mecanismos implicados.

En este trabajo se analizó la memoria de trabajo espacial por medio de la prueba del laberinto radial (*radial maze*) que depende de la función hipocampal y es una prueba comúnmente utilizada en el estudio comportamental de roedores (Bizon y cols., 2012; Martin y Clark, 2007); además, se analizó la memoria episódica por medio de la prueba de reconocimiento de objetos que se basa en la habilidad natural de los roedores para explorar novedades (Antunes y Biala, 2012).

En primer lugar constatamos el deterioro cognitivo en el envejecimiento a partir de un declive en la memoria de trabajo espacial y la memoria episódica en las ratas viejas a los 18 meses de edad. En general, las ratas viejas necesitaron más del doble de tiempo para completar la prueba del laberinto radial que las ratas jóvenes y cometieron más errores. En cuanto a la memoria episódica también se comprobó un declive en las ratas viejas ya que discriminaron menos el objeto nuevo respecto al familiar que las ratas jóvenes. En segundo lugar, se observó que los tratamientos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina tuvieron un efecto beneficioso en ratas viejas tras 30 días de tratamiento, mejorando significativamente la memoria de trabajo espacial y la memoria episódica. La mejora observada en la memoria espacial en todos los tratamientos con polifenoles se debió tanto a una reducción del tiempo necesario para completar la prueba como a una reducción importante del número de errores cometidos. En cuanto a la mejora observada en la memoria episódica en todos los tratamientos con polifenoles se debió a un incremento de la actividad exploratoria dirigida hacia el objeto nuevo. Esto demuestra que los polifenoles tienen un efecto protector en regiones como el hipocampo, que participa en los procesos de memoria, con especial énfasis en la memoria espacial (Morris y cols., 1982); y también protector del estriado, que es importante en el aprendizaje y en la elección de acciones (Cook y Kesner y cols., 1988; Brasted y cols., 1997), y por lo tanto se encarga de asociar los estímulos con las respuestas a estos, algo necesario en el laberinto radial y en la prueba de reconocimiento de objetos.

En conjunto todos estos efectos observados tras los tratamientos con polifenoles podrían deberse a que éstos tuvieran la capacidad de contrarrestar los efectos del envejecimiento o a que estas sustancias tengan efectos estimulantes de la memoria (Giurgea, 1972; Bigford y cols., 2014). En relación con ello, se realizó un tratamiento con resveratrol en ratas adultas (9 meses), donde se observó una mejora a los 15 días de tratamiento, tanto en la memoria de trabajo como en la episódica, cuyos resultados llegan a ser incluso mejores que los de las ratas jóvenes, lo que podría indicar que el resveratrol tiene algunos efectos potenciadores de la memoria. Sin embargo, en estos animales adultos no se observó ningún deterioro cognitivo, por lo que esta edad no resultó de utilidad para estudiar los efectos de los polifenoles frente el declive cognitivo producido por el envejecimiento.

Los efectos positivos observados en animales viejos tratados con polifenoles en comparación a animales control de su misma edad, varían dependiendo del tipo de memoria que se analiza y del tipo de tratamiento utilizado. Por ejemplo, se detectaron mejoras a partir de los 15 días en la memoria de trabajo espacial en los tratamientos con silimarina, quercetina y naringenina; y en la memoria episódica tras el tratamiento con silimarina. En cambio en el caso del resveratrol fueron necesarios 30 días para observar cambios en ratas viejas. Un dato interesante es que, se detectó

una mejoría significativa en todos los grupos de animales tratados con polifenoles, comparándolos respecto a sí mismos a lo largo del tratamiento, acercándose a los valores que presentan los animales jóvenes, sugiriendo que estos polifenoles contrarrestan el efecto negativo de la edad sobre la memoria de trabajo espacial y episódica.

Al observar efectos positivos en la memoria de trabajo y episódica tras todos los tratamientos con polifenoles, se planteó la posibilidad de que estos cambios en la memoria influyeran sobre el aprendizaje, que es una función cognitiva que depende de la memoria (Sweatt, 2003; Vicens y cols., 2003). Una prueba comportamental comúnmente utilizada para analizar el aprendizaje visoespacial de roedores es el laberinto de Barnes (Barnes, 1979). En el presente trabajo, utilizando esta prueba se detectó deterioro en el aprendizaje visoespacial debido al envejecimiento. Se realizó también esta prueba a los animales tratados con silimarina, quercetina y naringenina. En el momento en que se estudió el tratamiento con resveratrol no se disponía del equipamiento necesario para llevar a cabo esta prueba, por lo que no se pudo realizar en estos animales. Se observó que los tratamientos con silimarina, quercetina y naringenina mejoran el aprendizaje visoespacial que se manifiesta por la reducción del tiempo de ejecución de la prueba y el número de errores que cometen al realizarla, respecto a ratas viejas control. Estos dos parámetros dependen del tipo de estrategia que siguen los animales para encontrar la caja de escape. Así, lo que determinó el descenso en las variables anteriores, fue que los animales tratados con polifenoles aumentaron la preferencia por seguir las estrategias de búsqueda directa y seriada, que son más efectivas que la aleatoria. En general las estrategias observadas en las ratas viejas al finalizar los tratamientos con polifenoles fueron similares a las que presentaron las ratas jóvenes control, mientras que los controles viejos presentaron un mayor porcentaje de estrategia aleatoria y muy reducida la estrategia directa. Al respecto, se ha descrito que la activación de algunas regiones cerebrales determina la preferencia por un tipo específico de estrategia. Así el uso de la estrategia directa (espacial) se ha relacionado con la activación del hipocampo, en cambio la utilización de la estrategia seriada se ha relacionado con una activación del estriado (Packard y McGaugh 1992; Packard y Teather 1998; White y McDonald 2002; Packard y Knowlton 2002; Rueda-Orozco y cols., 2008). Por tanto, el declive relacionado con la edad en la actividad neural del hipocampo podría subyacer a los déficits observados en la memoria espacial, que se constata con la baja utilización de la estrategia directa en las ratas viejas (Foster, 1999). Concretamente, la alteración de los mecanismos de plasticidad sináptica del hipocampo que ocurren durante el envejecimiento podría ser una de las causas del deterioro espacial observado en el envejecimiento (Shapiro, 2001). Por lo que, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que los tratamientos con polifenoles han mejorado de forma notable la funcionalidad del hipocampo y también del estriado.

Otro de los fenómenos que ocurren durante el envejecimiento es la disfunción motora caracterizada por falta de coordinación, equilibrio y fuerza, lo que se ha relacionado con déficit en determinados tipos de neurotransmisores monoaminérgicos como la dopamina (Joseph y cols., 1992, 1999, 2007; Kaasinen y Rinne, 2002) y disfunción del estriado (Seidler y cols., 2010). En primer lugar, observamos que el envejecimiento produjo un deterioro en la coordinación motora ya que las ratas viejas se mantuvieron en la rueda giratoria (prueba de *rotarod*) un tiempo de aproximadamente la mitad del correspondiente a las ratas jóvenes. Sin embargo, los tratamientos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina mejoraron la coordinación motora de las ratas viejas, ya que incrementaron el tiempo de permanencia en la rueda giratoria (*rotarod*), aunque sin llegar al nivel de coordinación de las ratas jóvenes. Además, se detectaron mejorías dentro de cada grupo de animales tratados con polifenoles. En relación con nuestras observaciones, diversos estudios han detectado también efectos beneficiosos sobre la coordinación motora tras tratamientos antioxidantes con otros polifenoles tanto en humanos (Saul y cols., 2008; Boots y cols., 2008; Macready y cols., 2009; Valls-Pedret y cols., 2012) como en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas (Liu y cols., 2006; Belinha y cols., 2007; Nencini y cols., 2007; Lu y cols., 2010; Khan, 2012; Ma y cols., 2013). Todo ello demuestra que los polifenoles no solo mejoran las capacidades cognitivas sino también la coordinación motora.

Cabe destacar que la mejoría de la coordinación motora no se considera causa de los efectos favorables de los polifenoles en las pruebas cognitivas realizadas. Ya que el aumento en la coordinación motora no implica cambios importantes en el grado de actividad motora, que sí sería un factor que podría alterar las pruebas cognitivas. La actividad motora es importante para poder llevar a cabo de forma eficiente las pruebas cognitivas anteriormente descritas, ya que si las ratas tienen mayor actividad motora, se moverán más rápido durante las pruebas y por tanto tardarán menos tiempo en completarlas. Sin embargo, ello podría afectar de forma negativa al número de errores cometidos, los cuales hemos observado que mejoran en todos los tratamientos con polifenoles. Por lo que concluimos que el incremento de la coordinación motora, no ha sido la causa de la mejora observada tras los polifenoles en la ejecución de las pruebas cognitivas.

Conocer estos datos no nos permite determinar la efectividad de estos tratamientos, ya que sería necesario realizar estudios adicionales utilizando diferentes dosis y duración de tratamientos. Sin embargo, si recapitulamos los resultados comportamentales, podemos afirmar que los tratamientos con los polifenoles mejoran las capacidades cognitivas y motoras, que están deterioradas durante el envejecimiento. Esto puede estar relacionado con las propiedades antioxidantes del resveratrol (Yang y cols., 2015), la silimarina (Nencini y cols., 2007), quercetina (Boots y cols., 2007; Haleagrahara y cols., 2009; Queen y cols., 2010; Toumi y cols., 2013; Angeline y cols., 2014) y naringenina (Hirai y cols., 2007; Chao y cols., 2010; Rahigude y cols.,

2012), que ayudan a mantener unos niveles de defensas antioxidantes adecuados en regiones implicadas en los procesos cognitivos como el hipocampo y así evitan su degeneración. Se ha constatado que los fallos en estas funciones son debidos en parte a un descenso en los niveles de neurotransmisores monoaminérgicos, relacionados con las funciones cognitivas (Luine y cols., 1990; Esteban y cols., 2010 a y b); por ejemplo el descenso de DA se ha relacionado con los fallos en la coordinación motora (Joseph y cols., 1992; Esteban y cols., 2010a, b) y deterioro de la memoria de trabajo espacial (Brozoski y cols., 1979). También se ha descrito que la lesión de vías serotoninérgicas en hipocampo provoca deficiencias en la memoria de trabajo (Sprague y cols., 2003). Así como la 5-HT estriatal está involucrada en la consolidación de la memoria y aprendizaje (Sweatt, 2003). Al tratarse los polifenoles de sustancias antioxidantes, parte de su mecanismo de acción podría estar relacionado con la protección de las enzimas limitantes de las vías de síntesis de monoaminas frente al daño oxidativo. Esto no excluye que los polifenoles además de actuar como antioxidantes, posean otros mecanismos de acción que determinen los efectos positivos que observamos. Por ejemplo a través de ejercer funciones antiinflamatorias o por medio de actuar sobre proteínas que tienen efectos a nivel cognitivo como es el caso de SIRT1. Por lo que una vez hemos definido los efectos a nivel cognitivo y motor, que producen los polifenoles durante el envejecimiento, nos centraremos en discutir los posibles mecanismos de acción que subyacen a estos efectos observados.

5.3 EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y DE LOS TRATAMIENTOS CON POLIFENOLES SOBRE LOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS

Los procesos de memoria y aprendizaje, así como los motores están regulados por la actividad de neurotransmisores incluyendo la NA (Sara y cols., 1995; Vankov y cols., 1995; Collier y cols., 2004; Kemp y Manahan-Vaughan 2008; Lemon y cols., 2009), la DA (Sahakian y cols., 1985; Li y cols., 2003; Manahan-Vaughan y Kulla, 2003; Lemon y cols., 2006; Cools, 2011) y la 5-HT (Fontana y cols., 1997; Meneses 1999; Kulla y Manahan-Vaughan, 2002; González-Burgos y Feria-Velasco, 2008; Seyedabadi y cols., 2014). Estos neurotransmisores son importantes en regiones relacionadas con los procesos cognitivos, como son el hipocampo donde llegan los terminales que sintetizan NA y 5-HT; y el estriado donde llegan los terminales que sintetizan la DA (Adams y cols., 2008; González-Burgos y Feria-Velasco 2008; Cools 2011). En este estudio hemos analizado la síntesis y acumulación de NA, DA y 5-HT en dichas regiones cerebrales de ratas viejas. Los resultados de este trabajo muestran un claro descenso en la síntesis y acumulación de estos neurotransmisores en hipocampo y estriado, pudiendo ser una de las causas del declive cognitivo y motor que hemos observado en ratas viejas. También estudiamos el efecto del envejecimiento en la síntesis y acumulación de 5-HT en la glándula pineal, que aunque no es una región implicada directamente en procesos cognitivos, está relacionada con la regulación de los

ciclos de sueño y vigilia que influyen sobre los anteriores. En la glándula pineal también se observó un descenso en la síntesis y acumulación de 5-HT. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con estudios previos, que destacan el deterioro en la funcionalidad de los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos, en diferentes regiones cerebrales, como parte del proceso de envejecimiento (Luine y cols., 1990; Venero y cols., 1991; Míguez y cols., 1999; Esteban 2010 a y b), siendo uno de los factores desencadenantes de los fallos a nivel cognitivo y motor (Meneses, 1999; Collier y cols., 2004; Murchison y cols., 2004; Koprowska y cols., 2004; Lemon y Manahan-Vaughan, 2006), así como de la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento como Alzheimer, Parkinson y también depresión (Hussain y Mitra, 2000).

El descenso observado de la síntesis de monoaminas se debe a la reducción detectada de la actividad de las enzimas TPH y TH, que son las enzimas que regulan y limitan la síntesis de monoaminas. Para conocer la actividad de estas enzimas se utilizó el método de acumulación de DOPA y 5-HTP, que es la técnica comúnmente utilizada para monitorizar *in vivo* la actividad de síntesis de monoaminas (Carlsson y cols., 1972; Moranta y cols., 2009). Algunos de los motivos de la reducción de la actividad de estas enzimas pueden ser una fosforilación ineficiente y/o daño oxidativo en estas enzimas, provocado por el aumento de ROS que se produce en el envejecimiento, ya que algunos estudios han reportado que el estrés oxidativo inactiva directamente la función enzimática de TPH y TH (De La Cruz y cols., 1996; Kuhn y Arthur 1996; Cash y cols., 1998; Hussain y Mitra, 2000).

Al ser los polifenoles sustancias antioxidantes (Bastianetto y cols., 2000; Wenzel y cols., 2005; Sengottuvelan y cols., 2006), se estudió si esta característica podía influir en la funcionalidad de estas enzimas, regulando el descenso observado en la síntesis y acumulación de monoaminas en el envejecimiento. Al respecto, en este estudio se detectó que tras el tratamiento crónico con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina, se recuperaron los niveles de síntesis y por tanto la acumulación de monoaminas en el cerebro de ratas viejas (NA en hipocampo, DA en estriado y de 5-HT en hipocampo y estriado). También en la glándula pineal se observó un aumento en la síntesis de 5-HT, que determinó un incremento en su acumulación. Por tanto, los resultados del presente estudio muestran que estos tratamientos tienen un efecto neuroprotector en las neuronas, que se manifestaría con un aumento significativo en la actividad de las enzimas TH y TPH en sus dos isoformas (TPH-1 que está presente en la glándula pineal y TPH-2 que se encuentra en el hipocampo y estriado (Walther y cols., 2003)). Estos efectos posiblemente se deban a que los polifenoles protegen estas enzimas frente a los agentes oxidantes que causan la pérdida de funcionalidad enzimática (Wang y cols., 2011; Rose y cols., 2014). En este sentido, se han reportado efectos similares con el tratamiento con resveratrol en el sistema dopaminérgico de

roedores tras daño causado con la endotoxina lipopolisacárida (LPS), 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), o 6-hydroxyl dopamine (Blanchet y cols., 2008; Wang y cols., 2011; Lofrumento y cols., 2014; Rose y cols., 2014). Comparando el efecto de los distintos tratamientos sobre los niveles de síntesis y acumulación de monoaminas, observamos que todos los polifenoles tienen efectos positivos, adquiriendo unos niveles de síntesis y acumulación equiparables.

Otro factor importante que puede afectar la acumulación de neurotransmisores, es la tasa de metabolización. El análisis de los metabolitos de monoaminas tras los tratamientos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina ha puesto de manifiesto una reducción en los niveles de 5-HIAA en algunas regiones cerebrales. Sin embargo, no se han observado cambios significativos en el caso del otro metabolito analizado (HVA). Enzimas como la MAO metabolizan la 5-HT hasta 5-HIAA, así como metaboliza la DA obteniéndose HVA. MAO está presente en el cerebro en dos isoformas: la enzima MAO-A que metaboliza NA, DA y 5-HT, en terminales catecolaminérgicos y serotoninérgicos y la enzima MAO-B que metaboliza la DA en los terminales catecolaminérgicos del estriado (Youdim y cols., 1972; Lenders y cols., 1996). La disminución observada en los niveles del metabolito 5-HIAA tras los tratamientos, puede estar relacionado con una disminución de la actividad de la enzima MAO-A. En este sentido, algunos estudios realizados con ratones *knock-out* para MAO-A han mostrado drásticos incrementos en 5-HT y NA cerebral y sólo ligeros aumentos en los valores de DA, al compararlos con ratones normales, incidiendo así en que MAO-A metaboliza principalmente la 5-HT y la NA frente a la DA (Cases y cols., 1995; Martín-López y cols., 2008).

Estos resultados indican que una de las causas del incremento en el contenido de 5-HT, tras estos tratamientos, puede estar relacionado con una reducción de la tasa de metabolización de 5-HT, mediante la inhibición de la enzima MAO-A. Además, al no detectar después de estos tratamientos alteraciones en los niveles del metabolito HVA, todos estos resultados en conjunto reflejan una mayor inhibición de MAO-A respecto MAO-B, por parte de los tratamientos con polifenoles, en consonancia con estudios anteriores que describen un efecto inhibitorio de la MAO-A por parte del resveratrol (Yáñez y cols., 2006), silimarina (Zhu y cols., 2014; Surai, 2015) o los flavonoides quercetina y naringenina (Bandaruk y cols., 2012). Estos polifenoles no son los únicos que muestran efectos inhibitorios sobre la enzima MAO, así existen algunos estudios en cerebro de ratón que señalan que otros polifenoles como la luteolina, y las catequinas presentes en el té verde tienen efectos inhibitorios sobre MAO-A (Bandaruk y cols., 2012). Además Bandaruk y cols., 2012 muestran que el grado de inhibición varía dependiendo del polifenol, así de los polifenoles estudiados en su estudio, la luteolina es el inhibidor más efectivo, seguido de la quercetina y por último las catequinas.

Estos resultados son muy interesantes, ya que si los polifenoles inhiben la enzima MAO, aumentando la síntesis y acumulación de monoaminas, otro posible efecto serían sus propiedades antidepressivas, por lo que los polifenoles presentarían efectos similares a los fármacos antidepressivos, conocidos como inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAOs), cuyo objetivo es prolongar la actividad sináptica de los neurotransmisores (Ogle y cols., 2013). Al respecto, en otros estudios, se ha relacionado la inhibición de la enzima MAO con efectos terapéuticos en patologías como el Parkinson, ya que favorecen que se mantengan los niveles de neurotransmisores adecuados para el correcto funcionamiento de los sistemas de neurotransmisión (Youdim y Bakhle, 2006; Jäger y cols., 2011).

Considerando todos estos factores, el aumento del contenido de monoaminas puede ser debido a una combinación de: *incremento de síntesis*, por aumento de la actividad de las enzimas limitantes; y *descenso de la tasa de metabolización*, por inhibición de la enzima MAO. Estos son los factores, que hemos podido analizar en este trabajo. Sin embargo, existen otros factores como la *inhibición de la recaptación de monoaminas* o los cambios en la *actividad sináptica* que también influyen sobre la acumulación de monoaminas, y que han sido sugeridos para el resveratrol (Yañez y cols., 2006; Xu y cols., 2010), pero se necesitan más estudios para comprender estos posibles mecanismos.

En síntesis, los efectos observados a nivel comportamental se relacionan con los efectos neuroquímicos que ocurren tras los tratamientos con polifenoles. Pudiendo ser la regulación de la síntesis y acumulación de monoaminas, una de las causas que generan efectos beneficiosos en la recuperación de las capacidades cognitivas y motoras durante el envejecimiento. Los polifenoles, además de ser antioxidantes, son moléculas antiinflamatorias, por lo que se ha sugerido que otro de los mecanismos de acción, responsable de sus efectos neuroprotectores, podría ser la interacción con proteínas/vías de señalización implicadas en envejecimiento e inflamación, que será el tema que discutiremos a continuación.

5.4 EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y DE LOS POLIFENOLES SOBRE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN ENVEJECIMIENTO E INFLAMACIÓN

La neuroinflamación es un mecanismo de defensa que el organismo tiene para proteger el SNC contra infecciones y agentes proinflamatorios (Spencer y cols., 2012). Sin embargo, cuando se produce desregulación o exceso de respuesta inflamatoria, la neuroinflamación se convierte en un proceso perjudicial para el organismo, generando incluso muerte neuronal (Mawhinney y cols., 2011). En mamíferos, la respuesta exagerada del sistema inmunitario frente a estímulos

inflamatorios (citoquinas, exceso de corticosterona y estrés oxidativo, entre otros) se denomina *inflammaging* (Salminen y cols., 2008 a y b).

La neuroinflamación asociada al envejecimiento puede ser consecuencia de múltiples causas, algunas de ellas son: la acumulación de tejidos dañados proinflamatorios (debido en parte al daño oxidativo) (Martinon y cols., 2010; Barrientos y cols., 2015), el fallo de las respuestas del sistema inmunitario tanto innato como adaptativo frente a patógenos y células disfuncionales (Deeks, 2011), la tendencia de las células senescentes a secretar citoquinas proinflamatorias (Salminen y cols., 2008 a y b), así como la desregulación de la autofagia, por medio de sobreactivación de mTOR, que genera acumulación de proteínas defectuosas (Pallau y cols., 2013; Yang y cols., 2014). Estas alteraciones ocasionan la activación del inflammasoma y otras vías de señalización proinflamatorias como son: PI3K/Akt/mTOR, que además de regular los procesos de autofagia, interacciona con vías relacionadas con neuroinflamación (Song y cols., 2005; Han y cols., 2010), la vía de MAPK (Bhat y cols., 1998; Culbert y cols., 2006, Spencer y cols., 2009 a) y la vía de NF- κ B (Spencer y cols., 2012). Cuando estas vías se activan se produce un aumento de producción de citoquinas como IL-1 β , TNF- α , interferones y prostaglandinas (Salminen y cols., 2008 a y b), que en conjunto agravan la situación en la que están los tejidos debido a la presencia de moléculas proinflamatorias (Kreutzberg y cols., 1996).

La prolongación temporal de este estado tiene múltiples consecuencias como: cambios estructurales en áreas frontales y medio-temporales (Ownby y cols., 2010; Barrientos y cols., 2012); alteración de la síntesis de catecolaminas y serotonina, así por ejemplo en lugar de formarse 5-HT a partir de triptófano, se forma ácido quinurénico que inhibe los receptores NMDA (García-Bueno y cols., 2008); deterioro de las sinapsis (Bliss y Collingridge, 1993), entre otros. De forma que, se ha observado en ratas jóvenes que el exceso de citoquinas en regiones claves como el hipocampo empeora la memoria provocando envejecimiento prematuro (Barrientos y cols., 2015). Por lo que, el conjunto de cambios que ocurren durante los procesos inflamatorios generan problemas cognitivos, sobretudo en la memoria y a nivel motor, contribuyendo al envejecimiento y al desarrollo enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Liu y Chan y cols., 2014), esquizofrenia (Wonodi y Schwarcz, 2010), Parkinson, esclerosis múltiple, entre otras (Simi y cols., 2007; revisión Van Eldik y cols., 2007).

Al considerarse la neuroinflamación un factor clave en el proceso del envejecimiento cerebral, muchas de las estrategias anti-envejecimiento están orientadas hacia la prevención o atenuación del estado proinflamatorio, por medio de la modulación de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de este estado. Así por ejemplo, se ha observado que dietas suplementadas con resveratrol o flavonoides reducen la producción de citoquinas, como la IL-1 β ,

en el hipocampo de roedores viejos, con un impacto sobre la mejora de los procesos cognitivos, como es la memoria (Williams y cols., 2008; Abraham y Johnson, 2009). Los resultados de esta tesis, demuestran que los tratamientos con polifenoles mejoran las capacidades cognitivas y motoras, revirtiendo el declive de estas funciones en el envejecimiento. Por lo que estudiamos si estos efectos de mejora están acompañados de la modulación de los procesos de neuroinflamación, a través de la regulación de vías de señalización implicadas en envejecimiento e inflamación.

PI3K/Akt/mTOR-MEK/ERK

La primer vía de señalización que analizamos fue la de PI3K/Akt/mTOR, que además de estar implicada en el control del ciclo celular, la proteostasis, el metabolismo, la autofagia y la longevidad (Manning y cols., 2007), interactúa con vías que participan en los procesos de inflamación (Song y cols., 2005; Han y cols., 2010). Se ha demostrado que las alteraciones en esta vía de señalización favorecen el desencadenamiento del envejecimiento (Hers y cols., 2011). Por lo que identificar los cambios que ocurren en el envejecimiento en esta vía, es importante para poder encontrar estrategias antienvjecimiento.

Los resultados obtenidos muestran una ligera activación de Akt en la corteza parietal de ratas viejas, y aunque el incremento de inmunoreactividad de p-Akt hacía preveer un incremento en la activación de mTOR (Bishop y cols., 2010), éste no se observó.

No se detectaron alteraciones sustanciales de Akt o mTOR en el hipocampo de rata debidas al envejecimiento. Estos resultados en rata contrastan con la reducción recientemente descrita de la vía BDNF/PI3K/Akt/mTOR en ratones viejos (Yang y cols., 2014).

Por otro lado, el tratamiento crónico de ratas viejas con resveratrol no afectó Akt ni mTOR en estas mismas regiones. Aunque, en ratones, la restricción calórica, de la cual el resveratrol es considerado un fármaco mimético, favorece la inhibición de la vía generando efectos de mejora a nivel cognitivo (Yang y cols., 2014). En el caso del trabajo que presentamos los efectos beneficiosos a nivel comportamental tras el tratamiento con resveratrol, no parecen estar relacionados con la modulación de esta vía de señalización en hipocampo y corteza parietal.

Los polifenoles interactúan con otras vías como la de MAPK (Steelman y cols., 2011), NF-κB y SIRT1 (Yeung y cols., 2004; Wenzel y cols., 2006); afectando también los procesos de neuroinflamación y como consecuencia al envejecimiento. Por lo que se estudiaron las proteínas MEK-ERK que pertenecen a la vía de MAPK. Esta vía además de regular los procesos que hemos

citado anteriormente, está implicada en otras funciones como la mitogénesis y la diferenciación celular, así como se ha relacionado la activación de MAPK con la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo, siendo un mecanismo necesario para la consolidación de la memoria (Atkins y cols., 1998) y el aprendizaje espacial en ratones (Selcher y cols., 1999; Sweatt, 2004). Por lo que la activación controlada de esta vía es necesaria para el correcto funcionamiento de los procesos cognitivos. Sin embargo, la pérdida de control de su activación ocasiona inflamación, favoreciendo el desarrollo de patologías neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson o esclerosis lateral amiotrófica (Kim y Choi, 2010).

