



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**TESIS**

**“Efectos del sulforafano sobre el estado redox y la inflamación en el sistema nervioso central de ratas Wistar viejas”**

Para obtener el grado de:

**DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

**M. en B.E. Roberto Santín Márquez**

Matrícula: **2163802553**

Directora: **Dra. Mina Königsberg Fainstein**

Asesores: **Dra. Beatriz Gómez González**

**Dra. Hermelinda Salgado Ceballos**

Presidente: **Dra. Norma Edith López Diazguerrero**

Secretaria: **Dra. Hermelinda Salgado Ceballos**

Vocal: **Dr. Armando Luna López**

Vocal: **Dra. Anahí Chavarría Krauser**

Iztapalapa, Ciudad de México, a 23 de enero del 2023

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y en el laboratorio de Neuropsicobiología del Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

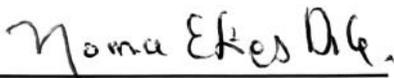
**El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.**

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 727210

## MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "**Efectos del sulforafano sobre el estado redox y la inflamación en el sistema nervioso central de ratas Wistar viejas**", que presentó **Roberto Santín Márquez** el día 23 de enero del año 2022.

**Presidente:** Dra. Norma Edith López Diazguerrero  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa

  
\_\_\_\_\_

**Secretaria:** Dra. Hermelinda Salgado Ceballos  
Unidad de Investigación  
Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI  
Instituto Mexicano del Seguro Social

  
\_\_\_\_\_

**Vocal:** Dr. Armando Luna López  
Unidad de Investigación Médica en  
Enfermedades Neurológicas  
Instituto Nacional de Geriátria

  
\_\_\_\_\_

**Vocal:** Dra. Anahí Chavarría Krauser  
Laboratorio de Neuroinmunología  
Departamento de Medicina Experimental  
Hospital General de México

P.A.  
  
\_\_\_\_\_

**Comité tutorial:**

**Directora de tesis:** Dra. Mina Königsberg Fainstein

Profesor Titular C, Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

mkf@xanum.uam.mx

+(5255) 5804 4600 ext 3662

**Asesora interna:** Dra. Beatriz Gómez González

Profesor Titular C, Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

bgomez@xanum.uam.mx

+(5255) 1770 9774

**Asesora externa:** Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

Investigador Titular B, Unidad de Investigación Médica en enfermedades  
Neurológicas, Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS

melisalce@yahoo.com

+(5255) 1051 2512

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a mi esposa, Itzel, quien me ha acompañado a lo largo de todo este camino desde hace ya diez años. Invariablemente me ha dado su amor, confianza y apoyo en todo momento. Definitivamente sin ella esto no hubiera sido posible, ya que me motiva cada día a luchar por salir adelante y cumplir mis metas y sueños, a salir adelante en los momentos difíciles y a siempre enfrentarlos con una sonrisa, siempre con la esperanza de que pronto los reemplazarán momentos mejores. A lo largo de estos cuatro años me ha acompañado a través de todas las etapas que conlleva hacer un doctorado. Aún en los momentos más oscuros, ella ha sido una luz para mi camino. Gracias Itzel por ser mi compañera de vida y de aventuras con quien quiero compartir mi vida entera. Te amo.

Sin duda alguna quiero agradecer a mi familia, en especial a mi mamá y mi hermano que a pesar de todas las dificultades que hemos tenido que sortear en estos últimos años me han sabido guiar con sus consejos y con su cariño. Gracias mamá porque tú me enseñaste a ser fuerte y solucionar los obstáculos que se me presenten. Me enseñaste a tomar todo lo que hemos pasado a lo largo de nuestra vida como un aprendizaje para mejorar en el futuro. Ustedes han sido mi fortaleza desde que comencé esta aventura y estoy seguro que lo seguirán siendo durante toda mi vida. Son mi pilar y mi motivación para esforzarme cada día más. Los amo y pienso en ustedes a diario.

Quiero agradecer a mis figuras paternas que tuve en distintos momentos de mi vida. A mi padre biológico Roberto quien hasta el final de sus días me guio y apoyó en mis decisiones, además de regalarme unos hermosos recuerdos antes de partir. También quiero agradecer a mi otro papá, mi tío Lázaro, quien en los momentos más difíciles de mi vida me brindó su amor y guía. Me acogió como si fuera su hijo y me consideró así durante toda su vida. Gracias a ambos por ser mis ejemplos a seguir, porque cada uno me enseñó aspectos importantes de la vida y valores que llevo grabados en el corazón para poderlos honrar aún después de su partida. Me quedo con todos los momentos bonitos que pasamos y con sus enseñanzas. Hasta pronto.

No puedo dejar de lado a mi otra familia, la familia Morales-Hernández. Les agradezco mucho a mis suegros quienes me han cobijado como si fuera su hijo y me han brindado su cariño y confianza desde el instante en el que los conocí. Gracias por todo el apoyo y los valiosos consejos que me han brindado. Gracias también a mi cuñado, quien nos ha apoyado incondicionalmente en cada momento difícil por el que hemos pasado.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Mina Königsberg, a quien aprecio mucho por todo el apoyo que me ha brindado todos estos años, no sólo académico, sino que siempre me ha tendido su mano cuando más lo he necesitado. Dra. Mina usted es una gran mentora que deja huella en las vidas de los estudiantes que tenemos la fortuna de pasar por su tutela. Siempre me contagia su energía y entusiasmo en todo lo que hace y me motiva a querer ser un gran investigador como lo es usted. Gracias nuevamente.

También quiero agradecer a la Dra. Beatriz Gómez quien, sin dudarlo, nos ha apoyado con sus consejos e instalaciones para que este proyecto fuera posible. Le agradezco mucho sus consejos y apoyo en los momentos más oscuros doctora. Aprecio mucho su interés y su guía a lo largo de estos años. La admiro mucho.

Quiero agradecer también al Dr. Armando Luna y a la Dra. Adriana Alarcón. Gracias por siempre aportar al proyecto sus comentarios y por ser grandes maestros de lo que no nos enseñan en la carrera o el posgrado. Ustedes me han enseñado a no darme por vencido y a seguir adelante. Ustedes son un gran ejemplo para seguir, son grandes investigadores y grandes personas. Gracias por su guía y cariño.

Quiero agradecer especialmente a mis dos mejores amigos, Verito y Ulises (a.k.a. Nayarit) a quienes considero fundamentales para que mi estancia en el posgrado fuera mucho más agradable. Amigos, les agradezco cada consejo, cada salida, cada risa y cada momento que pasé con ustedes. Los admiro mucho y espero siempre contar con su amistad sin importar el tiempo ni la distancia.

Quiero agradecer también a la Dra. Hermelinda Salgado y a la doctora Anahí Chavarría, por sus valiosos consejos y sugerencias que me han brindado en la realización de este proyecto. Gracias por ayudarme en cada oportunidad que tuvieron.

También agradezco a todos mis compañeros del laboratorio que me apoyaron y animaron a lo largo de este proyecto. Gracias Rafa, Paola, Gibrán y Ula por su apoyo y consejos para que este proyecto fuera posible. Gracias también a mis nuevos

compañero y amigos Pamela, Michelle y Samael, quienes en estos últimos meses han formado una parte importante del equipo de trabajo y me ha apoyado sinceramente.

Gracias a todos los que han formado parte de esta etapa de mi vida y me apoyaron para que a pesar de tantas circunstancias adversas como la pérdida de nuestro primer laboratorio, los paros, la huelga, la pandemia y otras adversidades me motivaron a continuar y no renunciar.