Los resultados del presente estudio demuestran que el envejecimiento produce la sobreactivación de las proteínas MEK y ERK de la vía de las MAPK, en el hipocampo de rata. Estos resultados podrían sugerir un incremento del estado proinflamatorio en el hipocampo durante el envejecimiento. En este sentido se ha descrito en la microglia de humanos que la activación de la vía de las MAPK (p38 MAP quinasa, ERK1/2 y JNK) produce un aumento de la liberación de citoquinas TNF- α e IL-1 β , generando neuroinflamación (Klegeris y cols., 2008). En otro estudio se ha demostrado que la administración de la endotoxina LPS en cerebro de ratones produce un incremento de la fosforilación de proteínas como ERK y CREB, lo que activa la microglia y desencadena la liberación de citoquinas, provocando daño en la sustancia negra y en las neuronas dopaminérgicas, generando un efecto mimético de la enfermedad de Parkinson (Reinert y cols., 2014). En la misma línea, otro estudio sugiere que en situaciones como los procesos de isquemia, donde se liberan citoquinas, la inhibición de ERK1/2 puede ser una forma de reducir el desencadenamiento de la liberación de citoquinas, y así reducir el proceso de inflamación (Wang y cols., 2004). En esta tesis se planteó si el tratamiento con resveratrol tendría efectos sobre esta vía en el hipocampo. Al respecto, en este estudio no se detectaron efectos inhibitorios ni activadores del tratamiento con resveratrol sobre las proteínas MEK-ERK en hipocampo. Por tanto, no podemos relacionar los efectos protectores a nivel cognitivo, del tratamiento con resveratrol, con la regulación de estas señales inflamatorias.

No se conoce con exactitud el mecanismo de acción de los polifenoles sobre las vías PI3K/Akt/mTOR y MEK/ERK, y se debe estudiar más al respecto, ya que los resultados hasta el momento son dispares. Algunos estudios indican que, el resveratrol inhibe Akt en cultivos neuronales (Banerjee y cols., 2010; Wang G y cols., 2015; Wang L y cols., 2015), o en cultivos de células con leucemia (Banerjee y cols., 2010). Sin embargo, se pueden encontrar otros autores que indican que el resveratrol activa Akt en cultivos de neuronas de hipocampo en un modelo de isquemia (Zamin y cols., 2006). En cuanto a mTOR, hay más consenso, y los autores que indican que el resveratrol inhibe Akt coinciden en que *in vitro* el resveratrol también inhibe mTOR, provocando la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR y favoreciendo así la biogénesis y

transmisión sináptica (Tillu y cols., 2012; Cho y cols., 2014; Wang L y cols., 2015). Por otro lado, la controversia también está presente en el estudio de los efectos del resveratrol sobre la vía de las MAPK. Así algunos de los mismos autores que señalan inhibición de mTOR por parte del resveratrol también describen que el resveratrol inhibe ERK, impidiendo la liberación de citoquinas en neuronas (Liu y cols., 2010; Tillu y cols., 2012; Cho 2014). A pesar de que también se pueden encontrar estudios que señalan que el resveratrol activa ERK en cultivos de neuronas (Banerjee y cols., 2010; Zamin y cols., 2006; Wang L y cols., 2015). Por otro lado, el efecto del resveratrol sobre las proteínas Akt/mTOR y MEK/ERK, es más complejo que la simple activación/inhibición de estas proteínas, ya que el resveratrol interactúa con otras proteínas que también afectan a Akt/mTOR y MEK/ERK. En este sentido, existen estudios que señalan una inhibición indirecta de mTOR con resveratrol, por medio de la activación de SIRT1 (Ghosh y cols., 2010).

Los resultados *in vivo* que presentamos en este trabajo, que se diferencia de los estudios citados anteriormente que son principalmente *in vitro*, no detectaron efectos del resveratrol sobre Akt, mTOR y MEK/ERK. De todas formas, aunque no se observen efectos, no podemos descartar que con otras condiciones experimentales, por ejemplo con diferentes dosis y duración de los tratamientos, y en otras regiones, diferentes al hipocampo y la corteza parietal, no se pudieran observar alteraciones. Ya que como hemos indicado la bibliografía al respecto no parece establecer un único mecanismo de acción por parte del resveratrol sobre estas vías. Por lo que es necesario realizar más estudios al respecto. Lo que en conjunto sí sugieren estos resultados, es que los efectos beneficiosos del resveratrol, parecen estar más relacionados con la modulación de otras proteínas/vías de señalización distintas de PI3K/Akt/mTOR y MEK/ERK, como podrían ser SIRT1 y NF- κ B, que en conjunto con las anteriores, están también implicadas en neuroinflamación y envejecimiento. Por este motivo, a continuación discutiremos los efectos del envejecimiento y de los tratamientos con polifenoles sobre la vía de NF- κ B y SIRT1.

NF- κ B

La vía de NF- κ B es una de las vías prototípicas más importantes implicadas en inflamación durante el envejecimiento, principalmente por la implicación de NF- κ B en la transcripción de genes proinflamatorios (Adler y cols., 2007; Yeung y cols., 2004; Salminen y cols., 2008 a y b). En el cerebro este complejo se expresa tanto en neuronas como en la glia, donde se ha visto que la activación de esta vía favorece la expresión de citoquinas (Kaltschmidt y cols., 1994; Meberg y cols., 1996), pero también afecta a la plasticidad sináptica y a la memoria (Jana y cols., 2002; Williams y cols., 2008; Nakajima y cols., 2006). NF- κ B está formado por un complejo

heterodimérico compuesto por las proteínas p50/p52 y p65. En el citoplasma, el dímero de NF- κ B se une con la proteína inhibitoria I κ B y de esta forma todo el complejo permanece inactivo (Baldwin y cols., 1996). Los ROS y otras moléculas proinflamatorias activan la proteína quinasa IKK que fosforila I κ B, de forma que I κ B fosforilada se separa del complejo NF- κ B y es degradada (Ghosh y Karin y cols., 2002), activándolo y permitiendo que se transloque al núcleo donde puede actuar como un factor de transcripción al unirse al ADN en las regiones promotoras específicas (Siebenlist y cols., 1994; Oeckinghaus y cols., 2009). El dominio de activación transcripcional de NF- κ B se encuentra en la subunidad p65 (Kaltschmidt y cols., 1994 y 2005; Chen y Greene, 2003). La subunidad p65 se ve modulada por modificaciones postranscripcionales como fosforilación en las serinas (276, 311, 529 y 536) y acetilación en las lisinas 310 (Chen y Greene, 2003; Yeung y cols., 2004), 122, 123, 218 y 221 (Schmitz y cols., 2004; Perkins y cols., 2007; Oeckinghaus y cols., 2009).

Los resultados de este trabajo demuestran que el envejecimiento no afectó a los niveles totales de la proteína NF- κ B en hipocampo de rata, ni tampoco provocó la activación de esta vía por medio de fosforilación. De esta forma, se observó que la proporción p-NF- κ B/NF- κ B fue similar tanto en ratas viejas como en jóvenes. Estos resultados coinciden con estudios previos que indican que el envejecimiento no provoca alteraciones en los niveles de los diferentes componentes de NF- κ B en hipocampo de ratas viejas (Korhonen y cols., 1997), ni en ratones (Adler y cols., 2007). Siendo el hipocampo la región cerebral con niveles más altos de NF- κ B (Meberg y cols., 1996). En cuanto a la fosforilación, estos resultados también manifiestan un efecto parecido a lo que se observó en linfocitos de ratas viejas, donde se detectó que la edad no produce un aumento de la fosforilación de NF- κ B (Liu y cols., 2008). Por lo que el envejecimiento no parece activar NF- κ B, mediante fosforilación; lo que no excluye que el envejecimiento pueda potenciar otros mecanismos activadores de NF- κ B.

En este sentido, en este trabajo de forma muy interesante se detectó que el envejecimiento aumenta significativamente los niveles de NF- κ B acetilada en hipocampo, siendo la proporción NF- κ B acetilada/NF- κ B claramente superior en ratas viejas respecto ratas jóvenes. Los resultados de este trabajo concuerdan con investigaciones anteriores, que indican que la sobreactivación de la vía de NF- κ B es uno de los signos transcripcionales del envejecimiento (Quivy y Lint, 2004; Adler y cols., 2007), así por ejemplo se ha visto que la expresión condicional de un inhibidor de NF- κ B en la piel envejecida de ratones transgénicos provoca el rejuvenecimiento fenotípico de este tejido (Adler y cols., 2007). Del mismo modo, la inhibición genética y farmacológica de la señalización de NF- κ B evita características asociadas a la edad en diferentes modelos de envejecimiento acelerado de ratones (Osorio y cols., 2012; Tilstra y cols., 2012). También se ha

descrito que la acetilación de p65 incrementa la duración y eficacia de la activación de NF- κ B, generando aumento de inflamación (Chen y Greene y cols., 2003). En correlación con estos datos, se ha descrito que la inhibición de la señalización de NF- κ B reduce el estado proinflamatorio característico del envejecimiento (Salminen y cols., 2008 a y b).

Estudiando la regulación de la activación de NF- κ B, Yeung y cols., 2004 fueron los primeros en mostrar que la enzima desacetilasa SIRT1 puede interactuar con la proteína RelA/p65 del complejo NF- κ B, desacetilando específicamente la lisina 310. Esta modificación había sido anteriormente reportada como responsable de la potenciación de la activación de NF- κ B (Chen y Greene y cols., 2003). Posteriormente al estudio de Yeung y cols., 2004, otros estudios han mostrado resultados que impulsan la idea de que SIRT1 es un potente desacetilador de NF- κ B (Chen y cols., 2005; Kauppinen y cols., 2013; Xie y cols., 2013). La interacción entre SIRT1 y NF- κ B es especialmente interesante en la regulación del envejecimiento de acuerdo con los estudios de Yeung y cols., 2004 y Adler y cols., 2007, ya que sugieren que SIRT1 podría promover la longevidad por medio de inhibir la activación de NF- κ B. Además, Kwon y cols., 2008 estudiando HIV-1 demostraron que la proteína vírica Tat se une a SIRT1, inhibiendo su actividad, lo que impide la desacetilación de NF- κ B y lo deja activo; desencadenando así la activación del sistema inmunitario. En conjunto estas observaciones apoyan la idea de que las respuestas inflamatorias y los procesos de envejecimiento pueden ser reforzados por la potenciación de la activación de NF- κ B. En este sentido, factores de longevidad, como SIRT1 y sus activadores, podrían regular la eficiencia de la señalización de NF- κ B (Salminen y cols., 2008 a y b).

Se ha descrito que el resveratrol es un potente agonista farmacológico de SIRT1 (Howitz y cols., 2003) y además se ha visto en estudios sobre cáncer que el resveratrol *in vivo* es inhibidor de la transcripción de NF- κ B, mostrando una acción antitumoral (Jang y cols., 1997; Holmes-MCNary y Baldwin, 2000; Manna y cols., 2000). En este trabajo estudiamos si el tratamiento con resveratrol *in vivo* modula la vía de señalización de NF- κ B también en hipocampo de ratas viejas. Al respecto, los resultados de este trabajo demuestran que el tratamiento con resveratrol reduce los niveles de NF- κ B acetilada, sin modificar de forma importante los niveles totales de NF- κ B. Por lo que el tratamiento con resveratrol disminuye la proporción NF- κ B acetilada/NF- κ B en ratas viejas, haciendo que esta proporción vuelva a ser similar a la de ratas jóvenes y, por tanto, se puede decir que revierte el efecto del envejecimiento. Además como el tratamiento con resveratrol no alteró la fosforilación de NF- κ B en ratas viejas, el mecanismo de acción de los polifenoles parece estar más relacionado con la modulación de la acetilación.

Después de estudiar el tratamiento con resveratrol, se estudió si otros polifenoles tendrían los mismos efectos que el resveratrol sobre la modulación de NF- κ B. Se estudió el efecto de los polifenoles silimarina, quercetina y naringenina sobre NF- κ B en hipocampo de ratas viejas. El tratamiento con estos polifenoles también provoca la disminución de NF- κ B acetilada en el hipocampo de ratas viejas. A diferencia del tratamiento con resveratrol, este descenso se produjo acompañado de una reducción importante de los niveles totales de NF- κ B. Por lo que estos polifenoles parecen regular no solo los niveles de NF- κ B acetilada, sino también la expresión de NF- κ B. Estos resultados coinciden con estudios previos que mostraron una reducción de la expresión de NF- κ B en el hipocampo, estriado y corteza frontal de ratas viejas alimentadas con dieta rica en polifenoles (Goyarzu y cols., 2004). En este sentido, se ha visto en otros estudios que la inhibición farmacológica de NF- κ B previene la aparición de inflamación en diferentes tipos de ratones modelos de envejecimiento prematuro (Zhang y cols., 2010; Gillum y cols., 2011; Yao y cols., 2012; Osorio y cols., 2012; Tilstra y cols., 2012). Los resultados que presentamos son importantes, ya que podrían significar que los polifenoles tienen la capacidad de reducir el estado proinflamatorio en el hipocampo de ratas viejas, por medio de atenuar la expresión y la activación de la vía de NF- κ B; con efectos similares a la de los inhibidores farmacológicos de NF- κ B. Los polifenoles disminuyen los niveles totales de NF- κ B, esto conlleva a la disminución de la activación de la vía de NF- κ B, que se traduce en descenso de la transcripción de genes proinflamatorios y también de la propia proteína NF- κ B. Por lo que los tratamientos generarían una regulación a la baja de todo el sistema NF- κ B, impidiendo o reduciendo la transcripción de genes proinflamatorios. Estos datos se ven reforzados por estudios previos que consideran que uno de los mecanismos de actuación de los polifenoles, es la capacidad de atenuar la neuroinflamación, disminuyendo la liberación de citoquinas inflamatorias en ratones viejos (Spencer y cols., 2012; Flowers y cols., 2015).

La reducción de la acetilación de NF- κ B tras los tratamientos con polifenoles, puede estar relacionada con alteraciones en la proteína SIRT1; a la que se han asociado múltiples funciones relacionadas con la longevidad, pero una de las más importantes es la modulación de la vía de señalización de NF- κ B por medio de desacetilar la lisina 310 de la subunidad RelA/p65 de NF- κ B, inhibiendo la transcripción de genes proinflamatorios (Yeung y cols., 2004; Adler y cols., 2007; Kwon y cols., 2008; Spencer y cols., 2012). Por lo que a continuación discutiremos los resultados del efecto del envejecimiento y de los tratamientos con polifenoles sobre SIRT1.

SIRT1

Los resultados de este trabajo demuestran que el envejecimiento reduce los niveles de SIRT1 en el hipocampo. Estos resultados coinciden con análisis previos, que también indican un descenso de SIRT1 en hipocampo de ratas viejas (Quintas y cols., 2012). Estas observaciones en conjunto son importantes, ya que en los últimos años diversos estudios han considerado que descensos en los niveles de expresión de SIRT1 o la inhibición de su actividad podrían contribuir al envejecimiento y a la inflamación, con consecuencias negativas sobre las capacidades cognitivas, contribuyendo al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas asociadas a esta etapa de la vida como por ejemplo Alzheimer y Parkinson (Qin y cols., 2006; Jiang y cols., 2012; Herskovist y cols., 2013 y 2014).

También estudiamos el efecto del envejecimiento sobre SIRT1 en otras regiones cerebrales implicadas en los procesos cognitivos, como son el estriado y la corteza frontal. El estriado está relacionado con el aprendizaje y la memoria; y la corteza frontal es importante en la adquisición de conocimiento procedural, integración de información y ejecución de la conducta (Zyzak y cols., 1995, Joseph y cols., 2007). Los resultados de esta tesis demuestran que el envejecimiento también reduce los niveles de SIRT1 en el estriado y en la corteza frontal. También se estudió una región menos relacionada con los procesos cognitivos como es la corteza parietal, donde no se observaron alteraciones en los niveles de SIRT1 debidas al envejecimiento, coincidiendo con Quintas y cols., 2012. Estos resultados en conjunto sugieren que las regiones más vulnerables durante el envejecimiento a sufrir cambios en los niveles de SIRT1, son las especializadas en los procesos cognitivos. Estos resultados aportan más evidencias a estudios anteriores que indican que las regiones especializadas en los procesos de memoria y aprendizaje son las más afectadas por el envejecimiento (Brown y cols., 2004; Abd El Mohsen y cols., 2005; Gredilla y cols., 2010; Cerbai y cols., 2012; Penner y cols., 2012). En este sentido, en el hipocampo de animales viejos se ha detectado una susceptibilidad mayor a la neuroinflamación que en otras regiones cerebrales. Esto se debe a que contiene una proporción más elevada de astrocitos y microglía que otros tejidos, lo que genera una tendencia en estado basal hacia una producción más alta y rápida de citoquinas pro-inflamatorias, acompañado de niveles reducidos de moléculas antiinflamatorias (Pitossi y cols., 1997; Campuzano y cols., 2009; Barrientos y cols., 2015; Flowers y cols., 2015). Todo ello unido a la proximidad del hipocampo con los ventrículos laterales y los órganos circumventriculares que están muy vascularizados y que favorecen el transporte de moléculas proinflamatorias (Katsuura y cols., 1990).

Se desconocen los mecanismos responsables del descenso de SIRT1 asociado al envejecimiento, aunque se apunta que una de las causas podría ser el daño oxidativo (Wu y cols., 2006). Así,

cabría esperar que los antioxidantes atenúen el efecto del envejecimiento. Los polifenoles potencian mecanismos de defensa antioxidantes que reducen el estrés oxidativo (Pandey y Rizvi, 2009), por lo que nos preguntamos si los polifenoles actuarían sobre SIRT1 en el hipocampo de ratas viejas. Al respecto, los resultados del trabajo que presentamos demuestran que los tratamientos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina aumentan los niveles de SIRT1 en el hipocampo de ratas viejas, volviendo los niveles de SIRT1 a valores próximos a los de ratas jóvenes. Por lo que los tratamientos con estos polifenoles parecen revertir el efecto del envejecimiento sobre SIRT1 en hipocampo. Además, se estudió el efecto del resveratrol en estriado y corteza frontal, donde se observó el mismo efecto beneficioso que en hipocampo, es decir una recuperación de los niveles de SIRT1 en ratas viejas. En conjunto estos resultados indican que los tratamientos con polifenoles revierten el efecto del envejecimiento sobre SIRT1. En la misma línea que los polifenoles, se han detectado efectos similares con otros tratamientos como la suplementación con vitamina E (Wu y cols., 2006) o la restricción calórica (Quintas y cols., 2012) o con el compuesto SRT3657 activador de sirtuínas, que se ha visto favorecen la recuperación de los niveles de SIRT1 y previenen el estrés oxidativo en hipocampo de ratas viejas, preservando la estructura y funcionalidad sináptica del tejido contra la neurodegeneración, lo que a su vez contribuye a la conservación de las capacidades cognitivas (Gräff y cols., 2013). En contraposición, la ausencia de SIRT1 provoca un deterioro en las funciones cognitivas, incluyendo memoria y aprendizaje (Michán y cols., 2010); de esta forma, la activación de SIRT1 a través de tratamientos con polifenoles puede ser una forma de prevenir el deterioro cognitivo en el envejecimiento.

Aún no se conoce la causa exacta que origina que los polifenoles aumenten los niveles SIRT1. Alguno de los motivos podría ser que al ser moléculas antioxidantes (Pandey y Rizvi, 2009) impidan el daño oxidativo en la proteína, favoreciendo que los niveles de SIRT1 no decaigan en el envejecimiento. En este caso el efecto sería el de impedir el descenso de SIRT1. Pero también podría ocurrir que actuaran a nivel transcripcional, directamente sobre la expresión de SIRT1 o indirectamente a través de otras vías de señalización relacionadas con la expresión de SIRT1, favoreciendo la síntesis de la proteína. En este sentido hay estudios como el de Mannari y cols., 2010 que indican que el resveratrol es inductor de la sobreexpresión de SIRT1. También puede ser que los efectos que observamos se deban a una combinación de ambos mecanismos. Son necesarios más estudios al respecto. Una de las limitaciones de nuestros experimentos, es que si bien observamos efectos, no sabemos si estos son debidos a un mecanismo de acción indirecta de los polifenoles sobre SIRT1 o a la acción directa de los polifenoles sobre la enzima, tal como ocurre en los experimentos *in vitro* de Hubbar y colaboradores, en el año 2013, que describieron que los STACs como el resveratrol, la quercetina y otros polifenoles, pueden regular la actividad

de SIRT1, mediante la activación alósterica, uniéndose al aminoácido Glu²³⁰ presente en el extremo N-terminal de SIRT1.

Otro mecanismo de SIRT1 que también se estudió en este trabajo, fue su fragmentación proteolítica. En condrocitos articulares humanos se ha descrito que tras la exposición a factores de estrés, como pueden ser las citoquinas inflamatorias TNF- α o IL-1 β , se produce la fragmentación proteolítica de SIRT1, dando lugar a la formación de un fragmento inactivo de 75 kDa que se mantiene estable (Dvir-Ginzberg y cols., 2011). El proceso de fragmentación está relacionado con un mecanismo protector de muerte celular por apoptosis inducida por estas señales inflamatorias (Oppenheimer y cols., 2012).

En referencia al fragmento de 75 kDa, en este trabajo se observó que la reducción de SIRT1 (110 kDa) en el envejecimiento está acompañada de la reducción de los niveles del fragmento de 75 kDa. Sin embargo, cabe destacar que la proporción en la que disminuyen ambas formas de la proteína, es diferente. Así en el envejecimiento se produce una disminución mayor de la proteína nativa, que del fragmento de 75 kDa. Esto determina que el índice de fragmentación (SIRT1 75 kDa/ SIRT1 110 kDa) sea mayor en ratas viejas que en jóvenes. Como se ha descrito que este fragmento está relacionado con procesos inflamatorios (Dvir-Ginzberg y cols., 2011; Oppenheimer y cols., 2012), estos resultados estarían en consonancia con la presencia de un estado proinflamatorio durante el envejecimiento, donde las células podrían protegerse posiblemente mediante el mecanismo de fragmentar SIRT1, preservando el fragmento de 75 kDa. Estos resultados coinciden en las regiones de hipocampo, estriado y corteza frontal, que son las relacionadas con los procesos cognitivos. En cambio en corteza parietal, no se alteran los niveles de SIRT1 y tampoco el índice de fragmentación. Por lo que podríamos aplicar también en este punto la idea de que son las regiones relacionadas con los procesos cognitivos las más afectadas por los procesos inflamatorios y el envejecimiento.

Por otro lado, centrándonos en el estudio del hipocampo se observó que los tratamientos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina al aumentar los niveles de SIRT1 también aumentan los niveles del fragmento de 75 kDa. Sin embargo, en este caso el índice de fragmentación es menor que en ratas viejas, indicando menos fragmentación de la proteína SIRT1 tras los tratamientos. Esto podría estar relacionado con que los polifenoles reduzcan el estado inflamatorio de las células, lo que determine un descenso de la fragmentación de SIRT1.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo indican que los polifenoles exhiben sus propiedades beneficiosas a través de un conjunto de mecanismos (**Figura 78**). Tienen potencial para reducir la sobreactivación de la neuroinflamación asociada al envejecimiento, reduciendo la

expresión y acetilación de NF-κB; esto último posiblemente mediante el aumento de los niveles de SIRT1, en regiones claves para los procesos cognitivos. El aumento de SIRT1 no solo implica una disminución de la neuroinflamación, sino que también se relaciona con la regulación de la funcionalidad de los procesos cognitivos, ya que SIRT1 regula la expresión de neurotrofinas implicadas en la morfología y funcionalidad de las sinapsis, por tanto regula la plasticidad sináptica, que afecta a las funciones cognitivas (Michán y cols., 2010; Gao y cols., 2010; Zocchi y Sassone-Corsi, 2012; Ng y cols., 2015). Por ello, tras la activación de SIRT1 se han encontrado efectos neuroprotectores en enfermedades neurológicas agudas y crónicas (como isquemia cerebral, daño axonal, Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple) (Zhang y cols., 2011, Herskovits y Guarante, 2014). Esto va acompañado de los efectos antioxidante de los polifenoles a nivel cerebral (Bastianetto y cols., 2000), que previenen la oxidación de enzimas como TPH y TH; y de la inhibición de la enzima MAO-A, lo que en conjunto favorece el aumento de síntesis y acumulación de monoaminas en regiones claves para los procesos cognitivos y motores. Estos mecanismos, de forma sinérgica, podrían ser la causa de los efectos de mejora sobre las capacidades cognitivas y motoras, que se observan en este estudio, tras los tratamientos con los compuestos polifenólicos resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina.

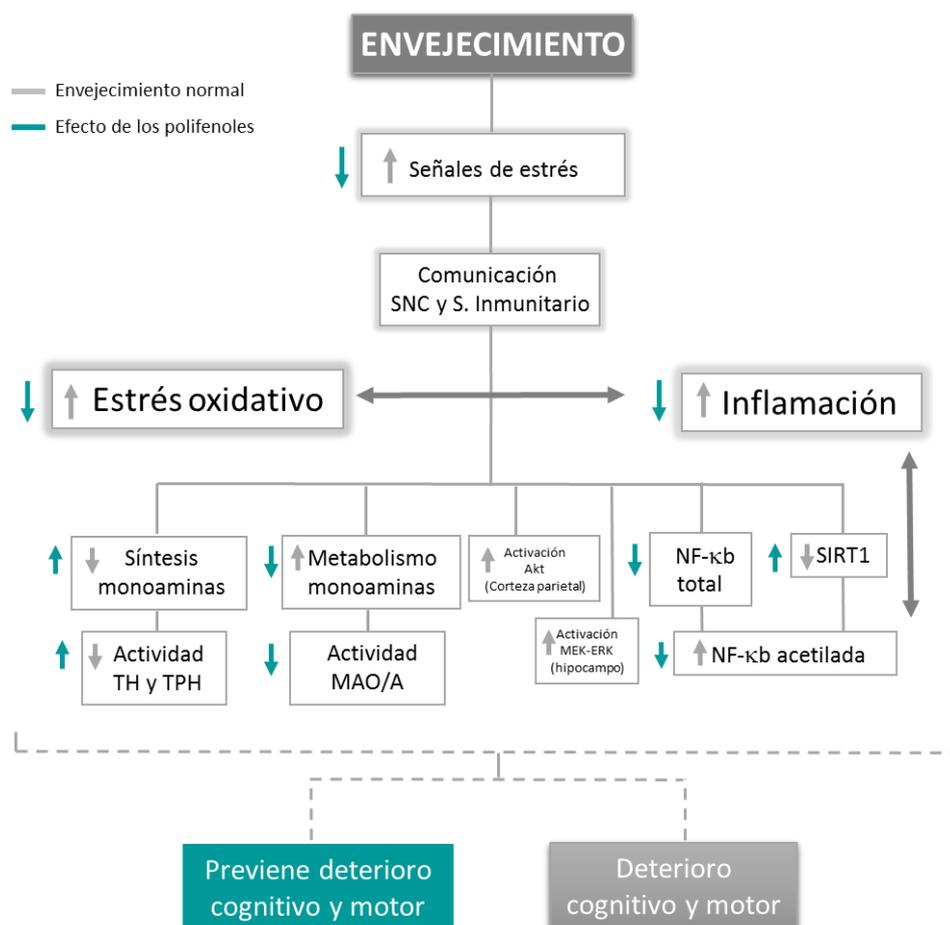


Figura 78. Esquema de los efectos del envejecimiento y de los tratamientos con polifenoles en los diferentes mecanismos estudiados durante este trabajo.

5.5 CONSIDERACIONES FINALES Y DIRECCIONES FUTURAS

Los polifenoles se están posicionando como nuevos agentes terapéuticos antienvjecimiento, como consecuencia de sus efectos beneficiosos a nivel cerebral y de mejora de la salud general del organismo, pudiendo ser moléculas importantes para desarrollar una nueva generación de fármacos antienvjecimiento (Casadesus y cols., 2002; Spencer y cols., 2012). Para considerar los polifenoles como un tratamiento alternativo en el envjecimiento son necesarias más investigaciones en animales y humanos. Aunque existen algunos problemas prácticos para trasladar los estudios hechos en animales a humanos (Smoliga y cols., 2012). Hasta el momento las agencias reguladoras de medicamentos no reconocen el envjecimiento como una patología, por lo que probar los polifenoles a nivel clínico conlleva dificultades prácticas (Hubbard y cols., 2014). Existen diferentes ensayos clínicos que estudian el efecto de los polifenoles en determinadas patologías (Markus y Morris, 2008; Macready y cols., 2009; Tomé-Carneiro y cols., 2013; Hubbard y cols., 2014). Sin embargo, hacen falta más estudios en humanos durante el envjecimiento normal, ya que son escasos los estudios clínicos que estudian el efecto de los polifenoles a nivel cerebral en individuos sanos durante esta etapa de la vida. En el caso del resveratrol encontramos dos estudios uno en fase I y otro en fase III, ninguno para la silimarina, y uno para la quercetina y la naringenina (para más información sobre los estudios clínicos existentes hasta el momento se puede consultar la base de datos <https://clinicaltrials.gov/>).

Se debería estudiar la efectividad de los tratamientos con polifenoles, teniendo en cuenta factores claves como son la biodisponibilidad, el metabolismo y la toxicidad de estos compuestos al administrarlos en diferentes dosis y/o fórmulas a corto y largo plazo, realizando estudios clínicos con un número grande de pacientes. Estos estudios permitirían completar los conocimientos sobre el mecanismo de acción por el cual los polifenoles y sus metabolitos son beneficiosos durante el envjecimiento.

Los estudios hechos hasta el momento en animales indican que la efectividad de los polifenoles, está limitada por su baja biodisponibilidad, su rápido metabolismo (Felgines y cols., 2000; Juan y cols., 2002; Baur y cols., 2006 a y b; Pandey y Rizvi, 2009), y a una absorción intestinal incompleta (Andlauer y cols., 2000; Kuhnle y cols., 2000), que además presenta variaciones entre individuos (Walle y cols., 2004; Boocock y cols., 2007). Aunque al respecto hay controversia, ya que hay estudios que indican que el resveratrol se metaboliza a los 30 minutos después de una administración intravenosa (Walle y cols., 2004), otros indican que se metaboliza a los 8-14 min (Marier y cols., 2002; Asensi y cols., 2002), y otros detectan resveratrol en plasma 24 h después de una administración oral con ausencia de metabolitos del resveratrol (Juan y cols., 2002 y 2005), e incluso hay estudios que explican que el resveratrol se une con proteínas específicas como la

albumina, como una forma de quedar en reserva, pudiéndose detectar *in vivo* en plasma hasta 72 horas después de una administración oral (Vitrac y cols., 2003; Pervaiz y cols., 2009). Lo que sí se sabe es que durante la absorción, los polifenoles son modificados en el intestino y después en el hígado, mediante conjugación, metilación, sulfatación y/o glucuronización, con diferencias según la edad y también del tejido, donde dependiendo de cuál sea tienen efectos diferentes (Day y cols., 2001; Holst y cols., 2008). De los polifenoles analizados durante el estudio que presentamos, el resveratrol es el que se ha investigado con mayor profundidad, e incluso se ha propuesto un modelo de farmacocinética para predecir las concentraciones de resveratrol y sus metabolitos presentes en plasma (Colom y cols., 2011). En el caso del resveratrol se ha descrito que es absorbido mediante difusión simple en los enterocitos donde se metaboliza en glucuronido y sulfato, que después son secretados al lumen intestinal mediante transportadores específicos (proteína asociada a la resistencia a multidrogas (MRP2) y proteína resistente al cáncer de mama (BCRP) (Alfaras y cols., 2010; Juan y cols., 2010 a; Planas y cols., 2012), que pertenecen a la familia de transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) cuya función es controlar el eflujo de sustancias en el intestino (Murakami y Takano, 2008). El mismo autor desarrolla un método mediante el uso de la técnica de HPLC para cuantificar los niveles de resveratrol y sus metabolitos en plasma, cerebro, testículos, hígado, pulmones y riñones después de una administración intravenosa de resveratrol, y detectan que 90 min después de la administración las concentraciones más altas de resveratrol y sus metabolitos están presentes en riñones y las más bajas en el cerebro (Juan y cols., 2010 b). Se han encontrado 5 metabolitos diferentes de resveratrol en orina de humanos (resveratrol monosulfato, dos formas isoméricas de resveratrol monoglucuronido, dihidroresveratrol monosulfato y dihidroresveratrol monoglucuronido, estos dos últimos formados por la acción de la microflora) con una vida media en plasma de 9.2 h, que en sangre adquieren niveles más altos que la propia molécula de resveratrol sin modificar (Baur y Sinclair, 2006 b). Algunos metabolitos tienen capacidad de activar SIRT1 y inhibir la COX (Bauer y cols., 2006 a). Por lo que a lo mejor parte de sus efectos son debidos a sus metabolitos, ya que el organismo está más expuesto a sus metabolitos que a la propia molécula (Walle y cols., 2004; Baur y cols., 2006 b). También se debe reconocer que es difícil identificar todos los metabolitos de los polifenoles, así como la interacción que pueda existir entre ellos y su actividad biológica (Setchell y cols., 2003), ya que los efectos y los metabolitos que se forman son diferentes dependiendo de si es una administración directa o por medio de la dieta. Así, por ejemplo el vino contiene resveratrol y quercetina, que en el hígado y en el duodeno impide que el resveratrol se metabolice y se sulfata, afectando la formación de los metabolitos (De Santi y cols., 2000), por lo que los efectos beneficiosos del vino pueden ser debido a la acción combinada de estos compuestos (Baur y Sinclair, 2006 b).

Muchos de los efectos beneficiosos atribuidos a los polifenoles se han obtenido a partir de estudios *in vitro*, que utilizan concentraciones de polifenoles no fisiológicas, haciendo que sea difícil extrapolar estos resultados a situaciones *in vivo*. Por ejemplo, *in vitro* con concentraciones de 32 nM a 200 μ M de resveratrol consiguen activar SIRT1 (Howitz y cols., 2003, Bauer y Sinclair y cols., 2006 b). *In vivo* conseguir una concentración mínima de 10 mM en plasma es difícil (Borriello y cols., 2014), sin embargo se ha visto en ratones que concentraciones de 0,5 mM son suficientes para observar efectos beneficiosos mediados por SIRT1 (Parker y cols., 2005), porque posiblemente los metabolitos del resveratrol son más potentes actuando como STACs que el propio resveratrol (Wenzel y cols., 2006).

A la hora de estudiar la efectividad de una determinada dosis, se debe tener en cuenta la toxicidad. No se ha determinado aún la dosis máxima tolerable de los polifenoles que hemos estudiado, son necesarios más estudios toxicológicos, pero para el caso del resveratrol en ratas Sprague-Dawley se ha llegado hasta una dosis oral de 300 mg/kg/día durante 28 días sin detectar efectos adversos. Es a partir de 1 g/kg/día de peso corporal aproximadamente cuando en las mismas condiciones citadas anteriormente, se comienzan a observar efectos adversos (Crowell y cols., 2004). En humanos se han hecho estudios clínicos donde se han administrado a individuos sanos dosis únicas de hasta 5 g de resveratrol via oral (Boocock y cols., 2007), y en otro estudio hasta 150 mg de resveratrol via oral seis veces al día durante dos días (Almeida y cols., 2009), en ambos estudios se observó una buena tolerancia del polifenol.

Como los polifenoles están presentes en la dieta habría que estudiar a que concentraciones fisiológicas se llega a partir de la dieta, estudiando cantidades naturales de polifenoles en la dieta y también el efecto del consumo de dietas enriquecidas con polifenoles. Por ejemplo, la concentración de resveratrol en el vino varía dependiendo de la variedad de la uva y de la región de la que procede (Goldberg y cols., 1995), pero se ha llegado a detectar hasta un máximo de 14,3 mg/L (62,7 μ M) de resveratrol en el vino tinto (Planas y cols., 2011). Para extrapolar las dosis de animales a humanos se debe utilizar un factor de conversión que tiene en cuenta la superficie corporal (Reagan-Shaw y cols., 2008). Así, la dosis de resveratrol en humanos equivalente a los 20 mg/kg administrada en rata, es de 3,24 mg/kg; lo que supondría 194,4 mg de resveratrol para una persona de 60 kg de peso. Para alcanzar esta dosis con vino se debería ingerir una cantidad excesiva de éste, que contrarrestaría cualquier efecto positivo del resveratrol. Sin embargo, esta dosis se podría administrar por vía oral a través de pastillas.

También es necesario determinar si existen factores genéticos que puedan explicar las diferencias de biodisponibilidad y respuestas fisiológicas después de tratamientos con polifenoles entre individuos. Así como establecer si los polifenoles pueden tener efectos aditivos o sinérgicos entre

ellos cuando están presentes en la dieta como señalan algunos estudios (Leikert y cols., 2002; Pignatelli y cols., 2006) y en combinación con otras terapias en el organismo.

Para continuar con el estudio del mecanismo de acción de los polifenoles se podría ampliar el estudio de las vías de señalización implicadas en inflamación como son PI3K/Akt/mTOR, MAPK y NF- κ B, estudiando otras regiones y condiciones experimentales, ya que por lo que se ha observado hasta el momento, la regulación de las respuestas inflamatorias por los polifenoles es más compleja que la simple supresión de las respuestas inflamatorias (Baur y Sinclair, 2006 b). Se ha visto *in vitro* que los STACs como el resveratrol activan directamente SIRT1 por medio de un mecanismo de modulación alostérico (Hubbar y cols., 2013). Sin embargo, *in vivo* se desconoce la acción de los STACs sobre SIRT1. Por lo que sería interesante determinar si los efectos de los tratamientos con polifenoles a nivel comportamental y bioquímico, se deben a un mecanismo de acción directa sobre la enzima SIRT1 o a efectos en otras moléculas que activen SIRT1. Así, el conocimiento del mecanismo de acción de los polifenoles ayudaría en el diseño de nuevas drogas y terapias antienvjecimiento más específicas y efectivas.

6. CONCLUSIONES

1. El envejecimiento empeora la memoria y el aprendizaje espacial, así como la memoria episódica y la coordinación motora en ratas. Los tratamientos crónicos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina, contrarrestan estos efectos del envejecimiento, mejorando ambos tipos de memoria y la coordinación motora, sin que se vean afectados parámetros fisiológicos generales como el peso, la ingesta, la temperatura y la actividad locomotora. Además los tratamientos crónicos con silimarina, quercetina y naringenina mejoran el aprendizaje viso-espacial.
2. El envejecimiento provoca un declive en los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos en áreas cerebrales implicadas en los procesos cognitivos y motores, que se manifiesta por una reducción en los niveles de NA en el hipocampo, DA en estriado y 5-HT en hipocampo y estriado de rata, en relación con una disminución de la actividad de las enzimas limitantes de la síntesis de dichos neurotransmisores (TH y TPH). Los tratamientos crónicos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina aumentan la síntesis y acumulación de estos neurotransmisores monoaminérgicos en estas regiones cerebrales. Parte de los efectos de estos tratamientos son debidos a un aumento en la actividad de las enzimas limitantes de la síntesis de monoaminas, TH y TPH-2 y a la inhibición de la enzima MAO-A. El análisis en la glándula pineal puso de manifiesto también un aumento en la actividad de la enzima TPH-1.
3. En la corteza parietal durante el envejecimiento se produce una activación constitutiva de Akt que no parece afectar la activación de mTOR. Estos resultados no se observan en el hipocampo y no son afectados por el tratamiento con resveratrol.
4. El envejecimiento provoca una sobreexpresión de las proteínas de la vía de las MAPK en el hipocampo, que podría relacionarse con un aumento del estado proinflamatorio durante el envejecimiento. Sin embargo, los efectos del tratamiento con resveratrol no parecen estar relacionados con la prevención de estas señales inflamatorias.
5. El envejecimiento disminuye los niveles de SIRT1 (110 kDa) y su fragmento de 75 kDa en áreas implicadas en los procesos cognitivos. Los tratamientos crónicos con resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina revierten los efectos del envejecimiento, provocando que los niveles de SIRT1 (110 kDa) y su fragmento de 75 kDa vuelvan a valores próximos a los de las ratas jóvenes.
6. El envejecimiento no modifica los niveles totales de NF- κ B, ni su estado de fosforilación en hipocampo. Sin embargo, aumenta los niveles de NF- κ B acetilada. Los tratamientos con los polifenoles resveratrol, silimarina, quercetina y naringenina disminuyen de forma diferencial la expresión de NF- κ B y los niveles de NF- κ B acetilada.

7. Las mejoras observadas en los procesos cognitivos y motores tras los tratamientos con polifenoles en ratas viejas, podrían explicarse en parte por el aumento de los niveles de SIRT1, pudiendo ser uno de los factores que favorecen la disminución de la acetilación de la proteína NF- κ B; lo que estaría relacionado con las propiedades antiinflamatorias de los polifenoles descritas por otros autores.

7. ANEXOS

A continuación se presenta una lista de las publicaciones, manuscritos y comunicaciones en congresos relacionadas con la temática de la tesis.

Publicaciones

Sarubbo, F., Ramis, M., Aparicio, S., Ruiz, L., Esteban, S., Miralles, A., y Moranta, D. (2015). Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats. *Age*, 37(3), 9777.

Manuscritos

Sarubbo, F., Ramis, MR., Kienzer, C., Aparicio, S., Esteban, S., Miralles, A., Moranta, D. Chronic silymarin, quercetin and naringenin treatments increase monoamines synthesis and hippocampal SIRT1 levels improving cognition in aged rats.

Sarubbo, F., Ramis, MR., Aparicio, S., Esteban, S., Moranta, D., Miralles, A. Chronic resveratrol treatment modulates SIRT1 and inflammation-associated signaling pathway in aged rats.

Comunicaciones en congresos

Sarubbo, F., Ramis, MR., Miralles, A., Esteban, S., Moranta, D. Effects of chronic polyphenol treatments on SIRT1 levels in hippocampus of aged-rats. 10th FENS forum of Neuroscience, Copenhaguen, Dinamarca, 2-6 julio 2016.

Miralles, A., Sarubbo, F., Ramis, MR., Aparicio, S., Esteban, S., Moranta, D. Effects of resveratrol on SIRT1 expression and NF-kB acetylated levels in aged rats. FEPS 2015, Kaunas, Lituania, 26-29 agosto 2015.

Sarubbo, F., Moranta, D., Ramis, MR., Kienzer, CV., Esteban, S., Miralles, A. SIRT1 and monoamine levels in hippocampus of aged-rats after chronic polyphenol treatments. FEPS 2015, Kaunas, Lituania, 26-29 agosto 2015.

Moranta, D., Sarubbo, F., Ramis, MR., Aparicio, S., Miralles, A., Esteban S. Chronic resveratrol treatment effect on central monoamines synthesis and cognition in aged rats. XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF), Granada, España, 24-26 septiembre 2014.

Ramis, MR., Sarubbo, F., Terrasa, JL., Aparicio, S., Moranta, D., Miralles, A., Esteban, S. Effects of caloric restriction and resveratrol on cognitive and motor abilities. XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF), Granada, España, 24-26 septiembre 2014.

Esteban, S., Ramis, M., Sarubbo, F., Ruiz, L., Miralles, M., Miralles, A. Improving effects of flavonoids on working memory in radial maze test in aged rats. 9th FENS forum of Neuroscience, Milán, Italia, 5-9 julio 2014.

Miralles, A., Sarubbo, F., Ramis, M., Terrasa, JL., Aparicio, S., Esteban, S. Silymarin, quercetin and naringenin improve the novel object recognition memory in old rats. 9th FENS forum of Neuroscience, Milán, Italia, 5-9 julio 2014.

Sarubbo, F., Ramis, M., Terrasa, JL., Moranta, D., Esteban, S., Miralles, A. Evaluation of spatial learning in aged flavonoids-treated rats by barnes maze test. 9th FENS forum of Neuroscience, Milán, Italia, 5-9 julio 2014.

Rial, RV., Sarubbo, F., Colom, C., Ramis, M., Bestard, J., Ruiz, A., Miralles, A., Esteban, S. Improving effects of resveratrol chronic treatment on cognitive ability in aged rats. Federation of European physiological societies (FEPS), Estambul, Turquía, 20-25 septiembre 2011.

Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats

F. Sarubbo · M. R. Ramis · S. Aparicio · L. Ruiz ·
 S. Esteban · A. Miralles · D. Moranta

Received: 18 December 2014 / Accepted: 10 April 2015
 © American Aging Association 2015

Abstract Resveratrol is a polyphenol exhibiting antioxidant and neuroprotective effects in neurodegenerative diseases. However, neuroprotective properties during normal aging have not been clearly demonstrated. We analyzed the *in vivo* effects of chronic administration of resveratrol (20 mg/kg/day for 4 weeks) in old male rats (Wistar, 20 months), on tryptophan hydroxylase (TPH) and tyrosine hydroxylase (TH) activities which mediate central monoaminergic neurotransmitters synthesis, and besides, on hippocampal-dependent working memory test (radial maze). Our results show an age-related decline in neurochemical parameters that were reversed by resveratrol administration. The resveratrol treatment enhances serotonin (5-HT) levels in pineal gland, in hippocampus, and in striatum, and those of noradrenaline (NA) in hippocampus and also dopamine (DA) in striatum. These changes were largely due to an increased activity of TPH-1 (463 % in pineal gland), TPH-2 (70–51 % in hippocampus and striatum), and TH (150–36 % in hippocampus and striatum).

Additionally, the observed hippocampal effects correlate with a resveratrol-induced restorative effect on working memory (radial maze). In conclusion, this study suggests resveratrol treatment as a restoring therapy for the impaired cognitive functions occurring along normal aging process, by preventing 5-HT, DA, and NA neurotransmission decline.

Keywords Resveratrol · Aging · Brain · Monoamine synthesis · Cognition

Introduction

Resveratrol is a polyphenol found in grape skins, red wine, raspberries, blueberries, peanuts, and medicinal plants, such as *Polygonum cuspidatum* (Chen et al. 2007) with different beneficial effects on health, including prevention of cancer, cardiovascular diseases or ischemic injuries, and even extend the lifespan (for review, see Baur and Sinclair 2006). Resveratrol effects include antioxidant and anti-inflammatory effects but also has been reported to regulate the expression level and activity of different proteins associated with cell survival and ion channel regulation, between others (Bai et al. 2010; Baur and Sinclair 2006; Chen et al. 2007; Guarente and Franklin 2011). Evidences suggest that resveratrol also regulates neuronal function via a SIRT1-dependent mechanism (Araki et al. 2004; Baur 2010; Chuang et al. 2009), and mechanisms involving monoamine neurotransmission facilitation since resveratrol inhibits monoamine (MAO) catabolism and also

F. Sarubbo · M. R. Ramis · S. Aparicio · L. Ruiz ·
 S. Esteban · A. Miralles · D. Moranta
 Laboratorio de Neurofisiología, Departamento de Biología,
 Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la
 Salud, Universidad de las Islas Baleares (UIB), Ctra.
 Valldemossa Km 7,5, 07122 Palma de Mallorca, Spain

D. Moranta (✉)
 Laboratorio de Infección e Inmunidad, Fundación de
 Investigación Sanitaria de las Islas Baleares (FISIB)-Instituto
 de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa), Centro de
 Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias
 (CIBERES), Hospital Joan March, Mallorca, Spain
 e-mail: david.moranta@uib.es

Published online: 22 April 2015

 Springer

monoamine reuptake into presynaptic neurons (Xu et al. 2010; Yañez et al. 2006). Furthermore, resveratrol protective properties have been reported in neurodegenerative disease models (Li et al. 2014; Blanchet et al. 2008; Donmez et al. 2010; Lofruento et al. 2014; Albani et al. 2010; Wang et al. 2011) but have not been clearly demonstrated during normal aging (for review, see Baur 2010).

Nowadays, population aging is a major problem in developed countries, which has led to increase the prevalence of age-dependent diseases, such as Alzheimer's disease, depression, and other dementias. Biochemical changes occurring in aged brain are responsible of this age-associated cognitive impairment and are also crucial in the further development of these neurodegenerative diseases (Gareri et al. 2002; and for review, see Hodden and Gabrieli 2004). Central monoamines exhibit a marked decline in different brain regions as part of normal aging process (Esteban et al. 2010a, b; Luine et al. 1990; Miguez et al. 1999; Venero et al. 1991) which is responsible, at least partially, for the age-related cognitive impairment (Collier et al. 2004; Koprowska et al. 2004; Lemon and Manahan-Vaughan 2006; Meneses 1999; Murchison et al. 2004). Working memory declines in late adulthood (Payer et al. 2006; Borella et al. 2008) and is considered to be one of the main contributing factors of cognitive impairment in old age (Park et al. 2002). Therefore, it is not surprising that a number of studies have been investigating the trainability of working memory across the lifespan (Takeuchi et al. 2010; Morrison and Chein 2011; Shipstead et al. 2010).

SIRT1 activators (e.g., resveratrol) have emerged as a promising new treatment for age-related brain disorders since it has been reported to play a relevant role promoting learning (Chuang et al. 2009; Gao et al. 2010). Thus, the aim of this study was to examine the effects of chronic resveratrol administration in old rats on in vivo synthesis and metabolism of monoamines (5-HT, NA, and DA) in crucial brain regions for regulation of memory processing, in parallel to behavioral performance evaluation on working memory test.

Material and methods

Animals

Young (3 months, $n=8$) and old (20 months, $n=14$ distributed in control and resveratrol-treated group)

male Wistar rats (Harlan, Barcelona, Spain) were individually housed with free access to standard food (Panlab A04) and tap water, under controlled environmental conditions (20 ± 2 °C; 70 % humidity), in a sound-attenuated chamber, and maintained at 12-h light/dark photoperiod (lights on at 0800 h daily) with an average of 300 lux of indirect light provided from fluorescent lamps. Animals were daily handled for several days prior to starting tests to reduce stress during testing. Every 3–4 days during treatments, animals were weighted and the amount of food ingested was registered. All procedures were in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Directive 86/609/EEC) and in agreement with the Bioethical Committee of the University of Balearic Islands.

Drugs and reagents

All drugs and reagents were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis MO, USA). The following drugs were used for animal treatments: resveratrol *trans* isomer (3,4,5-trihydroxy-*trans*-stilbene), corn oil (delivery vehicle for resveratrol), and NSD-1015 (3-hydroxybenzylhydrazine dilydrochloride).

Drug treatments

Old rats were chronically treated with resveratrol (20 mg/kg/day for 30 days, i.p. at 0730 h; $n=6$) or vehicle (corn oil, 1 ml/kg/day for 30 days, i.p. at 0730 h; $n=8$), which represent the old control group. Young rats also received vehicle as old control ones. Administration route, dose, and administration time were set from a pilot study presented at the XXXVII Congress of the Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF, Granada, Spain 2014). Decision was taken trying to increase the reproducibility and significance of outcomes and to reduce side effects of manipulation during this long treatment. Note that assimilation/dissemination route for i.p. administration is similar to p.o. (Turner et al. 2011), which is the most common route for resveratrol administration.

All animals also received NSD 1015 (100 mg/kg, i.p. at 0730 h) 30 min before being sacrificed by decapitation. This administration was performed to measure the in vivo activity of TPH and TH, through accumulation of 5-HTP and DOPA respectively during these 30 min

(see "Memory behavioral test"). Brains were quickly removed and dissected on an ice-cold plate to separate pineal gland (1.2–1.3 mg), hippocampus (60–65 mg), and striatum (caudate-putamen) (15–20 mg), which were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until assays.

Temperature and activity recording during chronic treatments

Body temperature in old rats was continuously recorded to monitor resveratrol treatment effect. For this purpose, a temperature sensor (DS1921H Thermochron[®] iButtons[®], Maxim; sampling rate of 20 min) was implanted in the abdominal cavity of old rats through a simple surgery under isoflurane gas anesthesia (Abbott, Spain). The implantation of the sensor was performed 3 days before starting treatments.

Spontaneous motor activity was also continuously recorded in old rats during chronic treatments. Cages ($20 \times 20\text{-cm}^2$ diameter) equipped with two perpendicularly crossed infrared beams (placed at 70 mm high) were used. The movements of the animals were digitized by recording the number of beams crossed, which were accumulated during 15-min intervals and automatically stored in a computer for further analysis. Animals were also acclimated for several days before motor activity recording during the different treatments. Motor activity analysis was carried out with the integrated program for chronobiology "El Temps" (©Diez-Noguera, University of Barcelona).

Memory behavioral test

To evaluate the effects of chronic treatment with resveratrol on working memory during normal aging process, the spatial memory eight-arm radial maze test was used. All experiments were performed during the light period between 0900 and 1300 h. Rats were placed in the experimental room 30 min before the beginning of the trials.

The eight-arm radial maze (Panlab, S.L.) consisted of an octagonal central platform (32-cm diameter) with eight equally spaced radial arms (50 cm long, 12 cm wide). The maze was set in an experimental room with several external visual cues. Prior to memory test, animals were submitted to fasting to achieve a convenient motivational level. To test memory on radial maze, rats were free to visit the different arms to obtain food pellets

and trials were judged complete when rats had chosen all eight baited arms or spent 20 min in the trial (maximum time to achieve performance). The sum of nonvisited arms and repeated entry into arms was scored as a working memory error. The apparatus was cleaned with ethanol solution between trials. Rats movements were monitored via a digital video tracking system (LE 8300 with software SEDACOM v 1.3, Panlab, SL, Barcelona, Spain) (for further descriptions, see Esteban et al. 2010a, b; Ramis et al. 2013). Tests were performed before chronic treatments (initial test) and after chronic treatments.

TPH activity (synthesis of 5-HT) and TH activity (synthesis of DA and NA)

Transformation of tryptophan into 5-HTP is the limiting step in 5-HT synthesis which requires the TPH-2 isoform enzyme (tryptophan-5-monooxygenase, EC 1.14.16.4) in most of the brain and TPH-1 isoform enzyme in the pineal gland (Wälther et al. 2003). Regarding catecholamine synthesis (NA and DA synthesis), the limiting step is the transformation of tyrosine into DOPA which requires the TH enzyme (tyrosine-3-monooxygenase, EC 1.14.16.2). In this manner, the *in vivo* activity of rate-limiting enzymes in synthesis of 5-HT and catecholamines (TPH and TH, respectively) were determined by measuring the accumulation of their precursors (5-HTP and DOPA, respectively) within 30 min after inhibition of the aromatic L-amino acid decarboxylase (EC 4.1.1.28) by a maximally effective dose of NSD 1015 (3-hydroxybenzylhydrazine HCl, 100 mg/kg, *i.p.*). The administration of L-amino acid decarboxylase inhibitor, shortly before sacrifice, enables to determine tryptophan hydroxylase (TPH) and tyrosine hydroxylase (TH) activity in different brain areas, and quantify the pool of 5-HT, DA, or NA unaffected by recent synthesis and primarily stored within neurons. Furthermore, this method allows to determine levels of some monoaminergic metabolites that can reveal recent use of these neurotransmitters (Moranta et al. 2009).