## Resumen

El envejecimiento es un proceso complejo y deletéreo que afecta a todos los órganos y sistemas de los organismos. El sistema nervioso se ve morfológica y funcionalmente afectado durante el envejecimiento normal y algunos de los marcadores de envejecimiento, como el estrés oxidante, la inflamación y la senescencia, se han propuesto como reguladores clave del declive cognitivo y de algunos procesos neurodegenerativos. El sulforafano (SFN) es una hormetina que activa la respuesta antioxidante y antiinflamatoria. Debido a eso, evaluamos si el tratamiento crónico con SFN es capaz de prevenir el daño cognitivo relacionado con la edad en ratas Wistar hembras y machos de distintas edades. Se evaluaron parámetros redox, inflamatorios y de senescencia en individuos adultos (15 meses) y viejos (21 meses) después de ser tratados por 3 meses con SFN. Se emplearon ratas de 4 meses no tratadas, como control joven. La respuesta antioxidante, el estado redox (GSH/GSSG), daño oxidante, el perfil de citocinas y quimiocinas, y los marcadores de senescencia fueron evaluados en la corteza cerebral (Cx) y en el hipocampo (Hc). Nuestros resultados mostraron que SFN restauró el estado redox, disminuyó las moléculas proinflamatorias y previno la senescencia en la Cx e Hc de ratas adultas, retrasando así el deterioro cognitivo de forma dependiente del sexo, pero no tuvo efectos en los animales viejos. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento puede prevenir, mas no revertir el daño neuronal, con lo que proponemos el uso de hormetinas como el SFN para prevenir el daño del sistema nervioso central asociado al envejecimiento en animales maduros.

## **Abstract**

Aging is a complex and detrimental process, which disrupts most organs and systems within the organisms. The nervous system is morphologically and functionally affected during normal aging, and some hallmarks of aging as oxidative stress, inflammation and senescence have been purposed as main regulators in age-associated nervous system damage, leading to cognitive decline and neurodegenerative processes. Sulforaphane (SFN) is an hormetin that activates the antioxidant and anti-inflammatory responses. So, we aimed to evaluate if SFN long-term treatment was able to prevent age-associated cognitive decline in adult and old female and male rats. Several redox, inflammatory and senescence parameters were evaluated in adult (15-month-old), and old (21-month-old) female and male Wistar rats after three months of SFN treatment. Young rats (4-month-old) were used as age controls. The antioxidant response induction, the redox state (GSH/GSSG), oxidative damage, cytokines and chemokines profile, and senescence markers were determined in the brain cortex (Cx) and the hippocampus (Hc). Our results showed that SFN restored redox homeostasis, reduced pro inflammatory molecules, and prevent senescence in the Cx and Hc of adult rats, thus preventing cognitive decline in both sexes; however, the neuroprotective responses were not the same in male and female. These results suggest that SFN mainly prevents rather than reverts neural damage; though, there might also be a range of opportunities to use hormetins like SFN, to prevent age-associated damage in old animals nervous system.

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Envejecimiento .....	1
1.2 Envejecimiento y su relación con el estado redox .....	2
1.3 Envejecimiento y su relación con la inflamación .....	4
1.4 Envejecimiento y senescencia celular .....	5
1.5 Sistema nervioso y envejecimiento .....	7
1.6 Sulforafano como modulador del estado redox, inflamación y senescencia .....	8
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>10</b>
<b>3. Planteamiento del problema</b> .....	<b>11</b>
3.1 Justificación .....	11
3.2 Pregunta de investigación .....	12
3.3 Objetivo general .....	12
3.4 Objetivos particulares .....	13
<b>4 Hipótesis</b> .....	<b>13</b>
<b>5. Material y métodos</b> .....	<b>14</b>
5.1 Animales .....	14
5.2 Administración de sulforafano .....	14
5.3 Grupos experimentales .....	15
5.4 Pruebas de memoria .....	16
5.4.1 Prueba de reconocimiento de objeto novedoso .....	16
5.4.2 Prueba de laberinto de Barnes .....	16
5.5 Extracción de proteínas .....	18
5.6 Western Blot .....	18
5.7 Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa .....	19
5.8 Determinación de la actividad enzimática de la catalasa .....	20