Brain sample processing and chromatographic (HPLC-ED) analyses

Hippocampus and striatum brain regions were placed individually into cold tubes containing 1 ml of 0.4 M HClO_4 , 0.01 % K_2EDTA , and 0.1 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, and then

homogenized with an Ultra-Turrax homogenizer (Type Tp 18/10). Pineal glands were placed individually into cold tubes, homogenized by sonication for 10 s in 120- μ l volume. The homogenate was centrifuged at 40,000 \times g for 15 min at 4 °C, and supernatant was filtered through syringe filters 0.45- μ m pore size (Spartan-3, Sigma-Aldrich). Aliquots of the purified supernatants (10–20 μ l depending on the brain region) were subjected to HPLC on a reversed-phase column (Spherisorb S3 ODS1 C18; 3- μ m particle size range; 4.6 mm \times 10 cm, at 35 °C) coupled to a Tracer ODS2 C18 precolumn (2–5- μ m particle size range; Teknokroma, Barcelona, Spain). The mobile phase consisted of 0.1 M KH_2PO_4 , 2.1 mM octane sulfonic acid, 0.1 mM K_2EDTA , 2 mM NaCl, and 12 % (v/v) methanol (pH 2.7–2.8, adjusted with 85 % H_3PO_4), which were pumped at a flow rate of 0.8 ml/min with a Waters 600 solvent delivery system. The contents of precursor amino acids (5-HTP and DOPA), monoamines (5-HT, DA, and NA) and metabolites (5-hydroxy-indole acetic acid (5-HIAA) and homovanillic acid (HVA)) were detected electrochemically using a cell with a glassy working carbon electrode and an applied oxidation potential of +0.75 V against an in situ Ag/AgCl reference electrode (ISAAC; Waters 2465 Electrochemical Detector). The current produced was monitored by an interface (Waters busSAT/IN Module) connected to a digital PC. The concentrations of 5-HTP, DOPA, monoamine neurotransmitters, and metabolites in a given sample were calculated by interpolating the corresponding peak height into a parallel standard curve using the software Empower Pro (Waters). For representative chromatographic analyses, see Moranta et al. (2009).

Statistics

Results are normally expressed as mean \pm SEM of the number of determinations. One-way ANOVA followed by Scheffé's test was used for the statistical evaluations (or Fisher's test when indicated). Level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Body weight, temperature, and activity during chronic treatments

Weight of young animals increased during experiment (from 327 \pm 4.93 g at the beginning to 438 \pm 6.45 g at day

30). However, no significant changes were observed in old animal weight through the different treatments (Fig. 1a), neither control animals treated with corn oil (518 \pm 38 g at the beginning of treatment) nor resveratrol-treated rats (537 \pm 24 g also at the beginning of treatment). In accordance with these effects, resveratrol treatment did not alter the amount of food ingested by animals. The daily average food intake by old control group (14.8 \pm 1.5 g) was similar to that of resveratrol-treated rats (15.6 \pm 0.5 g).

All animals did suffer weight loss when were subjected to fasting (Fig. 1a). This fasting period was done to achieve a good motivational level for the radial maze test. Weight loss was similar in both groups (6.07 \pm 0.37 g in old animals treated with corn oil and 5.96 \pm 0.32 g in old rats treated with resveratrol) (Fig. 1a) and in young animals treated with corn oil (5.3 \pm 0.3 g; data not shown).

Similar to evolution of weight, the body temperature also showed no significant effect caused by resveratrol treatment in old animals. The daily mean temperature value for all animals was 36.9 \pm 0.04 °C (Fig. 1b).

Meanwhile, spontaneous motor activity of animals was chronobiologically analyzed during treatments to check possible side effects. Figure 1c shows a double-plotted actogram representative of old rats during experimental days. This graph is commonly used in circadian research to plot activity against time and shows the activity rest cycle of animals based upon a definable threshold. Actograms show that both old controls rats and resveratrol-treated ones were well entrained with the L/D cycle. Graphs shown in Fig. 1c are typical of nocturnal animals, with higher activity levels during dark period than during light period. No significant differences were observed between the two groups.

Effects of chronic resveratrol treatment on cognitive capacity

Working memory was assessed by the eight-arm radial maze test. Test performed prior to the chronic treatments showed a marked age-related impairment in working memory. Compared with young animals, old rats lingered more than double time to complete trials (Fig. 1d). After this initial radial maze test, old rats were randomly distributed in the two experimental groups: one received chronically corn oil, and the other one received resveratrol. Note that initial basal results for radial maze test from both groups were similar. Young rats also received

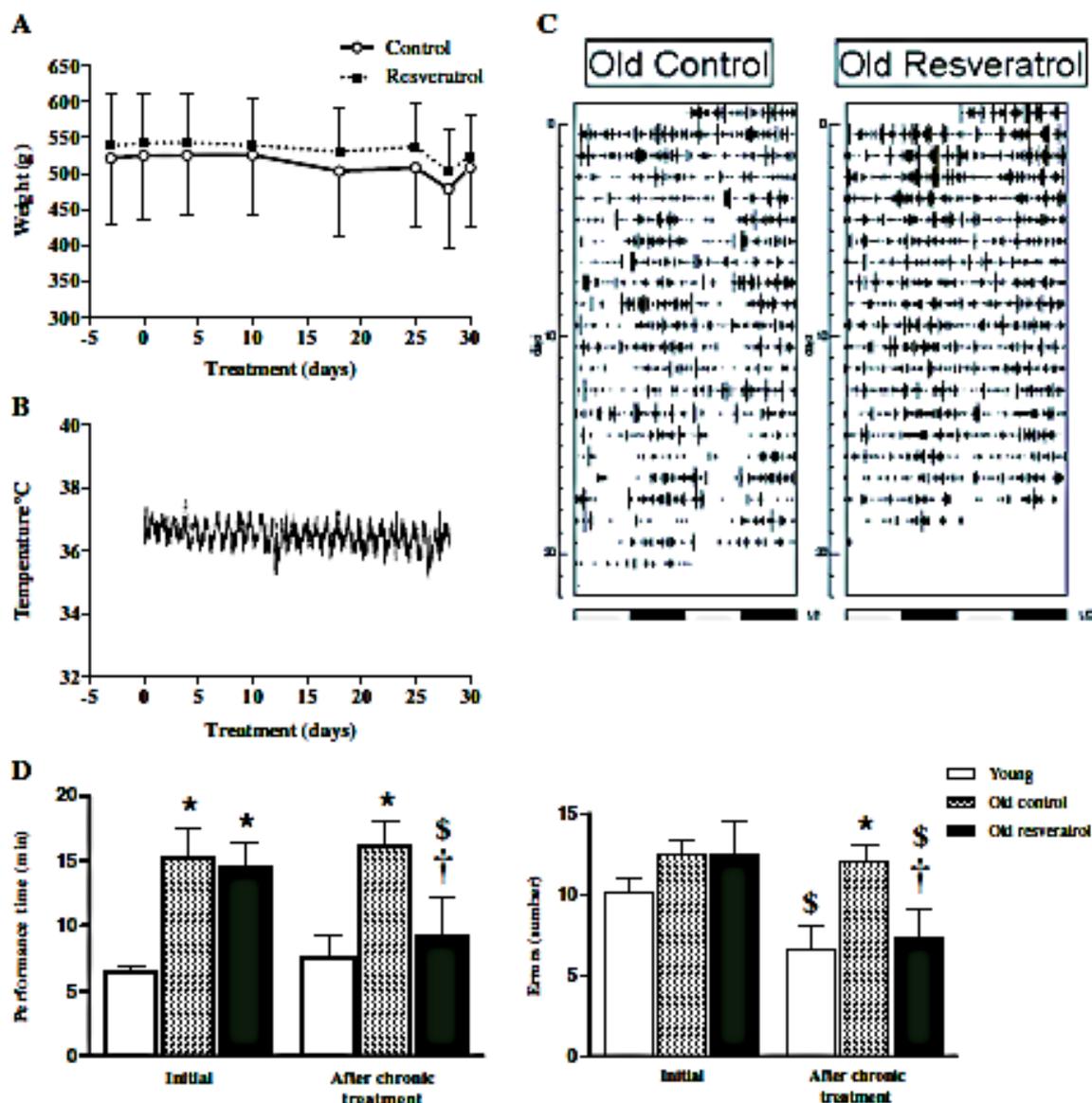


Fig. 1 **a** Body weight during chronic treatments. Dots represent body weight (mean \pm SEM; analyzed at 0900 h) of animals subjected to the different chronic treatments. Body weight reduction observed at day 28 is due to the fasting period performed to get a good motivational level for radial maze test. **b** Body temperature of rats during chronic treatments. Graph represents the evolution of the average body temperature in old rats during treatment: corn-oil-treated rats (solid line) and resveratrol-treated rats (broken line). **c** Synchronization of animals with the LD cycle during chronic treatments. Representative actogram of old animals during chronic treatment with corn oil or resveratrol. Data are presented as a double-plotted actogram. Animals were subjected to a 12/12 L/D

photoperiod. **d** Working memory task in aged rats assessed by eight-arm radial maze test. Bars represent (mean \pm SEM) time to complete the task (left graph) and total number of errors (sum of unvisited and revisited arms, right graph). Tests were performed before chronic treatment (initial) and after chronic treatment (resveratrol or corn oil). After initial radial maze test, old rats were randomly distributed in the two groups of chronic treatments. One-way ANOVA followed by Fisher's test was used for statistical evaluation: * $p\leq 0.05$, when compared with the young control group; † $p\leq 0.05$, compared to the old control group from. And, also t test $p\leq 0.05$, when compared each experimental group at the beginning and after chronic treatment.

chronic corn oil. The main goal of this study was to analyze the protective effect of exogenous administration of resveratrol on brain decline that normally occurs with aging and to correlate with the age-related cognitive decline.

Corn oil treatment did not impair radial maze test parameters, neither in young animals nor in older ones; only young animals made fewer errors than in the initial test. After the chronic treatments, old control rats showed no differences compared to the results obtained prior the treatment, and they committed almost double errors than young ones (Fig. 1d). However, chronic resveratrol treatment induced a memory enhancement. Old rats treated with resveratrol showed a reduced time to complete the trial (43 % reduction respect old control group), and additionally, they committed a reduced number of errors (unvisited plus repeatedly visited arms; 39 % reduction respect old control group; Fig. 1d).

These results suggest that chronic resveratrol treatment might aid to reduce the cognitive capacity descent that normally occurs as an aging consequence.

Effect of chronic resveratrol treatment on 5-HT synthesis and metabolism

The synthesis and metabolism of 5-HT was measured in regions enriched with serotonergic nerve terminals: hippocampus, striatum, and pineal gland. The synthesis rate of 5-HT was assessed by measuring accumulation of its precursor (5-hydroxytryptamine; 5-HTP) during 30 min after decarboxylase enzyme inhibition with NSD 1015. In this conditions, 5-HTP accumulation reflects the activity of the limiting enzyme TPH. As expected, there was less 5-HT synthesis (THP-2 activity measured as 5-HTP accumulation) in old rats hippocampus and striatum compared with young ones. Consistently, intraneuronal 5-HT and its metabolite 5-HIAA showed an age-dependent reduction (Fig. 2).

However, chronic resveratrol treatment increased 5-HT synthesis in old rats. The 5-HTP accumulation (TPH-2 activity) was higher in hippocampus (70 %) and striatum (51 %) in old rats treated with resveratrol, compared to old control rats treated with corn oil. Furthermore, 5-HT content also increased after resveratrol treatment (55 and 76 % in hippocampus and striatum, respectively), while 5-HIAA levels were reduced after this treatment with resveratrol (22 and 48 % in hippocampus and striatum, respectively) (Fig. 2). Taken together, these results indicate a 5-HT synthesis

acceleration and reduction of its metabolism in these brain regions from old animals treated with resveratrol. Similarly, chronic resveratrol treatment increased significantly 5-HT synthesis in the pineal gland of old rats, but in this case reflecting TPH-1 activity. Resveratrol treatment increased more than fourfold the 5-HTP accumulation in old animals, almost reaching levels of young animals, and also increased more than sixfold the 5-HT content. However, resveratrol treatment did not modify pineal gland 5-HIAA levels (Fig. 2).

Effect of chronic resveratrol treatment on catecholamine synthesis and metabolism

Similarly to the effect on serotonergic systems, NA synthesis rate in hippocampus decreased with age, showing less DOPA accumulation (TH activity) and NA content in old rats (Fig. 3, left graphs). This method did not allow to quantify any noradrenaline metabolite.

Similar age-dependent reduction in TH activity was observed in striatum, but in this case reflecting DA synthesis, with a lower DOPA accumulation and less DA content and metabolite HVA levels in old rats (Fig. 3, right graphs).

The hippocampal noradrenergic system also showed a protective effect by resveratrol treatment. This treatment induced a significant increase in DOPA accumulation (150 %) and NA content (57 %) in hippocampus. Similar effects were observed for dopaminergic system in striatum, since resveratrol treatment in old rats increased DOPA accumulation (36 %) and DA content (53 %) in striatum, while HVA metabolite levels did not change (Fig. 3).

Finally, there were no significant differences between the different groups in total content of DA in hippocampus (total content of DA in hippocampus of young rats was 151.2 ± 24.56 ng/g of wet tissue), and those of NA in striatum (total content of NA in striatum of young rats was 59.69 ± 17.22 ng/g of wet tissue). No significant decrease related with aging was observed in any of this two parameters.

Discussion

Results from the present study *in vivo* point out that chronic resveratrol administration might aid to delay or prevent deficits in monoamines and memory disabilities associated with aging process. Aging causes an

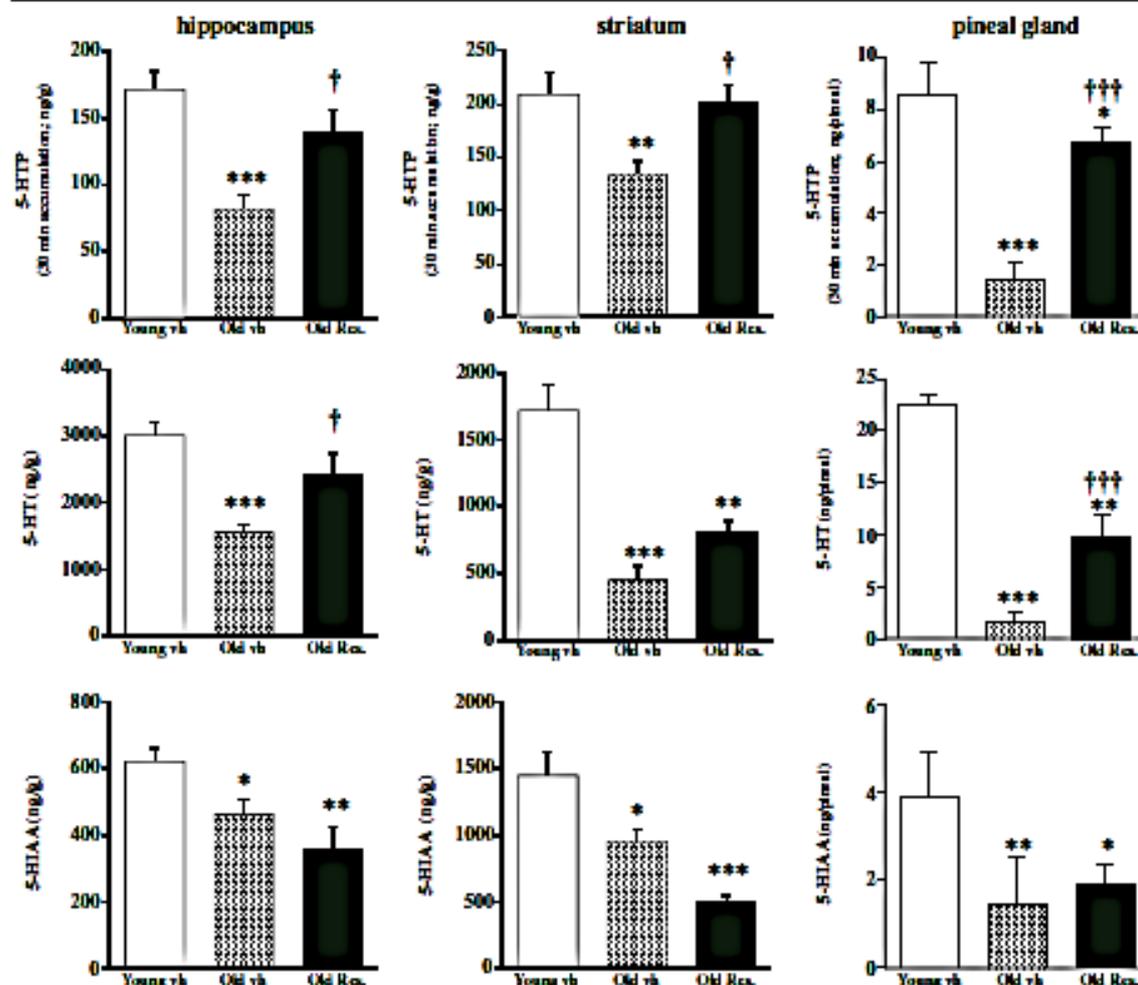


Fig. 2 Effect of chronic resveratrol treatment on serotonergic system in hippocampus, striatum, and pineal gland. Bars represent (mean±SEM in ng/g of wet tissue or total pineal gland) 5-HTP accumulation (during 30 min after decarboxylase inhibition), 5-HT tissue content, and 5-HIAA metabolite levels. One-way

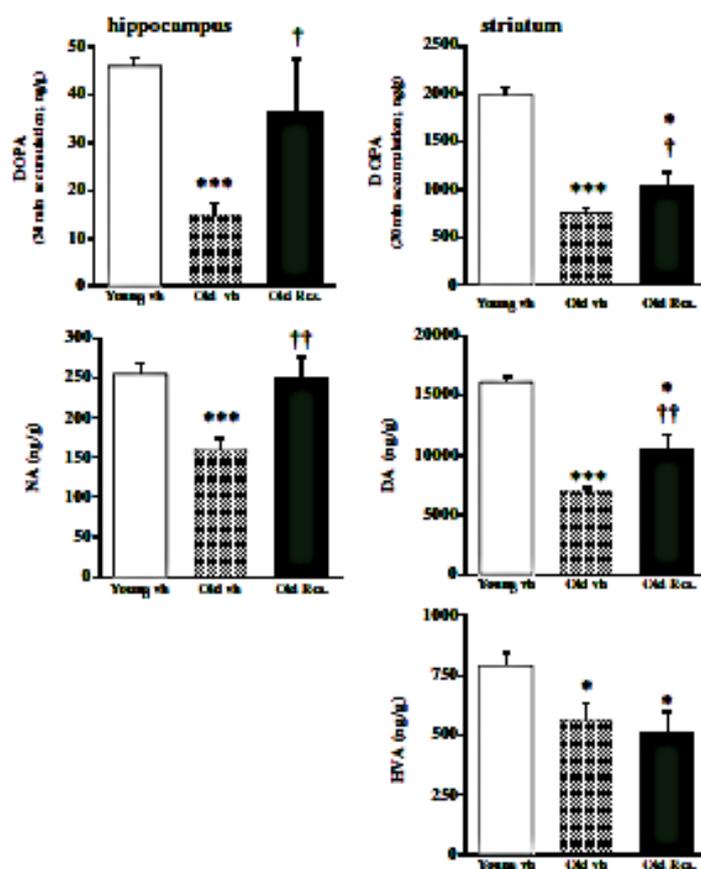
ANOVA followed by Scheffé's test was used for statistical evaluation: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ when compared with the young control group; † $p \leq 0.05$, †† $p \leq 0.001$ when compared to the old control group

impairment of brain monoaminergic systems. Resveratrol treatment did not alter physiological parameters in rats, such as food intake, body weight, temperature, or locomotor activity. However, this resveratrol treatment increased the brain 5-HT levels, in hippocampus, striatum, and pineal gland, and catecholamine levels in hippocampus and striatum in aged rats. These effects were largely due to an increased activity of the limiting enzymes in monoamines syntheses, TPH and TH. The 5-HTP and DOPA accumulation method is the most commonly used assay system to monitor the *in vivo* rate of tryptophan and tyrosine hydroxylation (TPH and TH

activity, respectively) in the brain (Moranta et al. 2009). TPH is known to exist in two isoforms: TPH-1 is mainly expressed in the pineal gland and in gut enterochromaffin cells, and TPH-2 is preferentially expressed in the rest of the brain where it plays a fundamental role in 5-HT synthesis (Walther et al. 2003). Our data refers to the activity of both isoforms on the synthesis of 5-HTP.

Monoamines have been linked to cognitive processes such as memory and learning. Memory processes are partially regulated by neuromodulatory activity of 5-HT, DA, and NA (González-Burgos and Fera-Velasco 2008; Kemp and Manahan-Vaughan 2008; Cools

Fig. 3 Effect of chronic resveratrol treatment on catecholaminergic system in hippocampus and striatum. Bars represent DOPA accumulation (during 30 min after decarboxylase inhibition), DA or NA tissue content, and HVA metabolites levels in striatum. One-way ANOVA followed by Scheffé's test was used for statistical evaluation: * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ when compared with the young control group; † $p \leq 0.05$, †† $p \leq 0.01$ compared to the old control group



2011), being the hippocampus and striatum two brain regions involved in the regulation of the memory processing (Adams et al. 2008; González-Burgos and Feria-Velasco 2008; Cools 2011). Neurochemical results from the present work are in good correlation with the improving effect of resveratrol treatment on working memory in the radial maze observed in the current work.

Our data confirm that during aging process occur a significant decrease in brain monoamines (Esteban et al. 2010a, b; Koprowska et al. 2004; Luine et al. 1990; Míguez et al. 1999; Moranta et al. 2014; Tsunemi et al. 2005; Venero et al. 1991). Old rats showed a significant decrease in 5-HT synthesis (in hippocampus and striatum), DA synthesis (in striatum), and NA synthesis (in hippocampus). These effects were also accompanied by a lower content of 5-HT, DA, and NA, and by reduced levels of metabolites (5-HIAA and HVA). The age-related decline in monoaminergic function in hippocampus and striatum is believed to be partially responsible

for memory disorders and for the prevalence of neurodegenerative diseases during senescence (Collier et al. 2004; Cools et al. 2011; Esteban et al. 2010a, b; Haider et al. 2014; Hussain and Mitra 2000; Luine et al. 1990; Míguez et al. 1999), which is in agreement with the age-related impairment in working memory that is found in this work (assessed by an hippocampal-dependent test, the eight-arm radial maze test).

The brain is the body tissue with the largest oxygen consumption, being extremely sensitive to oxidative damage. Furthermore, the activity of antioxidant enzymes undergo a significant age-related decrease in brain (Keller et al. 2005). Indeed, in both aged humans and rodents, age-related cognitive impairment and neurodegenerative changes have been correlated to oxidative damage accumulation in lipids, proteins, and nucleic acids, which could lead to the increased neurotransmitter systems' vulnerability to oxidative stress (Dias et al. 2007; Haider et al. 2014; see Butterfield

et al. 2006 for review). In this regard, it has been reported a reduced TPH and TH activities during normal aging brain that has been related to an inefficient phosphorylation and/or an oxidative damage of these enzymes (Cash et al. 1998; De la Cruz et al. 1996; Hussain and Mitra 2000). Considering these previous works, we suggest that the observed effects of resveratrol on monoamines could be due to a protective effect on these limiting enzymes (TPH and TH) against oxidizing agents, which could counteract the effect of aging (Rose et al. 2014; Wang et al. 2011). Similar protective effects of resveratrol on dopaminergic system has been reported against injuries caused by LPS, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), or 6-hydroxyl dopamine (Rose et al. 2014; Blanchet et al. 2008; Lofruento et al. 2014; Wang et al. 2011). Additionally, some works describe an increased TH expression due to resveratrol treatment, pointing out a SIRT1-mediated effect, which, in turn, could also imply histone deacetylation-mediated effects (Chen et al. 2007; Kumar et al. 2007; Ranney and Petro 2009; Tredici et al. 1999). Thus, SIRT1 activation could be part of the action mechanism for resveratrol pharmacological activities, including a cellular ROS scavenging effect (Araki et al. 2004; Li et al. 2014).

Finally, the observed increase in 5-HT content after resveratrol treatment could also be related to a reduced monoamine metabolism rate, by MAO-A inhibition and/or inhibition of monoamine reuptake (Xu et al. 2010; Yañez et al. 2006), which could be consistent with the observed reduction in 5-HIAA metabolite levels after resveratrol treatment. In contrast, HVA metabolite levels did not change after resveratrol treatment, reflecting the reported greater inhibition on MAO-A respect to the MAO-B (Yañez et al. 2006).

In summary, the observed effects by resveratrol treatment in the present work could be due to a combined effect that involves several mechanisms, pointing out the need to discriminate the significance of the different resveratrol effects.

Conclusion

Results from the present study demonstrate that treatment with resveratrol might aid to prevent the descent in 5-HT, DA and NA neurotransmission that occurs normally as a consequence of aging, and it might aid to

delay some aging-related diseases, which are emerging as the greatest health threats of the twenty-first century.

Acknowledgments This study was supported by grant Programa Pont La Caixa-UIB (7/2014) and by financial contribution of the Govern Balear (ECT 02509). Sarubbo F. was supported by UIB fellowship; Ramis M.R. was supported by PPU fellowship from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD) from Spain; and Ruiz L. was supported by a grant for collaboration also from MECD.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interests.

Compliance with Ethics Standards All procedures performed on animals were in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Directive 86/609/EEC) and in agreement with the Bioethical Committee of the University of Balearic Islands. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

References

- Adams W, Kusljic S, Van den Buuse M (2008) Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: effects on locomotor hyperactivity, prepulse inhibition and learning and memory. *Neuropharmacology* 55:1048–1055
- Alhani D, Polito L, Signorini A, Forloni G (2010) Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. *Biofactors* 36:370–376
- Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J (2004) Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305:1010–1013
- Bai Y, Mao QQ, Qin J, Zheng XY, Wang YB, Yang K, Shen HF, Xie LP (2010) Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Sci* 101:488–493
- Baur JA (2010) Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochim Biophys Acta* 1804:1626–1634
- Baur JA, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493–506
- Blanchet J, Longgré F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bonchti G, Martini MG (2008) Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1243–1250
- Borella E, Caretti B, De Beni R (2008) Working memory and inhibition across the adult life-span. *Acta Psychol (Amst)* 128:33–44
- Butterfield DA, Abdul HM, Newman S, Reed T (2006) Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. *NeuroRx* 3:344–357

- Cash CD (1998) Why tryptophan hydroxylase is difficult to purify: a reactive oxygen-derived species-mediated phenomenon that may be implicated in human pathology. *Gen Pharmacol* 30:569–574
- Chen LW, Wang YQ, Wei LC, Shi M, Chan YS (2007) Chinese herbs and herbal extracts for neuroprotection of dopaminergic neurons and potential therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6:273–281
- Chuang DM, Leng Y, Marinova Z, Kim HJ, Chiu CT (2009) Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci* 32:591–601
- Collier TJ, Greene JG, Felten DL, Stevens SY, Collier KS (2004) Reduced cortical noradrenergic neurotransmission is associated with increased neophobia and impaired spatial memory in aged rats. *Neurobiol Aging* 25:209–221
- Cools R (2011) Dopaminergic control of the striatum for high-level cognition. *Curr Opin Neurobiol* 21:402–407
- De La Cruz CP, Revilla E, Venero JL, Ayala A, Cano J, Machado A (1996) Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. *Free Radic Biol Med* 20:53–61
- Dias CP, De Lima MN, Torres JP, Dormelles A, Garcia VA, Scalco F, Guimarães M, Constantino L, Budni P, Dal-Pizzol F, Schöder N (2007) Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience* 146:1719–1725
- Dommez G, Wang D, Cohen DE, Guarente L (2010) SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell* 142:320–332
- Esteban S, Gamu C, Aparicio S, Moranta D, Barceló P, Fiol MA, Rial R (2010a) Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *J Pineal Res* 48:170–177
- Esteban S, Garau C, Aparicio S, Moranta D, Barceló P, Ramis M, Tesguermes JA, Rial R (2010b) Improving effects of long-term growth hormone treatment on monoaminergic neurotransmission and related behavioral tests in aged rats. *Rejuvenation Res* 13:707–716
- Gao J, Wang WY, Mao YW, Guff J, Guan JS, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC, Tsai LH (2010) A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466:1105–1109
- Gaerzi P, De Fazio P, De Sarro G (2002) Neuropharmacology of depression in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 1:113–134
- González-Burgos I, Feria-Velasco A (2008) Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res* 172:603–623
- Guarente L, Franklin H (2011) Epstein lecture: sirtuins aging, and medicine. *N Engl J Med* 364:2235–2244
- Haider S, Saleem S, Pervaiz T, Tabassum S, Batool Z, Sadir S, Liaquat L, Madiha S (2014) Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age* 36:1291–1302
- Hedden T, Gabrieli JD (2004) Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 5:87–96
- Hussain AM, Mitra AK (2000) Effect of aging on tryptophan hydroxylase in rat brain: implications on serotonin level. *Drug Metab Dispos* 28:1038–1042
- Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, Markesbery WR (2005) Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 64:1152–1156
- Kemp A, Manahan-Vaughan D (2008) Beta-adrenoceptors comprise a critical element in learning-facilitated long-term plasticity. *Cereb Cortex* 18:1326–1334
- Koprowska M, Krotewicz M, Romanuk A, Stzelczak M (2004) Age-related changes in fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64:131–142
- Kumar A, Naidu PS, Seghal N, Padi SS (2007) Neuroprotective effects of resveratrol against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Pharmacology* 79:17–26
- Lemon N, Manahan-Vaughan D (2006) Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 26:7723–7729
- Li J, Feng L, Xing Y, Wang Y, Du L, Xu C, Cao J, Wang Q, Fan S, Liu Q, Fan F (2014) Radioprotective and antioxidant effect of resveratrol in hippocampus by activating Sirt1. *Int J Mol* 15:5928–5939
- Lofruento DD, Nicolardi G, Ciarcilli A, De Nuccio F, La Pena V, Cao figlio V, Dragone T, Calvello R, Panaro MA (2014) Neuroprotective effects of resveratrol in an MPTP mouse model of Parkinson's-like disease: possible role of SOCS-1 in reducing pro-inflammatory responses. *Innate Immun* 20:249–260
- Luine V, Bowling D, Heams M (1990) Spatial memory deficits in aged rats: contributions of monoaminergic systems. *Brain Res* 537:271–278
- Meneses A (1999) 5-HT system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 23:1111–1125
- Míguez JM, Aldegunde M, Paz-Valiñas L, Recio J, Sánchez-Barceló E (1999) Selective changes in the contents of nor-adrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *J Neural Transm* 106:1089–1098
- Moranta D, Esteban S, García-Sevilla JA (2009) Chronic treatment and withdrawal of the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 modulate the sensitivity of presynaptic receptors involved in the regulation of monoamine syntheses in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 379:61–72
- Moranta D, Barceló P, Aparicio S, Gamu C, Sanubio F, Ramis M, Nicolau C, Esteban S (2014) Intake of melatonin increases tryptophan hydroxylase type 1 activity in aged rats: Preliminary study. *Exp Gerontol* 49:1–4
- Morrison AB, Chein JM (2011) Does working memory training work? The promise and challenges of enhancing cognition by training working memory. *Psychon Bull Rev* 18:46–60
- Murchison CF, Zhang XY, Zhang WP, Ouyang M, Lee A, Thomas SA (2004) A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* 117:131–143
- Park DC, Lautenschlager G, Hedden T, Davidson NS, Smith AD, Smith PK (2002) Models of visuospatial and verbal memory across the adult life span. *Psychol Aging* 17:299–320

- Payer D, Marshutz C, Sutton B, Helbank A, Welsh RC, Paik DC (2006) Decreased neural specialization in old adults on a working memory task. *Neuroreport* 17:487–491
- Ramis M, Sarubbo F, Sola J, Aparicio S, Gamu C, Miralles A, Esteban S (2013) Cognitive improvement by acute growth hormone is mediated by NMDA and AMPA receptors and MEK pathway. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry* 45:11–20
- Ranney A, Petto MS (2009) Resveratrol protects spatial learning in middle-aged C57BL/6 mice from effects of ethanol. *Behav Pharmacol* 20:330–336
- Rose KM, Parmar MS, Cavanaugh JE (2014) Dietary supplementation with resveratrol protects against striatal dopaminergic deficits produced by in utero LPS exposure. *Brain Res* 1573:37–43
- Shiptend Z, Redick TS, Engle RW (2010) Does working memory training generalize? *Psychol Belg* 50:245–276
- Takeuchi H, Taki Y, Kawashima R (2010) Effects of working memory training on cognitive functions and neural systems. *Rev Neurosci* 21:427–449
- Tredici G, Miloso M, Nicolini G, Galbiati S, Cavaletti G, Bertelli A (1999) Resveratrol, map kinases and neuronal cells: might wine be a neuroprotectant? *Drugs Exp Clin Res* 25:99–103
- Tsunemi A, Utsuyama M, Seidler BK, Kobayashi S, Hinkawa K (2005) Age-related decline of brain monoamines in mice is reversed to young level by Japanese herbal medicine. *Neurochem Res* 30:75–81
- Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vashinder MA (2011) Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50:600–613
- Veneto JL, Machado A, Cano J (1991) Turnover of dopamine and serotonin and their metabolites in the striatum of aged rats. *J Neurochem* 56:1940–1948
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtznagl H, Voits M, Fink H, Bader M (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299:76
- Wang Y, Xu H, Fu Q, Ma R, Xiang J (2011) Protective effect of resveratrol derived from *Polygonum cuspidatum* and its liposomal form on nigral cells in parkinsonian rats. *J Neurol Sci* 304:29–34
- Xu Y, Wang Z, You W, Zhang X, Li S, Barish PA, Vernon MM, Du X, Li G, Pan J, Ogle WO (2010) Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: involvement of serotonin and noradrenaline System. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:405–413
- Yañez M, Fmiz N, Cano E, Orallo E (2006) Inhibitory effects of cis- and transresveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 344:688–695

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N. (2013). Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(3), 437–449. <http://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0>
- Abbott, N., Patabendige, A., Dolman, D., Yusof, S., y Begley, D. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25.
- Abd El Mohsen, M., Iravani, M., Spencer, J., Rose, S., Fahim, A., Motawi, T., y Jenner, P. (2005). Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: Modulation by antioxidants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(2), 386–391. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.201>
- Abraham, J., y Johnson, R. (2009). Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice. *Rejuvenation Research*, 12(6), 445–453. <http://doi.org/10.1089/rej.2009.0888>
- Adams, W., Kusljic, S., y Van den Buuse, M. (2008). Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: Effects on locomotor hyperactivity, prepulse inhibition and learning and memory. *Neuropharmacology*, 55(6), 1048–1055. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.035>
- Adler, A., Sinha, S., Kawahara, T., Zhang, J., Segal, E., y Chang, H. (2007). Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- κ B activity. *Genes and Development*, 21(24), 3244–3257. <http://doi.org/10.1101/gad.1588507>
- Akhmedov, K., Rizzo, V., Kadakkuzha, B., Carter, C., Magoski, N., Capo, T., y Puthanveetil, S. (2013). Decreased response to acetylcholine during aging of Aplysia neuron R15. *PLoS ONE*, 8(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0084793>
- Alers, S., Löffler, A., Wesselborg, S., y Stork, B. (2012). Role of AMPK/mTOR- Utk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell. Biol*, 32, 2–11.
- Alexander, B., Rivara, F., y Wolf, M. (1992). The cost and frequency of hospitalization for fall-related injuries in older adults. *American Journal of Public Health*, 82(7), 1020–3. <http://doi.org/10.2105/AJPH.82.7.1020>
- Alexeyev, M., Ledoux, S., y Wilson, G. (2004). Mitochondrial DNA and aging. *Clin Sci*, 107(4), 355–64.
- Alfaras, I., Pérez, M., Juan, M., Merino, G., Prieto, J., Planas, J., y Alvarez, A. (2010). Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) in the bioavailability and tissue distribution of trans-resveratrol in knockout mice. *J Agric Food Chem*, 58(7), 4523–8. <http://doi.org/10.1021/jf9042858>
- Almeida, L., Vaz-da-Silva, M., Falcão, A., Soares, E., Costa, R., Loureiro, A. I., y Soares-da-Silva, P. (2009). Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S1), S7–S15. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200800177>
- Andlauer, W., Kolb, J., Siebert, K., y Furst, P. (2000). Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 26(2), 47–55.
- Angeline, M., Ma, R., Pascual-Garrido, C., Voigt, C., Deng, X., Warren, R., y Rodeo, S. (2014). Effect of diet-induced vitamin D deficiency on rotator cuff healing in a rat model. *The American Journal of Sports Medicine*, 42(1), 27–34. <http://doi.org/10.1177/0363546513505421>
- Ansari, M., Abdul, H., Joshi, G., Opii, W., y Butterfield, D. (2009). Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta (1-42): relevance to Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem*, 20, 269–75.

-
- Antunes, M., y Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93-110. <http://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Arnsten, A., y Li, B. (2005). Neurobiology of executive functions: Catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biological Psychiatry*, 57(11), 1377–1384.
- Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Baño, M., Obrador, E., y Estrela, J. (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 387–398. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00911-5](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00911-5)
- Atkins, C., Selcher, J., Petraitis, J., Trzaskos, J., y Sweatt, J. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature Neuroscience*, 1(7), 602–609. <http://doi.org/10.1038/2836>
- Azcoitia, I., Perez-Martin, M., Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Garcia-Segura, L., y Tresguerres, J. (2005). Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 26(5), 697–703. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.007>
- Baddeley, A. (1992). Working Memory. *Science*, 255, 556–559. <http://doi.org/10.1126/science.1736359>
- Baldwin, A. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, 14, 649–683. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.649>
- Bandaruk, Y., Mukai, R., Kawamura, T., Nemoto, H., y Terao, J. (2012). Evaluation of the inhibitory effects of quercetin-related flavonoids and tea catechins on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(41), 10270–7. <http://doi.org/10.1021/jf303055b>
- Banerjee, M., Chakraborty, P., y Raha, S. (2010). Modulation of Akt and ERK1/2 Pathways by Resveratrol in Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Cells Results in the Downregulation of Hsp70. *PLoS ONE*, 5, e8719.
- Barber, M., Michishita-Kioi, E., Xi, Y., Tasselli, L., Kioi, M., Moqtaderi, Z., y Chua, K. (2012). SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*, 487(7405), 114–118. <http://doi.org/10.1038/nature11043>
- Barnes, C. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(1), 74–104. <http://doi.org/10.1037/h0077579>
- Barnes, N., y Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38(8), 1083–1152. [http://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00010-6](http://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00010-6)
- Barrett, G., Bennie, A., Trieu, J., Ping, S., y Tsafoulis, C. (2009). The chronology of age-related spatial learning impairment in two rat strains, as tested by the Barnes maze. *Behavioral Neuroscience*, 123(3), 533–538. <http://doi.org/10.1037/a0015063>
- Barrientos, R., Frank, M., Watkins, L., y Maier, S. (2012). Aging-related changes in neuroimmune-endocrine function: Implications for hippocampal-dependent cognition. *Hormones and Behavior*, 62(3), 219-27. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.010>
- Barrientos, R., Kitt, M., Watkins, L., y Maier, S. (2015). Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience*, 1–15.
- Bartus, R. (1990). Drugs to treat age-related neurodegenerative problems. *J Am Geriatr Soc*, 38, 680–95.
- Barzilai, N., Huffman, D., Muzumdar, R., y Bartke, A. (2012). The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes*, 61(6),1315-22. <http://doi.org/10.2337/db11-1300>

- Bastianetto, S., Zheng, W., y Quirion, R. (2000). Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. *British Journal of Pharmacology*, 131(4), 711–720. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703626>
- Baur, J. (2010). Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochim Biophys Acta*, 1804(8):1626-34. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.025>
- Baur, J., Pearson, K., Price, N., Jamieson, H., Lerin, C., Kalra, A., y Sinclair, D. (2006 a). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337–342. <http://doi.org/10.1038/nature05354>
- Baur, J., y Sinclair, D. (2006 b). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(6), 493–506. <http://doi.org/10.1038/nrd2060>
- Belinha, I., Amorim, M., Rodrigues, P., De Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N., y Costa, V. (2007). Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2446–2451. <http://doi.org/10.1021/jf063302e>
- Berr, C., Balansard, B., Arnaud, J., Roussel, a M., y Alperovitch, A. (2000). Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. *Etude du Vieillissement Artériel. Journal of the American Geriatrics Society*, 48(10), 1285–1291.
- Berumen, L., Rodríguez, A., Miledi, R., y García-Alcocer, G. (2012). Serotonin Receptors in Hippocampus. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–15. <http://doi.org/10.1100/2012/823493>
- Bhat, N., Zhang, P., Lee, J., y Hogan, E. (1998). Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J. Neurosci*, 18, 1633–1641.
- Bhullar, K., y Hubbard, B. (2015). Lifespan and healthspan extension by resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852, 1209–1218.
- Bickford, P. (1993). Motor learning deficits in aged rats are correlated with loss of cerebellar noradrenergic function. *Brain Research*, 620(1), 133–138. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90279-V](http://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90279-V)
- Bigford, G., y Del Rossi, G. (2014). Supplemental Substances Derived from Foods as Adjunctive Therapeutic Agents for Treatment of Neurodegenerative Diseases and Disorders. *Advances in Nutrition*, 5(4), 394–403. <http://doi.org/10.3945/an.113.005264>
- Birrell, M., McCluskie, K., Wong, S., Donnelly, L., Barnes, P., y Belvisi, M. (2005). Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kappaB-independent mechanism. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(7), 840–841. <http://doi.org/10.1096/fj.04-2691fje>
- Bishop, N., Lu, T., y Yankner, B. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288), 529–535. <http://doi.org/10.1038/nature08983>
- Bizon, J., Foster, T., Alexander, G., y Glisky, E. (2012). Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 4:19. <http://doi.org/10.3389/fnagi.2012.00019>
- Blackburn, E., Greider, C., y Szostak, J. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. *Nature Medicine*, 12(10), 1133–1138. <http://doi.org/10.1038/nm1006-1133>

-
- Blanchet, J., Longpré, F., Bureau, G., Morissette, M., DiPaolo, T., Bronchti, G., y Martinoli, M. (2008). Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32(5), 1243–50.
- Blasco, M. (2007). Telomere length, stem cells and aging. *Nature Chemical Biology*, 3(10), 640–649. <http://doi.org/10.1038/nchembio.2007.38>
- Blaylock, R., y Maroon, J. (2012). Natural plant products and extracts that reduce immunoexcitotoxicity-associated neurodegeneration and promote repair within the central nervous system. *Surgical Neurology International*, 3:19. <http://doi.org/10.4103/2152-7806.92935>
- Bliss, T., y Collingridge, G. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31–39. <http://doi.org/10.1038/361031a0>
- Bogo, V., Hill, T., y Young, R. (1981). Comparison of accelerod and rotarod sensitivity in detecting ethanol- and acrylamide-induced performance decrement in rats: review of experimental considerations of rotating rod systems. *Neurotoxicology*, 2(4), 765–787.
- Bonda, D., Lee, H., Camins, A., Pallàs, M., Casadesus, G., Smith, M., y Zhu, X. (2011). The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease: Mechanistic and therapeutic considerations. *The Lancet Neurology*, 10(3), 275–279. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70013-8](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70013-8)
- Boocock, D., Faust, G., Patel, K., Schinas, A., Brown, V., Ducharme, M., y Brenner, D. (2007). Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16, 1246–1252. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0022>
- Boots, A., Haenen, G., y Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2-3), 325-37. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.008>
- Boots, A., Li, H., Schins, R., Duffin, R., Heemskerk, J., Bast, A., y Haenen, G. (2007). The quercetin paradox. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(1), 89–96.
- Borella, E., Carretti, B., y De Beni, R. (2008). Working memory and inhibition across the adult life-span. *Acta Psychologica*, 128(1), 33–44. <http://doi.org/10.1016/j.actpsy.2007.09.008>
- Borriello, A., Bencivenga, D., Caldarelli, I., Tramontano, A., Borgia, A., Zappia, V., y Fulvio Della Ragione, F. (2014). Resveratrol: From Basic Studies to Bedside. *Advances in Nutrition and Cancer*, 167–184.
- Boveris, A., Oshino, N., y Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, 128(3), 617–630.
- Brasted, P., Humby, T., Dunnett, S., y Robbins, T. (1997). Unilateral lesions of the dorsal striatum in rats disrupt responding in egocentric space. *J Neurosci*, 17(22), 8919–8926.
- Brown, M., Geddes, J., y Sullivan, P. (2004). Brain region-specific, age-related, alterations in mitochondrial responses to elevated calcium. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 36, pp. 401–406). <http://doi.org/10.1023/B:JOB.0000041775.10388.23>
- Brown, M., y Terrinoni, M. (1996). Control of choice by the spatial configuration of goals. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 22(4), 438–446. <http://doi.org/10.1037/0097-7403.22.4.438>

- Brozoski, T., Brown, R., Rosvold, H., y Goldman, P. (1979). Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science*, 205(4409), 929–932. <http://doi.org/10.1126/science.112679>
- Brun, C., Jean-Louis, F., Oddos, T., Bagot, M., Bensussan, A., y Michel, L. (2015). Phenotypic and functional changes in dermal primary fibroblasts isolated from intrinsically aged human skin. *Exp Dermatol*, 25(2):113-9.
- Brunet, A., Sweeney, L., Sturgill, J., Chua, K., Greer, P., Lin, Y., y Greenberg, M. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303(5666), 2011–2015. <http://doi.org/10.1126/science.1094637>
- Bucki, R., Pastore, J., Giraud, F., Sulpice, J., y Janmey, P. (2003). Flavonoid inhibition of platelet procoagulant activity and phosphoinositide synthesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 1(8), 1820–8.
- Burke, S., y Barnes, C. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 30–40. <http://doi.org/10.1038/nrn1809>
- Butterfield, D., Abdul, H., Newman, S., y Reed, T. (2006). Redox Proteomics in Some Age-Related Neurodegenerative Disorders or Models Thereof. *NeuroRx*, 3(3),344-57
- Byles, V., Chmielewski, L., y Wang, J. (2010). Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells. *Int J Biol Sci*, (6), 599–612.
- Caballero, B., y Coto-Montes, A. (2012). An insight into the role of autophagy in cellresponses in the aging and neurodegenerative brain. *Histol Histopathol*, 27, 263–75.
- Cabeza, R., Anderson, N., Locantore, J., y McIntosh, A. (2002). Aging gracefully: compensatory brain activity in high-performing older adults. *NeuroImage*, 17(3), 1394–1402.
- Cadenas, S., y Barja, G. (1999). Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO3. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(11-12), 1531–1537. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00019-2](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00019-2)
- Calabrese, V., Cornelius, C., Cuzzocrea, S., Iavicoli, I., Rizzarelli, E., y Calabrese, E. (2011). Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(4-6), 279–304. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.007>
- Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer Part A*, 33(5), 703–709. [http://doi.org/10.1016/S0959-8049\(96\)00058-5](http://doi.org/10.1016/S0959-8049(96)00058-5)
- Campuzano, O., Castillo-Ruiz, M., Acarin, L., Castellano, B., y Gonzalez, B. (2009). Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *Journal of Neuroscience Research*, 87(11), 2484–97. <http://doi.org/10.1002/jnr.22074>
- Carlsson, A. (1987). Perspectives on the discovery of central monoaminergic neurotransmission. *Annu Rev Neurosci*, 10, 19–40.
- Carlsson, A., Davis, J., Kehr, W., Lindqvist, M., y Atack, C. (1972). Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 275, 153–168.
- Carlsson, A., y Winblad, B. (1976). Influence of age and time interval between death and autopsy on dopamine and 3-methoxytyramine levels in human basal ganglia. *J Neural Transm*, 38(3-4), 271–276.

-
- Casadesus, G., Shukitt-Hale, B., y Joseph, J. (2002). Qualitative versus quantitative caloric intake: Are they equivalent paths to successful aging? *Neurobiology of Aging*, 23(5), 747–769. [http://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00079-9](http://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00079-9)
- Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., y Shih, J. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*, 268(5218), 1763–1766. <http://doi.org/10.1126/science.7792602>
- Cash, C. (1998). Why tryptophan hydroxylase is difficult to purify: a reactive oxygen-derived species-mediated phenomenon that may be implicated in human pathology. *General Pharmacology*, 30, 569–74. [http://doi.org/10.1016/S0306-3623\(97\)00308-X](http://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00308-X)
- Cassel, J., y Jeltsch, H. (1995). Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: Cognitive implications. *Neuroscience*, 69(1), 1–41. [http://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00241-A](http://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00241-A)
- Cedarbaum, J., y Aghajanian, G. (1977). Catecholamine receptors on locus coeruleus neurons: Pharmacological characterization. *European Journal of Pharmacology*, 44(4), 375–385. [http://doi.org/10.1016/0014-2999\(77\)90312-0](http://doi.org/10.1016/0014-2999(77)90312-0)
- Cerbai, F., Lana, D., Nosi, D., Petkova-Kirova, P., Zecchi, S., Brothers, H., y Giovannini, M. (2012). The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PLoS One*, 7(9), e45250. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0045250>
- Cesanow, N., Fleminh, H., y Kelly, G. (2006). PDR for non prescription drugs, dietary supplements, and herbs. In T. PDR (Ed.), *Physicians' Desk Reference for Nonprescription Drugs, Dietary Supplements & Herbs* (34th ed.). Montvale.
- Chamberlain, S., y Robbins, T. (2013). Noradrenergic modulation of cognition: therapeutic implications. *Journal of Psychopharmacology*, 27(8), 694–718. <http://doi.org/10.1177/0269881113480988>
- Chang, L., y Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37–40. <http://doi.org/10.1038/35065000>
- Chao, C., Weng, C., Chang, N., Lin, J., Kao, S., y Ho, F. (2010). Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. *Nutrition Research*, 30(12), 858–64. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.10.011>
- Chen, J., Zhou, Y., Mueller-Steiner, S., Chen, L., Kwon, H., Yi, S., y Gan, L. (2005). SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(48), 40364–74. <http://doi.org/10.1074/jbc.M509329200>
- Chen, K., Masliah, E., Mallory, M., y Gage, F. (1995). Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neuroscience*, 68(1), 19–27. [http://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00099-5](http://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00099-5)
- Chen, L., y Greene, W. (2003). Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *Journal of Molecular Medicine*, 81(9), 549–57. <http://doi.org/10.1007/s00109-003-0469-0>
- Chester, J., y Rudolph, J. (2011). Vital Signs in Older Patients: Age-Related Changes. *Journal of the American Medical Directors Association*, 12(5), 337–343.
- Cho, K., Lee, E., Kwon, K., Gonzales, E., Kim, Y., y Cheong, J. (2014). Resveratrol down-regulates a glutamate-induced tissue plasminogen activator via Erk and AMPK/mTOR pathways in rat primary cortical neurons. *Food and Function*, 5, 951–960.

- Chondrogianni, N., Kapeta, S., Chinou, I., Vassilatou, K., Papassideri, I., y Gonos, E. (2010). Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Experimental Gerontology*, 45(10), 763–771. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2010.07.001>
- Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J., Arunachalam, G., y Rahman, I. (2010). Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1):79-90. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2010.05.003>
- Cirillo, G., Curcio, M., Vittorio, O., Iemma, F., Restuccia, D., Spizzirri, U., y Picci, N. (2014). Polyphenol conjugates and human health: a perspective review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(2), 326-37. <http://doi.org/10.1080/10408398.2012.752342>
- Cohen, H., Miller, C., Bitterman, K., Wall, N., Hekking, B., Kessler, B., y Sinclair, D. (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*, 305(5682), 390–392. <http://doi.org/10.1126/science.1099196>
- Coley, N., Vaurs, C., y Andrieu, S. (2015). Nutrition and Cognition in Aging Adults. *Clin Geriatr Med*, 3, 453–64.
- Collier, T., Greene, J., Felten, D., Stevens, S., y Collier, K. (2004). Reduced cortical noradrenergic neurotransmission is associated with increased neophobia and impaired spatial memory in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 25(2), 209–221. [http://doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00042-3](http://doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00042-3)
- Colom, H., Alfaras, I., Maijón, M., Juan, M. E., y Planas, J. M. (2011). Population pharmacokinetic modeling of trans-resveratrol and its glucuronide and sulfate conjugates after oral and intravenous administration in rats. *Pharmaceutical Research*, 28(7), 1606–1621. <http://doi.org/10.1007/s11095-011-0395-8>
- Contreras-Vidal, J., Teulings, H., y Stelmach, G. (1998). Elderly subjects are impaired in spatial coordination in fine motor control. *Acta Psychologica*, 100(1-2), 25–35. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0001-6918\(98\)00023-7](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0001-6918(98)00023-7)
- Cook, D., y Kesner, R. (1988). Caudate nucleus and memory for egocentric localization. *Behavioral and Neural Biology*, 49(3), 332–343. [http://doi.org/10.1016/S0163-1047\(88\)90338-X](http://doi.org/10.1016/S0163-1047(88)90338-X)
- Cools, R. (2011). Dopaminergic control of the striatum for high-level cognition. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(3), 402–407. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2011.04.002>
- Corn refiners association. (2006). Corn oil. Washington. Retrieved from <http://www.corn.org/wp-content/uploads/2009/12/CornOil.pdf>
- Corredor, C. (2006). Antioxidantes. In J. F. Patiño Restrepo (Ed.), *Metabolismo, nutrición y shock* (cuarta, p. 293). Bogotá: Editorial médica panamericana.
- Cowan, N. (2008). What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Progress in Brain Research*, 169, 323–338. [http://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)00020-9](http://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)00020-9). What
- Coyle, J., y Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262(5134), 689–695. <http://doi.org/10.1126/science.7901908>
- Crowell, J., Korytko, P., Morrissey, R., Booth, T., y Levine, B. (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicological Sciences*, 82(2), 614–619. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfh263>
- Culbert, A., Skaper, S., Howlett, D., Evans, N., Facci, L., Soden, P., y Richardson, J. (2006). MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem*, 281, 23658–23667.

-
- Cushnie, T., y Lamb, A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Darling, W., Cooke, J., y Brown, S. (1989). Control of simple arm movements in elderly humans. *Neurobiology of Aging*, 10(2), 149–57. [http://doi.org/10.1016/0197-4580\(89\)90024-9](http://doi.org/10.1016/0197-4580(89)90024-9)
- Davis, J., Murphy, E., y Carmichael, M. (2009). Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Current Sports Medicine Reports*, 8(4), 206–13. <http://doi.org/10.1249/JSR.0b013e3181ae8959>
- Day, A., y Williamson, G. (2001). Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *The British Journal of Nutrition*, 86 Suppl 1, S105–S110. <http://doi.org/10.1079/BJN2001342>
- Deeks, S. G. (2011). HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annual Review of Medicine*, 62, 141–155. <http://doi.org/10.1146/annurev-med-042909-093756>
- De Groot, H., y Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 12(3), 249–255. <http://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1998.tb00951.x>
- De La Cruz, C., Revilla, E., Venero, J., Ayala, A., Cano, J., y Machado, A. (1996). Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(1), 53–61. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02025-X](http://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02025-X)
- De Oliveira, D., Schaffer, L., Busanello, A., Barbosa, C., Peroza, L., de Freitas, C., y Fachineto, R. (2015). Silymarin has antioxidant potential and changes the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and monoamine oxidase in vitro. *Industrial Crops and Products*, 70, 347–355. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.060>
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., y Pacifici, G. (2000). Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 30(6), 609–617.
- Deacon, R., Rawlins, J., y Nicholas, P. (2002). Learning impairments of hippocampal-lesioned mice in a paddling pool. *Behavioral Neuroscience*, 116(3), 472–478. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.116.3.472>
- Delini-Stula, A., Mogilnicka, E., Hunn, C., y Dooley, D. (1984). Novelty-oriented behavior in the rat after selective damage of locus coeruleus projections by DSP-4, a new noradrenergic neurotoxin. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 20(4), 613–618. [http://doi.org/10.1016/0091-3057\(84\)90312-5](http://doi.org/10.1016/0091-3057(84)90312-5)
- Diggles-Buckles, V. (1993). Age-related slowing. In G. Stelmach & V. Homberg (Eds.), *Sensorimotor impairment in the elderly*. Kluwer Academic.
- Ding, T., Tian, S., Zhang, Z., Gu, D., Chen, Y., Shi, Y., y Sun, J. (2001). Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *J Pharm Biomed Anal*, 26(1), 155–61.
- Dokmanovic, M., Clarke, C., y Marks, P. (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular Cancer Research: MCR*, 5(10), 981–9. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0324>
- Donahue, J., y Johanson, C. (2008). Apolipoprotein E, amyloid-beta, and blood-brain barrier permeability in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67(4):261-70.