5.9 Determinación de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa .....	20
5.10 Determinación del cociente de glutatión reducido/glutatión oxidado.....	21
5.11 Cuantificación del daño a proteínas por carbonilación .....	21
5.12 Obtención de tejidos para la preparación histológica .....	22
5.12.1 Tinción con hematoxilina-eosina.....	22
5.12.2 Tinción de células senescentes por X-gal .....	23
5.13 Determinación de citocinas y quimiocinas .....	23
5.14 Análisis estadístico .....	24
5.15 Análisis factorial .....	24
5.16 Análisis discriminante .....	25
<b>6. Resultados .....</b>	<b>26</b>
6.1 Pruebas de memoria .....	26
6.1.1 Pruebas de reconocimiento de objeto novedoso .....	26
6.1.2 Laberinto de Barnes .....	30
6.2 Efecto del SFN sobre el estado redox y la respuesta antioxidante en el sistema nervioso central.....	38
6.2.1 Efecto del SFN sobre la respuesta del factor de transcripción Nrf2 .....	38
6.2.1.1 Nrf2 y Keap1 en la corteza cerebral de hembras .....	38
6.2.1.2 Nrf2 y Keap1 en el hipocampo de hembras.....	41
6.2.1.3 Nrf2 y Keap1 en la corteza cerebral de machos.....	43
6.2.1.4 Nrf2 y Keap1 en el hipocampo de machos .....	45
6.2.1.5 Comparación del cociente Nrf2/Keap1 entre machos y hembras .....	48
6.2.2 Respuesta enzimática antioxidante .....	49
6.2.2.1 Actividad y expresión de enzimas antioxidantes en la corteza cerebral de hembras .....	49

6.2.2.2 Actividad y expresión de enzimas antioxidantes en el hipocampo de hembras .....	52
6.2.2.3 Actividad y expresión de enzimas antioxidantes en la corteza cerebral de machos.....	56
6.2.2.4 Actividad y expresión de enzimas antioxidantes en el hipocampo de machos .....	59
6.2.3 El efecto del SFN sobre el estado redox y el daño a proteínas por oxidación ...	61
6.2.3.1 Estado redox en la corteza cerebral .....	61
6.2.3.2 Estado redox en el hipocampo.....	62
6.2.3.3 Daño a proteínas en la corteza cerebral e hipocampo .....	64
6.2.4 Análisis factorial para evaluar la relación entre las variables del estado redox..	65
6.2.5 Análisis discriminante .....	69
6.2.6 Efecto del SFN sobre el perfil inflamatorio en el sistema nervioso central .....	70
6.2.6.1 Perfil inflamatorio en la corteza cerebral de ratas Wistar hembras.....	71
6.2.6.2 Perfil inflamatorio en el hipocampo de ratas Wistar hembras .....	77
6.2.6.3 Perfil inflamatorio en la corteza cerebral de ratas Wistar machos .....	84
6.2.6.4 Perfil inflamatorio en el hipocampo de ratas Wistar machos.....	88
6.2.7 Efecto del SFN sobre la senescencia y la inflamación en el sistema nervioso central.....	96
6.2.7.1 Efecto del SFN sobre los marcadores de senescencia en la corteza cerebral y el hipocampo de hembras .....	96
6.2.7.2 Efecto del SFN sobre los marcadores de senescencia en la corteza cerebral y el hipocampo de machos.....	99
6.2.7.3 Presencia de las células senescentes en la corteza cerebral y el hipocampo de machos y hembras .....	102
6.2.8 Cambios en la citoarquitectura de la corteza cerebral y el hipocampo de machos y hembras .....	108

<b>7. Discusión.....</b>	<b>112</b>
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>124</b>
<b>9. Perspectivas .....</b>	<b>125</b>
<b>10. Referencias .....</b>	<b>125</b>
<b>11. Financiamiento .....</b>	<b>140</b>
<b>12. Publicaciones .....</b>	<b>141</b>