- Doonan, R., McElwee, J., Matthijssens, F., Walker, G., Houthoofd, K., Back, P., y Gems, D. (2008). Against the oxidative damage theory of aging: Superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development*, 22(23), 3236–3241. <http://doi.org/10.1101/gad.504808>
- Driscoll, I., y Sutherland, R. (2005). The aging hippocampus: navigating between rat and human experiments. *Reviews in the Neurosciences*, 16(2), 87–121.
- Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J., Khan, S., Jiang, H., y Lin, H. (2011). Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*, 334(6057), 806–9.
- Duan, W. (2013). Sirtuins: from metabolic regulation to brain aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5(36), 5:36.
- Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Lee, E., Booth, R., Gabay, O., y Hall, D. (2011). Tumor necrosis factor α -mediated cleavage and inactivation of sirT1 in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 63(8), 2363–2373. <http://doi.org/10.1002/art.30279>
- Eccleston, D., Ritchie, I., y Roberts, M. (1970). Long term effects of midbrain stimulation on 5-hydroxyindole synthesis in rat brain. *Nature*, 226, 84–85.
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 244–54. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
- Ennaceur, A., y Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats.1. Behavioral data. *Behav Brain Res*, 31, 47–59.
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., y Aro, A. (2001). Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *The Journal of Nutrition*, 131(2), 235–241.
- Esteban, S., Garau, C., Aparicio, S., Moranta, D., Barceló, P., Fiol, M., y Rial, R. (2010 a). Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *J Pineal Res*, 48(170-177), 170–177. <http://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00741.x>
- Esteban, S., Garau, C., Aparicio, S., Moranta, D., Barceló, P., Ramis, M., y Rial, R. (2010 b). Improving effects of long-term growth hormone treatment on monoaminergic neurotransmission and related behavioral tests in aged rats. *Rejuvenation Research*, 13(6), 707–716. <http://doi.org/10.1089/rej.2010.1053>
- Felgines, C., Texier, O., Morand, C., Manach, C., Scalbert, A., Régerat, F., y Rémésy, C. (2000). Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(6), G1148–G1154.
- Fernandez-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens? *Revista de Neurología*, 30(9), 845–849.
- Fernandez-Marcos, P., y Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American Journal of Clinical*, 93, 884–890.
- Fernstrom, J., y Fernstrom, M. (2007). Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *The Journal of Nutrition*, 137(6 Suppl 1), 1539S–1547S; discussion 1548S.
- Fiander, H., y Schneider, H. (2000). Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act

-
- by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic. *Cancer Letters*, 156(2), 117–124.
- Fieber, L., Carlson, S., Capo, T., y Schmale, M. (2010). Changes in d-aspartate ion currents in the *Aplysia* nervous system with aging. *Brain Research*, 1343, 28–36.
- Fillenz, M. (1990). Regulation of catecholamine synthesis: Multiple mechanisms and their significance. *Neurochem Int*, 17(2), 303–20.
- Finkel, T., Deng, C., y Mostoslavsky, R. (2009). Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, 460(7255), 587–591. <http://doi.org/10.1038/nature08197>
- Flowers, A., Lee, J., Acosta, S., Hudson, B., Small, C., Sanberg, y Bickford, P. (2015). Flowers, A Lee, J.Y. Acosta, S Hudson, C Small, B Sanberg, CD Bickford, PC. *J Neuroinflammation*, 12(1), 174.
- Fontana, D., Daniels, S., Wong, E., Clark, R., y Eglén, R. (1997). The effects of novel, selective 5-hydroxytryptamine (5-HT)₄ receptor ligands in rat spatial navigation. *Neuropharmacology*, 36(4-5), 689–696.
- Fontana, L., Partridge, L., y Longo, V. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*, 328(5976), 321–326. <http://doi.org/10.1126/science.1172539>
- Foster, T. (1999). Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Research Reviews*, 30(3), 236–249. [http://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00017-X](http://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00017-X)
- Freeman, L., y Keller, J. (2012). Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 822-9. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.009>
- Friedman, R., y Hughes, A. (2002). Molecular evolution of the NF-kappaB signaling system. *Immunogenetics*, 53(10-11), 964–74. <http://doi.org/10.1007/s00251-001-0399-3>
- Frye, R. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(2), 793–798. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3000>
- Gannon, M., Che, P., Chen, Y., Jiao, K., Roberson, E., y Wang, Q. (2015). Noradrenergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 220. <http://doi.org/10.3389/fnins.2015.00220>
- Gao, J., Wang, W., Mao, Y., Gräff, J., Guan, J., y Pan, L. (2010). A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature*, 466, 1105–1109.
- García-Bueno, A., y Leza, J. (2008). Mecanismos inflamatorios/antiinflamatorios en el cerebro tras la exposición a estrés. *Rev Neurolog*, 46(11), 675–683.
- Garnett, E., Firnau, G., y Nahmias, C. (1983). Dopamine visualized in the basal ganglia of living man. *Nature*, 305(5930), 137-8. <http://doi.org/10.1097/00004728-198402000-00054>
- Garrett, D., Nagel, I., Preuschhof, C., Burzynska, A., Marchner, J., Wiegert, S., y Lindenberger, U. (2015). Amphetamine modulates brain signal variability and working memory in younger and older adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(24), 7593–7598. <http://doi.org/10.1073/pnas.1504090112>
- Gazák, R., Walterová, D., y Kren, V. (2007). Silybin and silymarin--new and emerging applications in medicine. *Current Medicinal Chemistry*, 14(3), 315–338.
- George, J., Bernard, W., Agranoff, R., Wayne, A., y Perry, B. (1994). *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects.* (R. Press, Ed.). New York.

- Ghosh, H., McBurney, M., y Robbins, P. (2010). SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *PLoS ONE*, 5(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009199>
- Ghosh, S., y Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, 109, S81–S96. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00703-1](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00703-1)
- Gibbons, H., y Dragunow, M. (2006). Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide. *Brain Research*, 1084(1), 1–15.
- Gillum, M., Kotas, M., Erion, D., Kursawe, R., Chatterjee, P., Nead, K., y Shulman, G. (2011). SirT1 regulates adipose tissue inflammation. *Diabetes*, 60(12), 3235–45. <http://doi.org/10.2337/db11-0616>
- Giovannini, L., Migliori, M., Longoni, B., Das, D., Bertelli, A., Panichi, V., y Bertelli, A. (2001). Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 37(3), 262–270. <http://doi.org/10.1097/00005344-200103000-00004>
- Giurgea, C. (1972). Pharmacology of integrative activity of the brain. Attempt at nootropic concept in psychopharmacology. *Actual Pharmacol*, 25, 115–56.
- Glass, C., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M., y Gage, F. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918–934. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>
- Glick, D., Barth, S., y Macleod, K. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221(1), 3–12.
- Glorioso, C., y Sibille, E. (2011). Between destiny and disease: Genetics and molecular pathways of human central nervous system aging. *Progress in Neurobiology*, 93(2):165-81.
- Goldberg, D., Yan, J., Ng, E., Diamandis, E., Karumanchiri, A., Soleas, G., y Waterhouse, A. (1995). A Global Survey of Trans- Resveratrol Concentrations in Commercial Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 159–165.
- Gomez-Pinilla, F., y Nguyen, T. (2012). Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutritional Neuroscience*, 15(3), 127–133. <http://doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000035>
- González-Burgos, I., y Feria-Velasco, A. (2008). Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res*, 172, 603–23.
- González-Burgos, I., y Feria-Velasco, A. (2009). Serotonin-dopamine interaction: experimental evidence and therapeutic relevance. *Arch Neurocién*, 14(1), 40–57.
- Goulart, B., de Lima, M., de Farias, C., Reolon, G., Almeida, V., Quevedo, J., y Roesler, R. (2010). Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, 167(4), 969–973. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.032>
- Gould, T., y Bickford, P. (1996). The effects of aging on cerebellar β -adrenergic receptor activation and motor learning in female F344 rats. *Neuroscience Letters*, 216(1), 53–56. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)13007-X](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(96)13007-X)
- Goyarzu, P., Malin, D., Lau, F., Tagliatalata, G., Moon, W., Jennings, R., y Joseph, J. (2004). Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor- κ B levels in aged rats. *Nutritional Neuroscience*, 7(2), 75–83. <http://doi.org/10.1080/10284150410001710410>

-
- Gräff, J., y Tsai, L. (2013). Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(2), 97–111. <http://doi.org/10.1038/nrn3427>
- Gredilla, R., Garm, C., Holm, R., Bohr, V., y Stevnsner, T. (2010). Differential age-related changes in mitochondrial DNA repair activities in mouse brain regions. *Neurobiology of Aging*, 31(6), 993–1002. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.004>
- Green, D., Galluzzi, L., y Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), 1109–1112. <http://doi.org/10.1126/science.1201940>
- Greer, E., Maures, T., Hauswirth, A., Green, E., Leeman, D., Maro, G., y Brunet, A. (2010). Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature*, 466(7304), 383–387. <http://doi.org/10.1038/nature09195>
- Gregoret, I., Lee, Y., y Goodson, H. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: Functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Biology*, 338(1), 17–31. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.006>
- Gulati, N., Laudet, B., Zohrabian, V., Murali, R., y Jhanwar-Uniyal, M. (2006). The antiproliferative effect of Quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K/Akt/PKB pathway. *Anticancer Res*, 26, 1177–81.
- Guo, W., Qian, L., Zhang, J., Zhang, W., Morrison, A., Hayes, P., y Zhao, J. (2011). Sirt1 overexpression in neurons promotes neurite outgrowth and cell survival through inhibition of the mTOR signaling. *J Neurosci Res*, 89, 1723–1736.
- Haider, S., Saleem, S., Perveen, T., Tabassum, S., Batool, Z., Sadir, S., y Madiha, S. (2014). Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age*, 36(3), 9653. <http://doi.org/10.1007/s11357-014-9653-0>
- Haigis, M., Mostoslavsky, R., Haigis, K., Fahie, K., Christodoulou, D., Murphy, A., y Guarente, L. (2006). SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells. *Cell*, 126(5), 941–954. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.057>
- Haleagrahara, N., Radhakrishnan, A., Lee, N., y Kumar, P. (2009). Flavonoid quercetin protects against swimming stress-induced changes in oxidative biomarkers in the hypothalamus of rats. *European Journal of Pharmacology*, 621(1-3), 46–52. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.030>
- Hall, J., Dominy, J., Lee, Y., y Puigserver, P. (2013). The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 973-9. <http://doi.org/10.1172/JCI64094>
- Halliwell, B., Zentella, A., Gomez, E., y Kershenobich, D. (1997). Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutrition Reviews*, 55(1), S44–S49.
- Hamon, M., Bourgoin, S., y Glowinski, J. (1973). Feedback regulation of 5-HT synthesis in rat striatal slices. *J Neurochem*, 20, 1727–1745.
- Hamon, M., y Glowinski, J. (1974). Regulation of serotonin synthesis. *Life Sci*, 15, 1533–1548.
- Han, S., y Yun, Y. (2010). NF- κ B/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMycE μ B lymphoma. *Molecular Cancer*, 9(97).
- Han, X., Hong, S., Hwang, J., Lee, M., Hwang, B., y Ro, J. (2007). Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Archives of Pharmacal Research*, 30(1), 13–17.

- Hanasaki, Y., Ogawa, S., y Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845–850. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90202-X](http://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90202-X)
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11(3), 298–300.
- Harrison, F., Hosseini, A., y McDonald, M. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*, 198(1), 247–251. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015>
- Harrison, F., Reiserer, R., Tomarken, A., y McDonald, M. (2006). Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & Memory*, 13(6), 809–819. <http://doi.org/10.1101/lm.334306>
- Hartl, F., Bracher, A., y Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324–332. <http://doi.org/10.1038/nature10317>
- Hawley, S., Ross, F., Chevtzoff, C., Green, K., Evans, A., Fogarty, S., y Hardie, D. (2010). Use of cells expressing ?? subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metabolism*, 11(6), 554–565. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.001>
- Hayflick, L., y Moorhead, P. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585–621. [http://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](http://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Hedden, T., y Gabrieli, J. (2004). Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(2), 87–96. <http://doi.org/10.1038/nrn1323>
- Hers, I., Vincent, E., y Tavaré, J. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling*, 23(10), 1515–27.
- Herskovits, A., y Guarente, L. (2013). Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Cell Research*, 23(6), 746–58. <http://doi.org/10.1038/cr.2013.70>
- Herskovits, A., y Guarente, L. (2014). SIRT1 in Neurodevelopment and Brain Senescence. *Neuron*, 81(3), 471–83. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.028>
- Hertog, M., Hollman, P., y Katan, M. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 2379–2383. <http://doi.org/10.1021/jf00024a011>
- Hirai, S., Kim, Y., Goto, T., Kang, M., Yoshimura, M., Obata, A., y Kawada, T. (2007). Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Life Sci*, 81(16), 1272–9. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.09.001>
- Hisahara, S., Chiba, S., Matsumoto, H., Tanno, M., Yagi, H., Shimohama, S., y Horio, Y. (2008). Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15599–15604. <http://doi.org/10.1073/pnas.0800612105>
- Hoeijmakers, J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.*, 361, 1475–1485.
- Holmes-McNary, M., y Baldwin, S. (2000). Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase. *Cancer Research*, 60, 3477–3483.
- Holst, B., y Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2):73–82. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.003>

-
- Horio, Y., Hayashi, T., Kuno, A., y Kunimoto, R. (2011). Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease. *Clinical Science*, 121(5), 191–203. <http://doi.org/10.1042/CS20100587>
- Houtkooper, R., Williams, R., y Auwerx, J. (2010). Metabolic Networks of Longevity. *Cell*, 142(1), 9-14. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.029>
- Howitz, K., Bitterman, K., Cohen, H., Lamming, D., Lavu, S., Wood, J., y Sinclair, D. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191–196. <http://doi.org/10.1038/nature01960>
- Hritcu, L., Clicinschi, M., y Nabeshima, T. (2007). Brain serotonin depletion impairs short-term memory, but not long-term memory in rats. *Physiology and Behavior*, 91(5), 652–657. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.028>
- Hubbard, B., Gomes, A., Dai, H., Li, J., Case, A., Considine, T., y Sinclair, D. (2013). Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science*, 339(6124), 1216–9. <http://doi.org/10.1126/science.1231097>
- Hubbard, B., y Sinclair, D. (2014). Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(3), 146–154. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.004>
- Huhn, S., Kharabian, M., Stumvoll, M., Villringer, A., y Witte, A. (2015). Components of a Mediterranean diet and their impact on cognitive functions in aging. *Front Aging Neurosci*, 7, 132.
- Hussain, A., y Mitra, A. (2000). Effect of aging on tryptophan hydroxylase in rat brain: Implications on serotonin level. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(9), 1038–1042.
- Ibrahim, G., El-Raey, M., Eldashan, O., y Souleman, A. (2013). Effect of extraction on phenolic content, silymarin and antiradical activities of artichoke leaves and roots. *European Scientific Journal*, 9, 100–110.
- Ihara, Y., Hayabara, T., Sasaki, K., Fujisawa, Y., Kawada, R., Yamamoto, T., y Kuroda, S. (1997). Free radicals and superoxide dismutase in blood of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Journal of the Neurological Sciences*, 153(1), 76–81. [http://doi.org/10.1016/S0022-510X\(97\)00172-X](http://doi.org/10.1016/S0022-510X(97)00172-X)
- Imai, S., y Guarente, L. (2010). Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: Implications for metabolic diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(5), 212-20. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2010.02.003>
- Inserso, Fernández Muñoz, J., y Norberto. (2014). Informe 2012. Las Personas Mayores en España. Datos Estadísticos Estatales y por Comunidades Autónomas.
- Inoue, M., Suhara, T., Sudo, Y., Okubo, Y., Yasuno, F., Kishimoto, T., y Tanada, S. (2001). Age-related reduction of extrastriatal dopamine D2 receptor measured by PET. *Life Sciences*, 69, 1079–1084. [http://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01205-X](http://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01205-X)
- Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M., Yamada, H., Kishimoto, I., Yamaguchi, S., y Oshimura, M. (2007). SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene*, 26(7), 945–957. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209857>
- Jackson, D., y Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther*, 64(2), 291–370. [http://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)90041-8](http://doi.org/10.1016/0163-7258(94)90041-8)

- Jäger, A., y Saaby, L. (2011). Flavonoids and the CNS. *Molecules*, 16(2), 1471-85. <http://doi.org/10.3390/molecules16021471>
- Jana, M., Dasgupta, S., Liu, X., y Pahan, K. (2002). Regulation of tumor necrosis factor- α expression by CD40 ligation in BV-2 microglial cells. *Journal of Neurochemistry*, 80(1), 197–206. <http://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00691.x>
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G., Slowing, K., Thomas, C., Beecher, C., y Pezzuto, J. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275(5297), 218–220. <http://doi.org/10.1126/science.275.5297.218>
- Jayasena, T., Poljakb, A., Smytheb, G., Braidya, N., Münchd, G., y Sachdeva, 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.
- Jiang, M., Wang, J., Fu, J., Du, L., Jeong, H., West, T., y Duan, W. (2012). Neuroprotective role of Sirt1 in mammalian models of Huntington's disease through activation of multiple Sirt1 targets. *Nat Med*, 18(1), 153–158. <http://doi.org/10.1038/nm.2558>
- Johnson SC., Rabinovitch PS., y Kaeberlein M. (2013). mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*, 493(7432), 338-45.
- Joseph, J. (1992). The putative role of free radicals in the loss of neuronal functioning in senescence. *Integrative Physiological and Behavioral Science : The Official Journal of the Pavlovian Society*, 27(3), 216–227.
- Joseph, J., Cole, G., Head, E., y Ingram, D. (2009). Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(41), 12795–12801. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3520-09.2009>
- Joseph, J., Shukitt-Hale, B., Denisova, N., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J., y Bickford, P. (1999). Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(18), 8114–8121.
- Joseph, J., Shukitt-Hale, B., y Lau, F. (2007). Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behavior in senescence. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1100, pp. 470–485). <http://doi.org/10.1196/annals.1395.052>
- Juan, M. E., Buenafuente, J., Casals, I., y Planas, J. M. (2002). Plasmatic levels of trans-resveratrol in rats. *Food Research International*, 35, 195–199. [http://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00183-1](http://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00183-1)
- Juan, M. E., González-Pons, E., Munuera, T., Ballester, J., Rodríguez-Gil, J. E., y Planas, J. M. (2005). trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *The Journal of Nutrition*, 135(4), 757–760.
- Juan, M. E., González-Pons, E., y Planas, J. M. (2010 a). Multidrug resistance proteins restrain the intestinal absorption of trans-resveratrol in rats. *The Journal of Nutrition*, 140(3), 489–95. <http://doi.org/10.3945/jn.109.114959>
- Juan, M. E., Maijó, M., y Planas, J. M. (2010 b). Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 391–398. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.026>
- Juan, M. E., Vinardell, M. P., y Planas, J. M. J. (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *The Journal of Nutrition*, 132(2), 257–60.

-
- Juan, M. E., Wenzel, U., Daniel, H., y Planas, J. M. (2008). Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4813–4818. <http://doi.org/10.1021/jf800175a>
- Kaasinen, V., y Rinne, J. (2002). Functional imaging studies of dopamine system and cognition in normal aging and Parkinson's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(7):785-93. [http://doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00065-9](http://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00065-9)
- Kadakkuzha, B., Akhmedov, K., Capo, T., Carvalloza, A., Fallahi, M., y Puthanveetil, S. (2013). Age-associated bidirectional modulation of gene expression in single identified R15 neuron of *Aplysia*. *BMC Genomics*, 14(1), 880. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-880>
- Kaltschmidt, B., Widera, D., y Kaltschmidt, C. (2005). Signaling via NF- κ B in the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1745(3), 287–299. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.05.009>
- Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, I., Neumann, H., Wekerle, H., y Baeuerle, P. (1994). Constitutive NF- κ B Activity in Neurons. *Molecular and Cellular Biology*, 14(6). <http://doi.org/10.1128/MCB.14.6.3981>. Updated
- Kaminska, B., Gozdz, A., Zawadzka, M., Ellert-Miklaszewska, A., y Lipko, M. (2009). MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. In *Anatomical Record* (Vol. 292, pp. 1902–1913). <http://doi.org/10.1002/ar.21047>
- Kanfi, Y., Peshti, V., Gil, R., Naiman, S., Nahum, L., Levin, E., y Cohen, H. (2010). SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity. *Aging Cell*, 9(2), 162–173. <http://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00544.x>
- Kanno, S., Tomizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Shouji, A., Ujibe, M., y Ishikawa, M. (2005). Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(3), 527–530. <http://doi.org/10.1248/bpb.28.527>
- Karimi, G., Fallah Huseini, H., Ramezani, M., y Tahoonian, Z. (2005). Protective effect of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. seeds extract and silymarin against cisplatin-induced acute nephrotoxicity in rats. *Journal of Medicinal Plants*, 4(1), 42–45.
- Karimi, G., Ramezani, M., y Tahoonian, Z. (2005). Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(7), 383–386. <http://doi.org/10.1093/ecam/neh103>
- Karimi, G., Vahabzadeh, M., Lari, P., Rashedinia, M., y Moshiri, M. (2011). Silymarin, a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(4), 308–317.
- Karin, M., y Lin, A. (2002). NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology*, 3(3), 221–227. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.08.003>
- Katsuura, G., Arimura, A., Koves, K., y Gottschall, P. (1990). Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin 1 beta-induced ACTH release. *The American Journal of Physiology*, 258(1 Pt 1), E163–71.
- Kauppinen, A., Suuronen, T., Ojala, J., Kaarniranta, K., y Salminen, A. (2013). Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal*, 25(10), 1939–1948. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.06.007>

- Kawahara, T., Michishita, E., Adler, A., Damian, M., Berber, E., Lin, M., y Chua, K. (2009). SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*, 136(1), 62–74. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.052>
- Keller, J., Schmitt, F., Scheff, S., Ding, Q., Chen, Q., Butterfield, D., y Markesbery, W. (2005). Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology*, 64(7), 1152–1156. <http://doi.org/10.1212/01.WNL.0000156156.13641.BA>
- Kemp, A., y Manahan-Vaughan, D. (2008). Beta-Adrenoreceptors comprise a critical element in learning-facilitated long-term plasticity. *Cerebral Cortex*, 18(6), 1326–1334. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhm164>
- Kempell, A., y Fieber, L. (2015). Aging in Sensory and Motor Neurons Results in Learning Failure in *Aplysia californica*. *PLoS ONE*, 13(10), 5.
- Kennedy, S., Loeb, L., y Herr, A. (2012). Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration. *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(4), 118–126.
- Kenyon, C. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), 504–512.
- Khan, MB., Khan, MM., y Khan, A. (2012). Naringenin ameliorates Alzheimer's disease (AD)-type neurodegeneration with cognitive impairment (AD-TNDCI) caused by the intracerebroventricular-streptozotocin in rat model. *Neurochem Int*, 61, 1081–1093.
- Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., y Tai, T. (2013). Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. *Nutrients*, 5, 3779–3827.
- Kim, E., y Choi, E. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(4), 396–405. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>
- Kim, J., y Baxter, M. (2001). Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts. *Trends in Neurosciences*, 24(6), 324–30. [http://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01818-X](http://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01818-X)
- Klar, J., Fogel, S., y Macleod, K. (1979). MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in *Saccharomices cerevisiae*. *Genetics*, 93(1), 37–50.
- Klegeris, A., Pelech, S., Giasson, B., Maguire, J., Zhang, H., McGeer, E., y McGeer, P. (2008). Alpha-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiology of Aging*, 29(5), 739–752. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.013>
- Kluger, A., Gianutsos, J., Golomb, J., Ferris, S., George, A., Franssen, E., y Reisberg, B. (1997). Patterns of Motor Impairment in Normal Aging, Mild Cognitive Decline, and Early Alzheimer' Disease. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences*, 52B(1), P28–P39. <http://doi.org/10.1093/geronb/52B.1.P28>
- Koga, H., Kaushik, S., y Cuervo, A. (2012). Protein Homeostasis and Aging: the importance of exquisite quality control. *Ageing Res. Rev*, 10(2), 205–215. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2010.02.001>
- Koprowska, M., Krotewicz, M., Romaniuk, A., y Strzelczuk, M. (2004). Age-related changes in fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 64(2), 131–142.
- Korhonen, P., Helenius, M., y Salminen, A. (1997). Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kB in rat brain. *Neuroscience Letters*, 225, 61–64.
- Kreutzberg, G. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19(8), 312–318.