## **Abreviaturas**

CAT: Catalasa

Ctl: Control

Cx: Corteza cerebral

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FA: Análisis factorial

FLD: Primera línea de defensa

Gpx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

Hc: Hipocampo

HO-1: hemo oxigenasa 1

IN: Número de interacciones

IT: Tiempo de interacción

IκB: Inhibidor de -κB

NF-κB: Factor nuclear κB

NQO1: NADPH quinona oxido-reductasa 1

Nrf2: factor relacionado al eritroide 2

PAM: Personas adultas mayores

RS: Estado Redox

SASP: Fenotipo secretor asociado a la senescencia

SFN: Sulforafano

SOD: Superóxido dismutasa

## **1. Introducción**

### **1.1. Envejecimiento**

La población mundial de personas adultas mayores (PAM) ha incrementado en las últimas décadas. En 2015, una de cada ocho personas eran mayores de 60 años, es decir, aproximadamente 901 millones de personas alrededor del mundo eran PAM, y se calcula que para el año 2030 el número de este grupo etario sea mayor que el número de niños de 0 a 9 años, alcanzando un número aproximado de 1,400 millones de personas a nivel mundial (*United Nations*, 2015).

Recientemente el INEGI publicó que de 1990 al 2020 la población de 60 años y más pasó de 5 a 15.1 millones, lo cual representa un aumento del 6% al 12% de la población total. En ese año, por grupos de edad, el 56% de las PAM se encontraba entre 60 a 69 años, el 29% entre 70 a 79 años y el 15% eran PAM de 80 años o más. La distribución resultó ser similar entre hombres y mujeres, destacando que la proporción fue ligeramente más alta en las mujeres de 80 años y más (INEGI, 2021).

El número creciente de PAM alrededor del mundo ha incrementado la incidencia de un conjunto de padecimientos denominados “enfermedades asociadas a la edad”, incluyendo a las patologías cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y un creciente número de enfermedades neurodegenerativas y desórdenes cognitivos (World Health Organization, 2015; Gassen, *et al.*, 2017).

A nivel fisiológico el envejecimiento puede definirse como un proceso multifactorial, universal, progresivo y deletéreo, que ocurre en los seres vivos con el paso del

tiempo y se caracteriza por el declive de las funciones de los organismos, incrementando su vulnerabilidad y, finalmente, llevándolos a la muerte (Strehler, 1962; López-Otín *et al.*, 2013; World Health Organization, 2015).

Hace algunos años se propusieron nueve marcadores celulares del envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2013) que son: inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, alteraciones en el perfil epigenético, alteración de la proteostasis, desregulación en la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, desgaste de células madre y comunicación celular alterada. Entre ellos no se encuentra el estado redox, pero ya se ha reconocido que la regulación redox puede ser un eje que regule a las otras características (Jones, 2015).

## **1.2. Envejecimiento y su relación con el estado redox**

El estado redox está dado por el balance de las especies químicas oxidantes y antioxidantes en la célula; este balance puede definirse como un equilibrio dinámico entre las moléculas oxidantes, como las especies reactivas de oxígeno (ERO) o las especies reactivas de nitrógeno y por las especies antioxidantes, ya sean enzimáticas (ej. GSH, vitaminas C, D y E) o no enzimáticas (ej. superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), (Zoccarato *et al.*, 2022).

Cuando las moléculas prooxidantes incrementan hasta el punto en que las especies antioxidantes existentes no son suficientes para contender con ellas y mantener la homeostasis, la célula entra a un estado llamado estrés oxidante, el cual promueve la oxidación de biomoléculas al alcance de las especies oxidantes (Liguori, *et al.*, 2018).

Denham Harman (1956) propuso que el envejecimiento podría estar dado por la acumulación de biomoléculas oxidadas durante la vida de un organismo, particularmente durante el estrés oxidante, lo que incrementa la probabilidad de desarrollar alguna enfermedad o incluso, morir.

Por muchos años, se ha considerado al estrés oxidante como uno de los marcadores del envejecimiento. Sin embargo, esta teoría no logró explicar totalmente el proceso de envejecimiento, ya que en años posteriores se publicaron artículos en donde al sobreexpresar o deletar enzimas antioxidantes no se observó efecto sobre la longevidad de los animales (Huang, et al., 2000; Pérez, et al., 2009); por lo que se aceptó que debían existir otros factores que también influían en el proceso de envejecimiento y en la longevidad y a partir de ahí, se propusieron los nueve marcadores del envejecimiento arriba mencionados. Si bien la homeostasis redox se pierde durante el envejecimiento, se sabe que también tiene un papel fundamental en el desarrollo de diversas patologías. Dicha homeostasis puede modificarse por una gran cantidad de factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, como la alimentación, el medio ambiente y el estrés (Jones, 2015). Por todo esto se considera al proceso de envejecimiento como un fenómeno multifactorial, que requiere ser abordado desde un enfoque holístico: desde un nivel molecular hasta el nivel integrativo y funcional que refleja la integridad del órgano u organismo en cuestión.

### 1.3. Envejecimiento y su relación con la inflamación

Como se mencionó antes, el aumento en la esperanza de vida también incrementó la aparición de enfermedades asociadas a la edad, muchas de las cuales son desencadenadas por un fenómeno descrito en el año 2000 por Franceschi *et al*, denominado en inglés como “*inflammaging*”. El “*inflammaging*” se ha descrito como un incremento leve y sostenido de los niveles de moléculas proinflamatorias, que se observa durante el envejecimiento y que no llega a la resolución para volver a un estadio basal no inflamado. Por lo que genera un estado constante de estrés en el organismo que promueve el desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas (Ferrucci & Fabbri, 2018). A pesar de que aún no se tiene del todo claro qué evento o eventos son los que desencadenan esta inflamación crónica de bajo grado dependiente de la edad, se ha propuesto que la teoría de Harman podría explicar, al menos en parte, el inicio del *inflammaging* ya que se cree que las causas podrían ser intrínsecas por la acumulación de biomoléculas dañadas, proteínas mal plegadas, detritos celulares, y proteínas oxidadas, o extrínsecas por la infección persistente de virus o bacterias (Franceschi, *et al.*, 2018).

Por otro lado, a nivel sistémico se ha sugerido que otro paso crucial para el establecimiento de la inflamación crónica de bajo grado es la involución del timo dependiente de la edad, lo que disminuye la generación de las células T (tanto CD4+ como CD8+); lo que en consecuencia genera un incremento en la proporción de células T de memoria, con inespecificidad antigénica. Lo anterior incrementa la

biblioteca antigénica sin un blanco en particular y genera una señal inmune inespecífica y sostenida que aumenta con el envejecimiento (Fullop *et al.*, 2021).

Dicho proceso se repite cíclicamente, acrecentando la respuesta en cada ciclo y aumentando la síntesis de moléculas reguladoras de la respuesta inflamatoria. Así, gradualmente, el nivel de inflamación basal va creciendo, hasta llegar al nivel suficiente para mantener la señal inflamatoria constante; dicho proceso puede durar varios años antes de llegar a los niveles necesarios de *inflammaging* (Franceschi, *et al.*, 2018). Sin embargo, el proceso inflamatorio no es un evento aislado y también puede ser regulado por el estrés oxidante y viceversa. Un ejemplo de ello es la señalización cruzada con el inflamosoma; este es un complejo fundamental en la maduración de las prointerleucinas a interleucinas activas que utiliza a la proteína NLRP3, la cual tiene regiones con cisteínas expuestas que son sensibles al estado redox. Este evento genera una retroalimentación positiva para ambos procesos, es decir el estrés oxidante y la inflamación crónica de bajo grado (Zuo, *et al.*, 2019).

Debido a que estos procesos suelen ocurrir simultáneamente, se genera un microambiente estresante en los tejidos durante el envejecimiento, por lo que las células pueden activar vías de emergencia celular, como la senescencia, para evitar la transformación a células malignas o dañadas que puedan proliferar.