-
- Kuhn, D., y Arthur, R. (1996). Inactivation of brain tryptophan hydroxylase by nitric oxide. *J Neurochem*, 67, 1072–1077.
- Kuhnle, G., Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E. S., Srai, S. K., y Hahn, U. (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(1), 212–217. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2750>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W., y Peeper, D. (2010). The essence of senescence. *Genes and Development*, 24(22), 2463–79. <http://doi.org/10.1101/gad.1971610>
- Kulla, A., y Manahan-Vaughan, D. (2002). Modulation by serotonin 5-HT(4) receptors of long-term potentiation and depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Cerebral Cortex*, 12(2), 150–62.
- Kwon, H., Brent, M., Getachew, R., Jayakumar, P., Chen, D., Schnolzer, M., y Ott, M. (2008). Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein inhibits the SIRT1 deacetylase and induces T cell hyperactivation. *Cell Host and Microbe*, 3(3), 158–167. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.002>
- Labinsky, N., Csiszar, A., Veress, G., Stef, G., Pacher, P., Oroszi, G., y Ungvari, Z. (2006). Vascular dysfunction in aging: potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. *Current Medicinal Chemistry*, 13(9), 989–996. <http://doi.org/10.2174/092986706776360987>
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <http://doi.org/10.1038/227680a0>
- Laplante, M., y Sabatini, D. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2):274–93. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Lau, F., Shukitt-Hale, B., y Joseph, J. (2005). The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiology of Aging*, 26(SUPPL.), 128–132. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.08.007>
- Law, I., Liu, L., Xu, A., Lam, K., Vanhoutte, P., Che, C., y Wang, Y. (2009). Identification and characterization of proteins interacting with SIRT1 and SIRT3: implications in the anti-aging and metabolic effects of sirtuins. *Proteomics*, 9, 2444–56.
- Lee, E., Lee, H., Shin, J., Yoon, S., y Moon, J. (2003). The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(8), 1169–74. <http://doi.org/10.1211/0022357021396>
- Lee, I., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D., Liu, J., Bruns, N., y Finkel, T. (2008). A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3374–3379. <http://doi.org/10.1073/pnas.0712145105>
- Lee, M., Yoon, S., y Moon, J. (2004). The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(1), 72–76. <http://doi.org/10.1248/bpb.27.72>
- Leikert, J. (2002). Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells. *Circulation*, 106(13), 1614–1617. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000034445.31543.43>
- Lemon, N., Aydin-Abidin, S., Funke, K., y Manahan-Vaughan, D. (2009). Locus coeruleus activation facilitates memory encoding and induces hippocampal LTD that depends on ??-Adrenergic receptor activation. *Cerebral Cortex*, 19(12), 2827–2837. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhp065>

- Lemon, N., y Manahan-Vaughan, D. (2006). Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long-term depression. *Neurosci*, 26, 7723–7729.
- Lenders, J., Eisenhofer, G., Abeling, N., Berger, W., Murphy, D., Konings, C., y Brunner, H. (1996). Specific Genetic Deficiencies of the A and B Isoenzymes of Monoamine Oxidase Are Characterized by Distinct Neurochemical and Clinical Phenotypes. *J Clin Invest*, 97(4), 1010–1019.
- Levites, Y., Amit, T., Youdim, M., y Mandel, S. (2002). Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (–)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J. Biol. Chem*, 277, 30574–30580.
- Li, H., y Satinoff, E. (1995). Changes in circadian rhythms of body temperature and sleep in old rats. *The American Journal of Physiology*, 269(1 Pt 2), R208–R214.
- Li, S., Cullen, W., Anwyl, R., y Rowan, M. (2003). Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nature Neuroscience*, 6(5), 526–531. <http://doi.org/10.1038/nn1049>
- Li, X., Chen, C., Tu, Y., Sun, H., Zhao, M., Cheng, S., y Zhang, S. (2013). Sirt1 promotes axonogenesis by deacetylation of akt and inactivation of GSK3. *Molecular Neurobiology*, 48(3):490-9. <http://doi.org/10.1007/s12035-013-8437-3>
- Lin, S.J., Ford, E., Haigis, M., Liszt, G., y Guarente, L. (2004). Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes & Dev*.18:12–16.
- Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M., y Guarente, L. (2005). Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21313–21320. <http://doi.org/10.1074/jbc.M413296200>
- Liu, J., Killilea, D., y Ames, B. (2002). Age-associated mitochondrial oxidative decay: improvement of carnitine acetyltransferase substrate-binding affinity and activity in brain by feeding old rats acetyl-L-carnitine and/or R.-alpha -lipoic acid. *Proc. Natl Acad.*, (99), 1876–1881.
- Liu, J., Yu, H., y Ning, X. (2006). Effect of quercetin on chronic enhancement of spatial learning and memory of mice. *Science in China. Series C, Life Sciences / Chinese Academy of Sciences*, 49(6), 583–590.
- Liu, L., y Chan, C. (2014). The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev*, 15, 6–15.
- Liu, M., Wilk, S., Wang, A., Zhou, L., Wang, R., Ogawa, W., y Liu, F. (2010). Resveratrol inhibits mTOR signaling by promoting the interaction between mTOR and DEPTOR. *Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36387–36394. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.169284>
- Liu, X., Shen, Z., Wu, B., Xia, S., Huang, J., Chen, W., y Ying, J. (2008). Study on changes of protein phosphorylation of p65, IkappaBalpha and IkappaBepsilon in lymphocytes of rats in progress of aging and interventional effect of Epimedium flavonoids. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 33(1), 73–6.
- Liu, Z., Zhuang, C., Sheng, S., Shao, L., Zhao, W., y Zhao, S. (2011). Overexpression of a resveratrol synthase gene (PcRS) from *Polygonum cuspidatum* in transgenic *Arabidopsis* causes the accumulation of trans-piceid with antifungal activity. *Plant Cell Rep*, (30), 2027–2036.
- Lofrumento, D., Nicolardi, G., Cianciulli, A., De Nuccio, F., La Pesa, V., Carofiglio, V., y Panaro, M. (2014). Neuroprotective effects of resveratrol in an MPTP mouse model of Parkinson'slike disease: possible role of SOCS-1 in reducing pro-inflammatory responses. *Innate Immunity*, 20, 249–260. <http://doi.org/10.1177/1753425913488429>

-
- López-Otín, C., Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M., y Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lord, C., y Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481, 287–294. <http://doi.org/10.1038/nature10760>
- Lovenberg, W., Weissbach, H., y Udenfriend, S. (1962). Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem*, 237, 89–93.
- Lu, J., Wu, D., Zheng, Y., Hu, B., Zhang, Z., Shan, Q., y Wang, Y. (2010). Quercetin activates AMP-activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol-induced neurotoxicity. *Journal of Pathology*, 222(2), 199–212. <http://doi.org/10.1002/path.2754>
- Luciana, M., y Collins, P. (1997). Dopaminergic Modulation of Working Memory for Spatial but Not Object Cues in Normal Humans. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 9(3), 330–347. <http://doi.org/10.1162/jocn.1997.9.3.330>
- Luine, V., Bowling, D., y Hearn, M. (1990). Spatial memory deficits in aged rats: Contributions of monoaminergic systems. *Brain Research*, 537(1-2), 271–278. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90368-L](http://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90368-L)
- Ma, J., Yang, W., Zha, H., y Yu, H. (2013). Effect of naringenin on learning and memory ability on model rats with Alzheimer disease. *Zhong Yao Cai*, 36(2), 271–6.
- Ma, X., y Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(5), 307–318. <http://doi.org/10.1038/nrm2672>
- MacEwan, D. (2002). TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cellular Signalling*, 14(6), 477–92. [http://doi.org/10.1016/S0898-6568\(01\)00262-5](http://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00262-5)
- Macready, A., Kennedy, O., Orla, B., Ellis, J., Williams, C., Spencer, J., y Butler, L. (2009). Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes Nutr*, 4(4), 227–42. <http://doi.org/10.1007/s12263-009-0135-4>
- Maiese, K., Chong, Z., Shang, Y., y Wang, S. (2013). mTOR: on target for novel therapeutic strategies in the nervous system. *Trends Mol Med*, 19, 51–60.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., y Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, (79), 727–47.
- Manahan-Vaughan, D., y Kulla, A. (2003). Regulation of depotentiation and long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by dopamine D2-like receptors. *Cerebral Cortex*, 13(2), 123–135. <http://doi.org/10.1093/cercor/13.2.123>
- Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O., y Youdim, M. (2006). Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(2), 229–34. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200500156>
- Mandel, S., Avramovich-Tirosh, Y., Reznichenko, L., Zheng, H., Weinreb, O., Amit, T., y Youdim, M. (2005). Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *Neurosignals*, 14, 46–60.
- Mann, D. (1983). The locus coeruleus and its possible role in ageing and degenerative disease of the human central nervous system. *Mechanisms of Ageing and Development*, 23(1), 73–94. [http://doi.org/0047-6374\(83\)90100-8](http://doi.org/0047-6374(83)90100-8) [pii]

- Manna, S., Mukhopadhyay, A., y Aggarwal, B. (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6509–6519. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6509>
- Mannari, C., Bertelli, E., Stiazzini, G., y Giovannini, L. (2010). Wine, sirtuins and nephroprotection: not only resveratrol. *Medical Hypotheses*, 75(6), 636–8. <http://doi.org/10.1016/j.mehy.2010.08.004>
- Manning, B., y Cantley, L. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274.
- Marcyniuk, B., Mann, D., y Yates, P. (1986). The topography of cell loss from locus caeruleus in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 76(2-3), 335–345.
- Mariani, E., Polidori, M., Cherubini, A., y Mecocci, P. (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 827(1), 65–75. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.04.023>
- Marier, J., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J., y Ducharme, M. (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(1), 369–373. <http://doi.org/10.1124/jpet.102.033340.cesses>.
- Markus, M., y Morris, B. (2008). Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clinical Interventions in Aging*, 3(2), 331–339.
- Martin, S., y Clark, R. (2007). The rodent hippocampus and spatial memory: From synapses to systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 401–431. <http://doi.org/10.1007/s00018-007-6336-3>
- Martín-López, M., Perea, J., Morabet, L., y Navarro, J. (2008). Actualización del papel de la enzima MAO-A en la regulación de la conducta agresiva. *Psiquiatría Biológica*, 15(5).
- Martinon, F. (2010). Signaling by ROS drives inflammasome activation. *European Journal of Immunology*, 40(3), 616-9. <http://doi.org/10.1002/eji.200940168>
- Mawhinney, L., De Rivero Vaccari, J., Dale, G., Keane, R., y Bramlett, H. (2011). Heightened inflammasome activation is linked to age-related cognitive impairment in Fischer 344 rats. *BMC Neurosci*, 12, 123.
- Mayers, J., Iliff, B., y Swoap, S. (2009). Resveratrol treatment in mice does not elicit the bradycardia and hypothermia associated with calorie restriction. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(4), 1032–1040. <http://doi.org/10.1096/fj.08-115923>
- McCorry, L. (2007). Physiology of the autonomic nervous system. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 71(4), 78. <http://doi.org/10.5688/aj710478>
- Meberg, P., Kinney, W., Valcourt, E., y Routtenberg, A. (1996). Gene expression of the transcription factor NF-kB in hippocampus: regulation by synaptic activity. *Mol. Brain Res*, 38, 179–190.
- Medvedev, Z. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc.*, 65(3), 375–98.
- Meltzer, C., Smith, G., DeKosky, S., Pollock, B., Mathis, C., Moore, R., y Reynolds, C. (1998). Serotonin in Aging, Late-Life Depression, and Alzheimer's Disease: The Emerging Role of Functional

- Meneses, A. (1999). 5-HT system and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23(8), 1111–1125. [http://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00067-6](http://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00067-6)
- Mesquita, A., Weinberger, M., Silva, A., Sampaio-Marques, B., Almeida, B., Leão, C., y Ludovico, P. (2010). Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15123–15128. <http://doi.org/10.1073/pnas.1004432107>
- Michán, S., Li, Y., Chou, M., Parrella, E., Ge, H., Long, J., y Longo, V. (2010). SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J. Neurosci.*, 30(29), 9695–9707. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0027-10.2010>
- Michishita, E., McCord, R., Berber, E., Kioi, M., Padilla-Nash, H., Damian, M., y Chua, K. (2008). SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*, 452(7186), 492–6. <http://doi.org/10.1038/nature06736>
- Míguez, J., Aldegunde, M., Paz-Valiñas, L., Recio, J., y Sánchez-Barceló, E. (1999). Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *J. Neural Transm.*, 106, 1089–1098.
- Millan, M., Gobert, A., Roux, S., Porsolt, R., Meneses, A., Carli, M., y Dekeyne, A. (2004). The serotonin_{1A} receptor partial agonist S15535 [4-(benzodioxan-5-yl) 1-(indan-2-yl) piperazine] enhances cholinergic transmission and cognitive function in rodents: a combined neurochemical and behavioral analysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (311), 190–203.
- Milne, J., y Denu, J. (2008). The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 11–7. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.019>
- Milne, J., Lambert, P., Schenk, S., Carney, D., Smith, J., Gagne, D., y Westphal, C. (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, 450(7170), 712–716. <http://doi.org/10.1038/nature06261>
- Missale, C., Nash, S., Robinson, S., Jaber, M., y Caron, M. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189–225. <http://doi.org/10.1186/1471-2296-12-32>
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A., y Klionsky, D. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069–1075. <http://doi.org/10.1038/nature06639>
- Møller, P., Løhr, M., Folkmann, J., Mikkelsen, L., y Loft, S. (2010). Aging and oxidatively damaged nuclear DNA in animal organs. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(10), 1275–85. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.003>
- Moranta, D., Barceló, P., Aparicio, S., Garau, C., Sarubbo, F., Ramis, M., y Esteban, S. (2014). Intake of melatonin increases tryptophan hydroxylase type 1 activity in aged rats: Preliminary study. *Experimental Gerontology*, 49(1), 1–4. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2013.10.012>
- Moranta, D., Esteban, S., y García-Sevilla, J. (2009). Chronic treatment and withdrawal of the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 modulate the sensitivity of presynaptic receptors involved in the regulation of monoamine syntheses in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 379(1), 61–72. <http://doi.org/10.1007/s00210-008-0337-0>
- Moriya, J., Chen, R., Yamakawa, J., Sasaki, K., Ishigaki, Y., y Takahashi, T. (2011). Resveratrol improves hippocampal atrophy in chronic fatigue mice by enhancing neurogenesis and inhibiting apoptosis of

- granular cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34(3), 354–9. <http://doi.org/JST.JSTAGE/bpb/34.354> [pii]
- Moroz, L., y Kohn, A. (2010). Do different neurons age differently? Direct genome-wide analysis of aging in single identified cholinergic neurons. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2. <http://doi.org/10.3389/neuro.24.006.2010>
- Morris, R., Garrud, P., Rawlins, J., y O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681-3. <http://doi.org/10.1038/297681a0>
- Morrison, A., y Chein, J. (2011). Does working memory training work? The promise and challenges of enhancing cognition by training working memory. *Psychonomic Bulletin & Review*, 18(1), 46–60. <http://doi.org/10.3758/s13423-010-0034-0>
- Moskalev, A., Shaposhnikov, M., Plyusnina, E., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., y Fraifeld, V. (2012). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res. Rev*, 12(2), 661-84.
- Mrak, R., y Griffin, W. (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*, 26(3), 349–54. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.05.010>
- Murakami, T., y Takano, M. (2008). Intestinal efflux transporters and drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4(7), 923–39. <http://doi.org/10.1517/17425255.4.7.923> .
- Murchison, C., Zhang, X., Zhang, W., Ouyang, M., Lee, A., y Thomas, S. (2004). A Distinct Role for Norepinephrine in Memory Retrieval. *Cell*, 117(1), 131–143.
- Naciones Unidas. (2013). World Population Prospects: The 2012 Revision. Recuperado el 12 Febrero 2014, de <http://doi.org/21>.
- Nakagawa, T., Lomb, D., Haigis, M., y Guarente, L. (2009). SIRT5 Deacetylates Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 and Regulates the Urea Cycle. *Cell*, 137(3), 560–570. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.026>
- Nakajima, K., Matsushita, Y., Tohyama, Y., Kohsaka, S., y Kurihara, T. (2006). Differential suppression of endotoxin-inducible inflammatory cytokines by nuclear factor kappa B (NFkappaB) inhibitor in rat microglia. *Neuroscience Letters*, 401(3), 199–202. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.014>
- Narita, K., Hisamoto, M., Okuda, T., y Takeda, S. (2011). Differential neuroprotective activity of two different grape seed extracts. *PLoS ONE*, 6(1), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0014575>
- Negre-Salvayre, A., Audebert, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R., y Zarkovic, N. (2010). Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 44(10), 1125–1171. <http://doi.org/10.3109/10715762.2010.498478>
- Nencini, C., Giorgi, G., y Micheli, L. (2007). Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 14(2-3), 129–135. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.02.005>
- Ng, F., Wijaya, L., y Tang, B. (2015). SIRT1 in the brain-connections with aging-associated disorders and lifespan. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(3), 64. <http://doi.org/10.3389/fncel.2015.00064>
- Nieoullon, A. (2002). Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in Neurobiology*, 67(1), 53–83. [http://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00011-4](http://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00011-4)

-
- Nissbrandt, H., Engberg, G., Wikstrom, H., Magnusson, T., y Carlsson, A. (1988). NSD 1034: an amino acid decarboxylase inhibitor with a stimulatory action on dopamine synthesis not mediated by classical dopamine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 338.
- North, B., Marshall, B., Borra, M., Denu, J., y Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*, 11, 437–444.
- O'Neill, M., y Brown, V. (2006). The effect of the adenosine A(2A) antagonist KW-6002 on motor and motivational processes in the rat. *Psychopharmacology*, 184(1), 46–55. <http://doi.org/10.1007/s00213-005-0240-z>
- Oeckinghaus, A., y Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(4), 1–14. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>
- Ogle, W., Speisman, R., y Ormerod, B. (2013). Potential of treating age-related depression and cognitive decline with nutraceutical approaches: A mini-review. *Gerontology*, 59(1), 23-31. <http://doi.org/10.1159/000342208>
- Olton, D. (1978). Characteristics of spatial memory. *Cognitive Processes in Animal Behavior*, 341–73.
- Olton, D., y Samuelson, R. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2(2), 97-116. <http://doi.org/10.1037/0097-7403.2.2.97>
- Olvera-Cortés, E., Pérez-Vega, M., Barajas-López, G., Del Angel-Meza, A., González-Burgos, I., y Feria-Velasco, A. (1998). Place learning impairment in chronically tryptophan-restricted rats. *Nutritional Neuroscience*, 1(3), 223–235. <http://doi.org/10.3109/10284159809162903>
- Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J., Boeke, J., y Feinberg, A. (2002). SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13653–13658. <http://doi.org/10.1073/pnas.222538099>
- Oppenheimer, H., Gabay, O., Meir, H., Haze, A., Kandel, L., Liebergall, M., y Dvir-Ginzberg, M. (2012). 75-Kd Sirtuin 1 Blocks Tumor Necrosis Factor α -Mediated Apoptosis in Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 64(3), 718–728. <http://doi.org/10.1002/art.33407>
- Oršolić, N., Knežević, A., Šver, L., Terzić, S., y Bašić, I. (2004). Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 307–315. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.006>
- Osorio, F., Bárcena, C., Soria-Valles, C., Ramsay, A., de Carlos, F., Cobo, J., y López-Otín, C. (2012). Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- κ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes & Development*, 26(20), 2311–24. <http://doi.org/10.1101/gad.197954.112>
- Ownby, R. (2010). Neuroinflammation and cognitive aging. *Current Psychiatry Reports*, 12(1), 39-45. <http://doi.org/10.1007/s11920-009-0082-1>
- Packard, M., y Knowlton, B. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 563–593. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937>
- Packard, M., y McGaugh, J. (1992). Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behavioral Neuroscience*, 106(3), 439–446. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.106.3.439>

- Packard, M., y Teather, L. (1998). Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiology of Learning and Memory*, 69(2), 163–203. <http://doi.org/10.1006/nlme.1997.3815>
- Paganga, G., Miller, N., y Rice-Evans, C. (1999). The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radical Research*, 30, 153–162. <http://doi.org/10.1080/10715769900300161>
- Pakkenberg, B., y Gundersen, H. (1997). Neocortical neuron number in humans: Effect of sex and age. *Journal of Comparative Neurology*, 384(2), 312–320. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970728\)384:2<312::AID-CNE10>3.0.CO;2-K](http://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970728)384:2<312::AID-CNE10>3.0.CO;2-K)
- Pallauf, K., y Rimbach, G. (2013). Autophagy, polyphenols and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*, 12(1):237-52. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.008>
- Pandey, K., y Rizvi, S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
- Park, D., Lautenschlager, G., Hedden, T., Davidson, N., Smith, A., y Smith, P. (2002). Models of visuospatial and verbal memory across the adult life span. *Psychology and Aging*, 17(2), 299–320. <http://doi.org/10.1037/0882-7974.17.2.299>
- Parker, J., Arango, M., Abderrahmane, S., Lambert, E., Tourette, C., Catoire, H., y Néri, C. (2005). Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nature Genetics*, 37(4), 349–350. <http://doi.org/10.1038/ng1534>
- Payer, D., Marshuetz, C., Sutton, C., Hebrank, A., Welsh, R., y Park, D. (2006). Decreased neural specialization in old adults on a working memory task. *Neuroreport*, 17(5), 487–91. <http://doi.org/10.1097/01.wnr.0000209005.40481.31>
- Peng, C., Lu, Z., Xie, Z., Cheng, Z., Chen, Y., Tan, M., y Zhao, Y. (2011). The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 10(12), M111.012658. <http://doi.org/10.1074/mcp.M111.012658>
- Penner, M., y Mizumori, S. (2012). Age-associated changes in the hippocampal-ventral striatum-ventral tegmental loop that impact learning, prediction, and context discrimination. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 4(8), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fnagi.2012.00022>
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., y Osuna, A. (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, 61(1), 67–75. [http://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70008-8](http://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70008-8)
- Perkins, N. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(1), 49–62. <http://doi.org/10.1038/nrm2083>
- Pervaiz, S., Holme, A., y Aggarwal, B. (2009). Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid Redox Signal*, 11, 2851–97.
- Peters, A. (2002). The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: A review. *Journal of Neurocytology*, 31(8-9), 581-93. <http://doi.org/10.1023/A:1025731309829>
- Phillips, A. (2003). Mesocorticolimbic dopamine: a neurochemical link between motivation and memory. *International Congress Series*, 1250, 509-526. [http://doi.org/10.1016/S0531-5131\(03\)00188-2](http://doi.org/10.1016/S0531-5131(03)00188-2)
- Phillips, P., Stuber, G., Heien, M., Wightman, R., y Carelli, R. (2003). Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, 422(6932), 614–618. <http://doi.org/10.1038/nature01664>

-
- Pietá Dias, C., Martins de Lima, M., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Garcia, V., Siciliani Scalco, F., y Schröder, N. (2007). Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience*, 146(4), 1719–25.
- Pietsch, K., Saul, N., Menzel, R., Sturzenbaum, S., y Steinberg, C. (2009). Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology*, 10, 565–578.
- Pignatelli, P., Ghiselli, A., Buchetti, B., Carnevale, R., Natella, F., Germanò, G., y Violi, F. (2006). Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis*, 188(1), 77–83. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.025>
- Pitossi, F., Del Rey, A., Kabiersch, A., y Besedovsky, H. (1997). Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *Journal of Neuroscience Research*, 48, 287–298.
- Planas, J., Colom, H., y Juan, M. (2011). Resveratrol: A polyphenol with multiple effects. In D. Muñoz-Torrero (Ed.), *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* (pp. 101–120). Transworld Research Network.
- Poldrack, R., y Packard, M. (2003). Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*, 41, 245–251. [http://doi.org/10.1016/S0028-3932\(02\)00157-4](http://doi.org/10.1016/S0028-3932(02)00157-4)
- Powers, E., Morimoto, R., Dillin, A., Kelly, J., y Balch, W. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Biochem*, 78, 959–991.
- Price, N., Gomes, A., Ling, A., Duarte, F., Martin-Montalvo, A., North, B., y Sinclair, D. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metabolism*, 15(5), 675–690. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.003>
- Pu, F., Mishima, K., Irie, K., Motohashi, K., Tanaka, Y., Orito, K., y Fujiwara, M. (2007). Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 104, 329–334. <http://doi.org/10.1254/jphs.FP0070247>
- Qin, W., Yang, T., Ho, L., Zhao, Z., Wang, J., Chen, L., y Pasinetti, G. (2006). Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem*, 281(31), 21745–54.
- Queen, B., y Tollefsbol, T. (2010). Polyphenols and aging. *Current Aging Science*, 3(1), 34–42. <http://doi.org/10.2174/1874609811003010034>
- Quintas, A., De Solís, A. J., Díez-Guerra, F. J., Carrascosa, J. M., y Bogoñez, E. (2012). Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus. Prevention by late onset caloric restriction. *Experimental Gerontology*, 47(2), 198–201. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2011.11.010>
- Quivy, V., y Van Lint, C. (2004). Regulation at multiple levels of NF- κ B-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1221–1229.
- Rahigude, A., Bhutada, P., Kaulaskar, S., Aswar, M., y Otari, K. (2012). Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. *Neuroscience*, 226, 62–72. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.026>
- Rajendrasozhan, S., Yang, S., Edirisinghe, I., Yao, H., Adenuga, D., y Rahman, I. (2008). Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in

- pathogenesis of COPD. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(4), 799–811. <http://doi.org/10.1089/ars.2007.1938>
- Ramis, M., Sarubbo, F., Sola, J., Aparicio, S., Garau, C., Miralles, A., y Esteban, S. (2013). Cognitive improvement by acute growth hormone is mediated by NMDA and AMPA receptors and MEK pathway. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 45, 11–20. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.005>
- Ramis, M., Sarubbo, F., Terrasa, J., Moranta, D., Aparicio, S., Miralles, A., y Esteban, S. (2015). Chronic α -tocopherol increases central monoamines synthesis and improves cognitive and motor abilities in old rats. *Rejuvenation Research*, en prensa.
- Randall, P., Pardo, M., Nunes, E., López Cruz, L., Vemuri, V., y Makriyannis, A. (2012). Dopaminergic Modulation of Effort-Related Choice Behavior as Assessed by a Progressive Ratio Chow Feeding Choice Task: Pharmacological Studies and the Role of Individual Differences. *PLoS One*, 7(10).
- Rando, T., y Chang, H. (2012). Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: Resetting the aging clock. *Cell*, 148(1-2), 46–57. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.003>
- Rao, J., Kellom, M., Kim, H., Rapoport, S., y Reese, E. (2012). Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochemical Research*, 37(5), 903–10. <http://doi.org/10.1007/s11064-012-0708-2>
- Raza, S., Khan, M., Ahmad, A., Ashafaq, M., Islam, F., Wagner, P., y Islam, F. (2013). Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF- κ B signaling pathway in experimental stroke. *Neuroscience*, 230, 157–171. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.041>
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., y Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(3), 659–661. <http://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>
- Reinert, K., Umphlet, C., Quattlebaum, A., y Boger, H. (2014). Short-term effects of an endotoxin on substantia nigra dopamine neurons. *Brain Research*, 1557, 164–170. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.02.005>
- Reiter, R. (1998 a). Melatonin, active oxygen species and neurological damage. *Drug News & Perspectives*, 11(5), 291–296. <http://doi.org/10.1358/dnp.1998.11.5.863675>
- Reiter, R. (1998 b). Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Progress in Neurobiology*, 56(3), 359–384. [http://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00052-5](http://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00052-5)
- Reiter, R., Acuña-Castroviejo, D., Tan, D., y Burkhardt, S. (2001). Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 939, 200–215. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03627.x>
- Revollo, J., y Li, X. (2013). The ways and means that fine tune Sirt1 activity. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(3), 160–7. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.12.004>
- Reznikoff, G., Manaker, S., Rhodes, C., Winokur, A., y Rainbow, T. (1986). Localization and quantification of beta-adrenergic receptors in human brain. *Neurology*, 36(8), 1067–1073.
- Rice-Evans, C., Miller, N., y Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–56. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](http://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

-
- Rinaldi, P., Polidori, M., Metastasio, A., Mariani, E., Mattioli, P., Cherubini, A., y Mecocci, P. (2003). Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24, 915–919. [http://doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00031-9](http://doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00031-9)
- Rine, J., Strathern, J., Hicks, J., y Herskowitz, I. (1979). A suppressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for and identification of cryptic mating-type loci. *Genetics*, 93(4), 877–901.
- Rinne, J., Sahlberg, N., Ruottinen, H., Någren, K., y Lehtikoinen, P. (1998). Striatal uptake of the dopamine reuptake ligand [11C]beta-CFT is reduced in Alzheimer's disease assessed by positron emission tomography. *Neurology*, 50(1), 152–6.
- Ristow, M., y Schmeisser, K. (2014). Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response*, 12(2), 288–341.
- Ristow, M., y Zarse, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology*, 45(6), 410-8. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.014>
- Rizzo, V., Richman, J., y Puthanveetil, S. (2015). Dissecting mechanisms of brain aging by studying the intrinsic excitability of neurons. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 337.
- Rodgers, J., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S., Spiegelman, B., y Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*, 434(7029), 113-8. <http://doi.org/10.1038/nature03354>
- Rodier, F., y Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 192(4):547-56. <http://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Rojanathammanee, L., Puig, K., y Combs, C. (2013). Pomegranate polyphenols and extract inhibit nuclear factor of activated T-cell activity and microglial activation in vitro and in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Nutrition*, 143, 597–605. <http://doi.org/10.3945/jn.112.169516>
- Rose, K., Parmar, M., y Cavanaugh, J. (2014). Dietary supplementation with resveratrol protects against striatal dopaminergic deficits produced by in utero LPS exposure. *Brain Research*, 1573, 37–43. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.05.028>
- Rueda-Orozco, P., Soria-Gomez, E., Montes-Rodriguez, C., Martínez-Vargas, M., Galicia, O., Navarro, L., y Prospero-García, O. (2008). A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology*, 198(4), 565–576. <http://doi.org/10.1007/s00213-007-0911-z>
- Russell, S., y Kahn, C. (2007). Endocrine regulation of ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 681–691. <http://doi.org/10.1038/nrm2234>
- Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., y Russo, G. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochemical Pharmacology*, 83(1), 6–15. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.08.010>
- Sahakian, B., Sarna, G., Kantamaneni, B., Jackson, A., Hutson, P., y Curzon, G. (1985). Association between learning and cortical catecholamines in non-drug-treated rats. *Psychopharmacology*, 86(3), 339–343. <http://doi.org/10.1007/BF00432225>
- Salminen, A., Hyttinen, J. M., Kauppinen, A., y Kaarniranta, K. (2012 a). Context-Dependent Regulation of Autophagy by IKK-NF-kappaB Signaling: Impact on the Aging Process. *Int J Cell Biol*, 2012, 849541. <http://doi.org/10.1155/2012/849541>

- Salminen, A., y Kaarniranta, K. (2009). NF-kappaB signaling in the aging process. *Journal of Clinical Immunology*, 29(4), 397–405. <http://doi.org/10.1007/s10875-009-9296-6>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., y Kauppinen, A. (2012 b). Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging*, 4(3), 166–75.
- Salminen, A., Kauppinen, A., Suuronen, T., y Kaarniranta, K. (2008 a). SIRT1 longevity factor suppresses NF- κ B-driven immune responses: Regulation of aging via NF- κ B acetylation? *BioEssays*, 30(10), 939–942. <http://doi.org/10.1002/bies.20799>
- Salminen, A., Ojala, J., Huuskonen, J., Kauppinen, A., Suuronen, T., y Kaarniranta, K. (2008 b). Interaction of aging-associated signaling cascades: Inhibition of NF- κ B signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(7-8):1049-58. <http://doi.org/10.1007/s00018-008-7461-3>
- Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., y Kauppinen, A. (2012 c). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: Impact on the aging process and age-related diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(18), 2999–3013. <http://doi.org/10.1007/s00018-012-0962-0>
- Salthouse, T. (1993). Attentional blocks are not responsible for age-related slowing. *Journal of Gerontology*, 48(6), P263–70.
- Salthouse, T., y Somberg, B. (1982). Isolating the age deficit in speeded performance. *J Gerontol*, 37(1), 59–63.
- Samardžić, J., Obradović, D., y Gojković-Bukarica, L. (2013). Behavioral characterisation of trans-resveratrol effects in rats. In L. Č. Popović, M. Vidaković, y D. S. Kostić (Eds.), *Resources of Danubian Region: the Possibility of Cooperation and Utilization* (pp. 296–304). Belgrade Humboldt-Club Serbien.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C., y Masella, R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 43, 394–405.
- Sara, S., Dyon-Laurent, C., y Hervé, A. (1995). Novelty seeking behavior in the rat is dependent upon the integrity of the noradrenergic system. *Brain Res Cogn Brain Res*, 2, 181–187.
- Sara, S., Vankov, A., y Hervé, A. (1994). Locus coeruleus-evoked responses in behaving rats: a clue to the role of noradrenaline in memory. *Brain Res Bull*, 35, 457–465.
- Sarubbo, F., Ramis, M., Aparicio, S., Ruiz, L., Esteban, S., Miralles, A., y Moranta, D. (2015). Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats. *Age*, 37(37), 9777.
- Sastre-Coll, A., Esteban, S., y García-Sevilla, J. (2002). Supersensitivity of 5-HT_{1A}-autoreceptors and α ₂-adrenoceptors regulating monoamine synthesis in the brain of morphine-dependent rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 365(3), 210–219.
- Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R., y Steinberg, C. (2008). Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: Is DAF-16 involved? *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(10), 611–613. <http://doi.org/10.1016/j.mad.2008.07.001>
- Scalbert, A., Johnson, I., y Saltmarsh, M. (2005 a). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* J, 81(1), 215S–217S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., y Jiménez, L. (2005 b). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306. <http://doi.org/10.1080/1040869059096>

-
- Scalbert, A., y Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, 3(2), 121–125. <http://doi.org/10.1089/109662000416311>
- Schaffer, S., y Halliwell, B. (2012). Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes and Nutrition*, 7, 99–109. <http://doi.org/10.1007/s12263-011-0255-5>
- Schatzberg, A., y Nemeroff, C. (2006). *Textbook of psychopharmacology*. Washington: Masson.
- Schmitt, J. A., Jorissen, B., Sobczak, S., van Boxtel, M., Hogervorst, E., Deutz, N., y Riedel, W. (2000). Tryptophan depletion impairs memory consolidation but improves focussed attention in healthy young volunteers. *Journal of psychopharmacology* (Vol. 14).
- Schmitz, M., Mattioli, I., Buss, H., y Kracht, M. (2004). NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem*, 5(10), 1348–58.
- Seamans, J., Floresco, S., y Phillips, G. (1998). D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(4), 1613–1621.
- Seidler, R., Rachael, D., Bernard, J., Burutolu, T., Taritonye, B., Fling, B., y Lipps, D. (2010). Motor control and aging: Links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(5), 721–733. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.10.005>
- Seidler-Dobrin, R., He, J., y Stelmach, G. (1998). Coactivation to reduce variability in the elderly. *Motor Control*, 2(4), 314–330.
- Selcher, J., Atkins, C., Trzaskos, J., Paylor, R., y Sweatt, J. (1999). A Necessity for MAP Kinase Activation in Mammalian Spatial Learning. *Learning & Memory*, 6(5), 478–490.
- Sengottuvelan, M., Viswanathan, P., y Nalini, N. (2006). Chemopreventive effect of trans-resveratrol - A phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 27(5), 1038–1046. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgi286>
- Sengupta, P. (2011). A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age? *International, Biomedicine*, 81–89.
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*, 4(6), 624–630. <http://doi.org/23930179>
- Setchell, K., Faughnan, M., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N., Wolfe, B., y Cassidy, A. (2003). Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(2), 411–419.
- Seyedabadi, M., Fakhfour, G., Ramezani, V., Mehr, S., y Rahimian, R. (2014). The role of serotonin in memory: interactions with neurotransmitters and downstream signaling. *Experimental Brain Research*, 1–16. <http://doi.org/10.1007/s00221-013-3818-4>
- Shakibaei, M., Harikumar, K., y Aggarwal, B. (2009). Review: Resveratrol addiction: To die or not to die. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(1), 115–28. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200800148>
- Shapiro, M. (2001). Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps. *Archives of Neurology*, 58(6), 874–881. <http://doi.org/10.1001/archneur.58.6.874>
- Shaw, A., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A., y Lord, J. (2010). Aging of the innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, 22(4), 507–13. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2010.05.003>

- Shields, P., y Eccleston, D. (1972). Effects of electrical stimulation of rat midbrain on 5-hydroxytryptamine synthesis as determined by a sensitive radioisotope method. *J Neurochem*, 19, 265–272.
- Shipstead, Z., Redick, T., y Engle, R. (2010). Does working memory training generalize? *Psychologica Belgica*, 17(2), 245–276. <http://doi.org/10.3758/PBR.17.2.193>
- Shukitt-Hale, B., Cheng, V., y Joseph, J. (2009). Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutritional Neuroscience*, 12(3), 135–140. <http://doi.org/10.1179/147683009X423292>
- Sibille, E. (2013). Molecular aging of the brain, neuroplasticity, and vulnerability to depression and other brain-related disorders. *Dialogues-Cns*, 53–65.
- Sidorova-Darmos, E., Wither, R., Shulyakova, N., Fisher, C., Ratnam, M., Aarts, M., y Eubanks, J. (2014). Differential expression of sirtuin family members in the developing, adult, and aged rat brain. *Front Aging Neurosci*, 6, 333.
- Siebenlist, U., Franzoso, G., y Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu. Rev. Cell Biol*, 10, 405–455.
- Siebold, A., Banerjee, R., Tie, F., Kiss, D., Moskowitz, J., y Harte, P. (2010). Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 169–174. <http://doi.org/10.1073/pnas.0907739107>
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295. <http://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Silvers, J., Harrod, S., Mactutus, C., y Booze, R. (2007). Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 166(1), 99–103. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.06.032>
- Simi, A., Lerouet, D., Pinteaux, E., y Brough, D. (2007). Mechanisms of regulation for interleukin-1 β in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, (52), 1563–1569.
- Singh, A., Naidu, P., y Kulkarni, S. (2003). Reversal of aging and chronic ethanol-induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid. *Free Radical Research*, 37(11), 1245–1252. <http://doi.org/10.1080/10715760310001616014>
- Smith, J., Brachmann, C., Celic, I., Kenna, M., Muhammad, S., Starai, V., y Boeke, J. (2000). A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97(6658–6663).
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., y Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](http://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Smoliga, J., Vang, O., y Baur, J. (2012). Challenges of translating basic research into therapeutics: resveratrol as an example. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 67(2), 158–67. <http://doi.org/10.1093/gerona/glr062>
- Smoliga, J., Baur, J., y Hausenblas, H. (2011). Resveratrol and health—a comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(8), 1129–1141. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201100143>
- Sohal, R., Arnold, L., y Orr, W. (1990 a). Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev*, 56(3), 223–35.

-
- Sohal, R., Arnold, L., y Sohal, B. (1990 b). Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 495–500. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90127-5](http://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90127-5)
- Someya, S., Yu, W., Hallows, W., Xu, J., Vann, J., Leeuwenburgh, C., y Prolla, T. (2010). Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under Caloric Restriction. *Cell*, 143(5), 802–812. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.002>
- Somjen, G. (1988). Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia*, 1, 2–9.
- Song, K., Wang, H., Krebs, T., y Danielpour, D. (2005). Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF- β /ALK5-mediated Smad3 activation. *EMBO J*, 25(1), 58–69.
- Spencer, J. (2009 a). Flavonoids and brain health: Multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes and Nutrition*, 4(4), 243–50. <http://doi.org/10.1007/s12263-009-0136-3>
- Spencer, J. (2009 b). The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 1152–1161. <http://doi.org/10.1039/b800422f>
- Spencer, J. (2010). The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *The British Journal of Nutrition*, 104 Suppl, S40–S47. <http://doi.org/10.1017/S0007114510003934>
- Spencer, J., Vafeiadou, K., Williams, R., Vauzour, D., Spencer, J., Vafeiadou, K., y Vauzour, D. (2012). Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Molecular Aspects of Medicine*, 33, 83–97.
- Sprague, J., Preston, A., Leifheit, M., y Woodside, B. (2003). Hippocampal serotonergic damage induced by MDMA (ecstasy): effects on spatial learning. *Physiol Behav*, 79(2), 281–7.
- Steelman, L., Chappell, W., Abrams, S., Kempf, C., Long, J., Laidler, P., y McCubrey, J. (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*, 3(3), 192–222.
- Stefani, M., y Moghaddam, B. (2006). Rule learning and reward contingency are associated with dissociable patterns of dopamine activation in the rat prefrontal cortex, nucleus accumbens, and dorsal striatum. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(34), 8810–8818. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1656-06.2006>
- Suhara, T., Fukuda, H., Inoue, O., Itoh, T., Suzuki, K., Yamasaki, T., y Tateno, Y. (1991). Age-related changes in human D1 dopamine receptors measured by positron emission tomography. *Psychopharmacology*, 103(1), 41–5. <http://doi.org/10.1007/BF02244071>
- Surai, P. (2015). Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxidants*, 4(1), 204–247. <http://doi.org/10.3390/antiox4010204>
- Swanson, L., y Hartman, B. (1975). The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J.Comp. Neurol*, 163, 467–505.
- Sweatt, J. (2003). *Mechanisms of memory* (pp. 3–28). USA: Academic press.
- Sweatt, J. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(3), 311–7. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2004.04.001>
- Takaoka, M. (1939). Resveratrol, a new phenolic compound, from *Veratrum grandiflorum*. *Journal of the Chemical Society of Japan*, 60, 1090–1100.

- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., y Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21362–21368. <http://doi.org/10.1074/jbc.M600504200>
- Takeuchi, H., Taki, Y., y Kawashima, R. (2010). Effects of working memory training on cognitive functions and neural systems. *Reviews in the Neurosciences*, 21(6), 427–449.
- Tarragon, E., Lopez, L., Ros-Bernal, F., Yuste, J., Ortiz-Cullera, V., Martin, E., y Herrero, M. (2012). The Radial Arm Maze (RAM) for the Evaluation of Working and Reference Memory Deficits in the Diurnal Rodent *Octodon degus*. In and P. H. Z. A.J. Spink, F. Grieco, O.E. Krips, L.W.S. Loijens, L.P.J.J. Noldus (Ed.), *Proceedings of Measuring Behavior*.
- Taylor, R., Adrain, C., y Martin, S. (2005). Proteases, proteasomes and apoptosis: breaking Ub is hard to do. *Cell Death Differ.*, 12(9), 1213–7.
- Tillu, D., Melemedjian, O., Asiedu, M., Qu, N., De Felice, M., Dussor, G., y Price, T. (2012). Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and mTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain. *Molecular Pain*, 8:5. <http://doi.org/10.1186/1744-8069-8-5>
- Tilstra, J., Robinson, A., Wang, J., Gregg, S., Clauson, C., Reay, D., y Robbins, P. (2012). NF- κ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 2601–2612. <http://doi.org/10.1172/JCI45785>
- Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F., García-Conesa, M., y Espín, J. (2013). Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 6064–93. <http://doi.org/10.2174/13816128113199990407>
- Toumi, M., Merzoug, S., Baudin, B., y Tahraoui, A. (2013). Quercetin alleviates predator stress-induced anxiety-like and brain oxidative signs in pregnant rats and immune count disturbance in their offspring. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 107, 1–10.
- Troca-Marín, J., Alves-Sampaio, A., y Montesinos, M. (2011). An increase in basal BDNF provokes hyperactivation of the Akt-mammalian target of rapamycin pathway and deregulation of local dendritic translation in a mouse model of Down's syndrome. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(26), 9445–9455.
- Truelsen, T., Thudium, D., Grønbaek, M., Copenhagen, T., y Heart, C. (2002). Amount and type of alcohol and risk of dementia: the Copenhagen City Heart Study. *Neurology*, 59(9), 1313–1319. <http://doi.org/10.1212/01.WNL.0000031421.50369.E7>
- Tsunemi, A., Utsuyama, M., Seidler, B., Kobayashi, S., y Hirokawa, K. (2005). Age-related decline of brain monoamines in mice is reversed to young level by Japanese herbal medicine. *Neurochemical Research*, 30(1), 75–81. <http://doi.org/10.1007/s11064-004-9688-1>
- Tyihák, E., Király-Véghely, Z., y Móricz, A. (2011). Multiple beneficial effects of resveratrol and their chemical-biochemical basis. *Nat Prod Commun.*, 6(5), 631–8.
- U.S. Department of Health and Human services. (en línea). *ClinicalTrials.gov*. Recuperado el 10 de enero de 2016, de <https://clinicaltrials.gov/>
- Urbanska, M., Gozdz, A., Swiech, L., y Jaworski, J. (2012). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30240–30256. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.374405>

-
- Vakhrusheva, O., Smolka, C., Gajawada, P., Kostin, S., Boettger, T., Kubin, T., y Bober, E. (2008). Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circulation Research*, 102(6), 703–710.
- Valls-Pedret, C., Lamuela-Raventós, R., Medina-Remón, A., Quintana, M., Corella, D., Pintó, X., y Ros, E. (2012). Polyphenol-rich foods in the Mediterranean diet are associated with better cognitive function in elderly subjects at high cardiovascular risk. *JAD, Journal of Alzheimer's Disease*, 29, 773–782.
- Van der Veen, F., Evers, E., van Deursen, J., Deutz, N., Backes, W., y Schmitt, J. (2006). Acute tryptophan depletion reduces activation in the right hippocampus during encoding in an episodic memory task. *NeuroImage*, 31, 1188–1196. <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.01.014>
- Van Dyck, C., Seibyl, J., Malison, R., Laruelle, M., Wallace, E., Zoghbi, S. S., y Hoffer, P. B. (1995). Age-related decline in striatal dopamine transporter binding with iodine-123-beta-CITSPECT. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 36(7), 1175–81. <http://doi.org/10.1097/00019442-200201000-00005>
- Van Eldik, L., Thompson, W., Ranaivo, H., Behanna, H., y Martin Watterson, D. (2007). Glia Proinflammatory Cytokine Upregulation as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Diseases: Function-Based and Target-Based Discovery Approaches. *International Review of Neurobiology*, 82, 277-96. [http://doi.org/10.1016/S0074-7742\(07\)82015-0](http://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)82015-0)
- Van Raamsdonk, J., y Hekimi, S. (2009). Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, 5(2), e1000361.
- Vankov, A., Herve-Minvielle, A., y Sara, S. (1995). Response to novelty and its rapid habituation in locus coeruleus neurons of the freely exploring rat. *European Journal of Neuroscience*, 7(6), 1180–1187. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01108.x>
- Vauzour, D. (2012). Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 914273. <http://doi.org/10.1155/2012/914273>
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C., y Spencer, J. (2008). The neuroprotective potential of flavonoids: A multiplicity of effects. *Genes and Nutrition*, 3(3-4), 115–126. <http://doi.org/10.1007/s12263-008-0091-4>
- Venero, J., Machado, A., y Cano, J. (1991). Turnover of dopamine and serotonin and their metabolites in the striatum of aged rats. *J. Neurochem.*, 56, 1940–1948.
- Venigalla, M., Gyengesi, E., Sharman, M., y Münch, G. (2015). Novel promising therapeutics against chronic neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, en prensa.
- Venkataraman, K., Khurana, S., y Tai, T. (2013). Oxidative stress in aging-matters of the heart and mind. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17897–17925. <http://doi.org/10.3390/ijms140917897>
- Vicens, P., Redolat, R., y Carrasco, M. (2003). Spatial learning and water maze: methodology and utilities. *Psicothema*, 15(4), 539–544.
- Viljoen, M., y Panzer, A. (2007). The central noradrenergic system: an overview. *African Journal of Psychiatry*, 10(3), 135–41.
- Viña, J., y Borrás Consuelo, M. (2007). Theories of Ageing. *Life*, 59(4 – 5), 249 – 254.

- Vitrac, X., Desmouliere, A., y Brouillaud, B. (2003). Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci*, 72, 2219–2233.
- Volkow, N., Gur, R., Wang, G., Fowler, J., Moberg, P., Ding, Y., y Logan, J. (1998). Association between decline in brain dopamine activity with age and cognitive and motor impairment in healthy individuals. *American Journal of Psychiatry*, 155(3), 344–349. <http://doi.org/10.1176/ajp.157.1.75>
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M., Oatis, J., y Walle, U. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(12), 1377–1382. <http://doi.org/10.1124/dmd.104.000885>
- Walther, D., Peter, J., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., y Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299(5603), 76. <http://doi.org/10.1126/science.1078197>
- Wang, G., Amato, S., Gilbert, J., y Man, H. (2015). Resveratrol up-regulates AMPA receptor expression via AMP-activated protein kinase-mediated protein translation. *Neuropharmacology*, 95, 144–53. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.003>
- Wang, J., Wen, L., Huang, Y., Chen, Y., y Ku, M. (2006). Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 3521–3533. <http://doi.org/10.2174/138161206778343109>
- Wang, L., Wang, C., Jia, Y., Liu, Z., Shu, X., y Liu, K. (2015). Resveratrol Increases Anti-Proliferative Activity of Bestatin Through Downregulating P-Glycoprotein Expression Via Inhibiting PI3K/Akt/mTOR Pathway in K562/ADR Cells. *J Cell Biochem*, en prensa.
- Wang, Y., Xu, H., Fu, Q., Ma, R., y Xiang, J. (2011). Protective effect of resveratrol derived from *Polygonum cuspidatum* and its liposomal form on nigral cells in parkinsonian rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 304(1-2), 29–34. <http://doi.org/10.1016/j.jns.2011.02.025>
- Wang, Z., Wu, D., Huang, F., y Yang, G. (2004). Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain Research*, 996(1), 55–66. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.09.074>
- Weiner, N. (1970). Regulation of norepinephrine biosynthesis. *Annu Rev Pharmacol*, 10, 273–290.
- Wen, J., Ribeiro, R., y Zhang, Y. (2011). Specific PKC isoforms regulate LPS-stimulated iNOS induction in murine microglial cells. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 38. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-8-38>
- Wenzel, E., Soldo, T., Erbersdobler, H., y Somoza, V. (2005). Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(5), 482–494. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200500003>
- Wenzel, U. (2006). Nutrition, sirtuins and aging. *Genes & Nutrition*, 1(2), 85–93. <http://doi.org/10.1007/BF02829950>
- White, N., y McDonald, R. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77(2), 125–184. <http://doi.org/10.1006/nlme.2001.4008>
- Wilkerson, A., y Levin, E. (1999). Ventral hippocampal dopamine D1 and D2 systems and spatial working memory in rats. *Neuroscience*, 89(3), 743–749. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00346-7](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00346-7)
- Williams, C., El Mohsen, M., Vauzour, D., Rendeiro, C., Butler, L., Ellis, J., y Spencer, J. (2008). Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB

-
- phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(3), 295–305. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.008>
- Williams, G., y Goldman-Rakic, P. (1995). Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature*, 376(6541), 572–575. <http://doi.org/10.1038/376572a0>
- Wilson, I., Gallagher, M., Eichenbaum, H., y Tanila, H. (2006). Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding. *Trends in Neurosciences*, 29(12), 662–670. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2006.10.002>
- Wilson, R., Barnes, L., Mendes, De Leon, C., Aggarwal, N., Schneider, J., y Bennett, D. (2002). Depressive symptoms, cognitive decline, and risk of AD in older persons. *Neurology August*, 59(3), 364–370. <http://doi.org/10.1212/WNL.59.3.364>
- Wong, T., Campbell, P., Ribeiro-da-Silva, A., y Cuello, A. (1998). Synaptic numbers across cortical laminae and cognitive performance of the rat during ageing. *Neuroscience*, 84(2), 403–412. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00485-5](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00485-5)
- Wonodi, I., y Schwarcz, R. (2010). Cortical kynurenine pathway metabolism: A novel target for cognitive enhancement in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 36(2), 211–8. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbq002>
- Wu, A., Ying, Z., y Gomez-Pinilla, F. (2006). Oxidative stress modulates Sir2alpha in rat hippocampus and cerebral cortex. *The European Journal of Neuroscience*, 23(10), 2573–80. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04807.x>
- Xie, J., Zhang, X., y Zhang, L. (2013). Negative regulation of inflammation by SIRT1. *Pharmacological Research*, 67(1), 60–67. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.010>
- Xu, Y., Wang, Z., You, W., Zhang, X., Li, S., Barish, P., y Ogle, W. (2010). Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of serotonin and noradrenaline system. *European Neuropsychopharmacology*, 20(6), 405–413. <http://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.02.013>
- Yamamoto, H., Schoonjans, K., y Auwerx, J. (2007 a). Sirtuin functions in health and disease. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(8), 1745–55. <http://doi.org/10.1210/me.2007-0079>
- Yamamoto, N., Sawada, H., Kume, T., Katsuki, H., Shimohama, S., y Akaike, A. (2007 b). Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress: relevance to Parkinson disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4364–72. <http://doi.org/10.1074/jbc.M603712200>
- Yang, F., Chu, X., Yin, M., Liu, X., Yuan, H., Niu, Y., y Fu, L. (2014). MTOR and autophagy in normal brain aging and caloric restriction ameliorating age-related cognition deficits. *Behavioural Brain Research*, 264, 82–90. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.005>
- Yang, P., Yang, C., Huang, C., y Hsu, K. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. *Journal of Biological Chemistry*, 283(5), 2631–2643. <http://doi.org/10.1074/jbc.M706954200>
- Yang, T., Wang, L., Zhu, M., Zhang, L., y Yan, L. (2015). Properties and molecular mechanisms of resveratrol: a review. *Pharmazie*, 70(8), 501–6.
- Yankner, B., Lu, T., y Loerch, P. (2008). The aging brain. *Annual Review of Pathology*, 3, 41–66. <http://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.092044>

- Yañez, M., Fraiz, N., Cano, E., y Orallo, E. (2006). Inhibitory effects of cis- and transresveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem Biofisiol Res Commun*, 344, 688–695.
- Yao, H., Chung, S., Hwang, J., Rajendrasozhan, S., Sundar, I., Dean, D., y Rahman, I. (2012). SIRT1 protects against emphysema via FOXO3-mediated reduction of premature senescence in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 2032–2045. <http://doi.org/10.1172/JCI60132>
- Yao, L., Jiang, Y., Shi, J., Tomás-Barberán, F., Datta, N., Singanusong, R., y Chen, S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(3), 113–122. <http://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7>
- Yeung, F., Hoberg, J., Ramsey, C., Keller, M., Jones, D., Frye, R., y Mayo, M. (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO Journal*, 23(12), 2369–2380. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600244>
- Yoon, J., Chae, M., Jang, S., Lee, S., y Lee, E. (2012). Antifibrotic effects of quercetin in primary orbital fibroblasts and orbital fat tissue cultures of Graves' orbitopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(9), 5921–9. <http://doi.org/10.1167/iovs.12-9646>
- Youdim, K., Qaiser, M., Begley, D., Rice-Evans, C., y Abbott, N. (2004). Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(5), 592–604. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023>
- Youdim, M., y Bakhle, Y. (2006). Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology*, 147 Suppl, S287–S296. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706464>
- Youdim, M., Collins, G., Sandler, M., Bevan, J., Pare, C., y Nicholson, W. (1972). Biological Sciences: Human Brain Monoamine Oxidase: Multiple Forms and Selective Inhibitors. *Nature*, 225 – 228.
- Young, S., y Gauthier, S. (1981). Tryptophan availability and the control of 5-hydroxytryptamine and tryptamine synthesis in human CNS. *Adv Exp Med Biol*, 133, 221–230.
- Young, W., y Kuhar, M. (1980). Noradrenergic alpha 1 and alpha 2 receptors: light microscopic autoradiographic localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(3), 1696–1700.
- Yu, Y., Wang, R., Chen, C., Du, X., Ruan, L., Sun, J., y Xu, Y. (2013). Antidepressant-like effect of trans-resveratrol in chronic stress model: Behavioral and neurochemical evidences. *Journal of Psychiatric Research*, 47(3), 315–322. <http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.10.018>
- Yun, J., y Finkel, T. (2014). Mitohormesis. *Cell Metabolism*, 19(5), 757–766. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.011>
- Zamin, L., Dillenburg-Pilla, P., Argenta-Comiran, R., Horn, A., Simão, F., Nassif, M., y Salbego, C. (2006). Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiology of Disease*, 24(1), 170–82. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.06.002>
- Zhang, F., Wang, S., Gan, L., Vosler, P., Gao, Y., Zigmond, M., y Chen, J. (2011). Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 95(3), 373–95. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.09.001>
- Zhang, G., Li, J., Purkayastha, S., Tang, Y., Zhang, H., Yin, Y., y Cai, D. (2013). Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature*, 497(7448), 211–6. <http://doi.org/10.1038/nature12143>

-
- Zhang, G., y Stackman, R. (2015). The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition. *Front Pharmacol*, 6, 225.
- Zhang, X., Beaulieu, J., Sotnikova, T., Gainetdinov, R., y Caron, M. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*, 305(7), 217. <http://doi.org/10.1126/science.1097540>
- Zhang, Z., Lowry, S., Guarente, L., y Haimovich, B. (2010). Roles of SIRT1 in the acute and restorative phases following induction of inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41391–41401. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.174482>
- Zhong, L., D'Urso, A., Toiber, D., Sebastian, C., Henry, R., Vadysirisack, D., y Mostoslavsky, R. (2010). The Histone Deacetylase Sirt6 Regulates Glucose Homeostasis via Hif1 α . *Cell*, 140(2), 280–293. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.041>
- Zhu, S., Dong, Y., Tu, J., Zhou, Y., Zhou, X., y Xu, B. (2014). Silybum marianum oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose. *Pharmacognosy Magazine*, 10(Suppl 1), S92–9. <http://doi.org/10.4103/0973-1296.127353>
- Zindler, E., y Zipp, F. (2010). Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, 24(4), 551-62. <http://doi.org/10.1016/j.bpa.2010.11.001>
- Zocchi, L., y Sassone-Corsi, P. (2012). SIRT1-mediated deacetylation of MeCP2 contributes to BDNF expression. *Epigenetics*, 7, 695–700.
- Zyzak, D., Otto, T., Eichenbaum, H., y Gallagher, M. (1995). Cognitive decline associated with normal aging in rats: a neuropsychological approach. *Learning & Memory*, 2(1), 1–16. <http://doi.org/10.1101/lm.2.1.1>



Universitat
de les Illes Balears