#### **1.4. Envejecimiento y senescencia celular**

La senescencia celular fue descrita por primera vez en 1961, y se definió como el estado en que la célula detiene de manera irreversible la proliferación al haber

llegado a su máxima capacidad duplicativa. A ese punto de quiebre se le denominó “límite de Hayflick” (Hayflick & Moorhead, 1961). Actualmente se ha reportado ampliamente que la senescencia puede ser inducida de manera prematura, es decir, antes de que las células alcancen el límite de Hayflick, mediante una gran variedad de estímulos sub letales como la hiperoxia, las concentraciones elevadas de especies oxidantes, la inhibición del proteosoma, o la desregulación del proceso de autofagia (Torres, C., *et al.*, 2006; Toussaint, *et al.*, 2000) entre otros.

Las células senescentes tienen características particulares comparadas con las células no senescentes, que incluyen: 1) la incapacidad de responder ante estímulos mitogénicos; 2) la resistencia a la apoptosis; 3) presentan una morfología aplanada y ameboide; 4) tienen cambios epigenéticos; 5) en sus núcleos se encuentra la formación de focos de heterocromatina asociados a la senescencia (SAHF, por sus siglas en inglés); 6) presentan expresión génica diferencial; y 7) tienen una secreción regulada de diferentes citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, metaloproteasas de matriz y ERO, que en conjunto son conocidos como fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP por sus siglas en inglés) (Maciel-Barón, *et al.*, 2017; Kuilman, *et al.*, 2015; López-Diazguerrero, *et al.*, 2005).

El SASP tiene efectos tanto autocrinos como paracrinos, afectando a la propia célula senescente, así como a las células circundantes y puede inducir diferentes respuestas, tales como: apoptosis de las células vecinas, reforzamiento del estado senescente en el tejido, o proliferación de las células del entorno (Triana-Martínez, *et al.*, 2016). Por lo tanto, el SASP está involucrado directamente en la activación de

diversos procesos fisiológicos como la angiogénesis, la inflamación, la remodelación y la reparación de tejidos (van Deursen, 2014). Recientemente, se ha relacionado a la acumulación de células senescentes con el establecimiento de un estado de inflamación crónica de bajo grado, que además contribuye al *inflammaging*, lo que puede explicarse por la presencia de diversas moléculas proinflamatorias presentes en el SASP (González-Puertos, *et al.*, 2015), especialmente aquellas relacionadas con la activación de vías de señalización de reguladores de la respuesta inflamatoria como la vía del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).

### **1.5. Sistema nervioso y envejecimiento**

Particularmente, el sistema nervioso es uno de los sistemas más afectados durante el envejecimiento, por lo que existen muchas enfermedades asociadas a la edad provocadas por la degeneración de los circuitos neurales, debido a la disfunción de las células gliales (Yanker, *et al.*, 2008). Ello contribuye a la aparición de diversos cambios fisiológicos que promueven alteraciones mentales y motoras durante el envejecimiento natural, como los procesos asociados a la memoria y al ritmo circadiano (Hung *et al.*, 2010).

Lo anterior podría ser causado por la alta sensibilidad del sistema nervioso ante el estrés oxidante; consecuencia tanto de sus características intrínsecas como de su alto consumo de oxígeno, el cual es una fuente importante de ERO; su alto contenido de lípidos que son potencialmente oxidables; así como la autooxidación de las moléculas precursoras de neurotransmisores. Aunado a su pobre capacidad

antioxidante en comparación con la de otros órganos y a su alto contenido de hierro (Friedman, 2011). También se ha reportado que en algunas patologías asociadas al envejecimiento, como es la enfermedad de Alzheimer, se ha observado una acumulación de células senescentes en el cerebro (Bhat, *et al.*, 2012), lo que se ha asociado con afectaciones importantes en el correcto funcionamiento del sistema nervioso central.

### **1.6. Sulforafano como modulador del estado redox, inflamación y senescencia**

Debido a la importancia del SASP en diferentes eventos que ocurren durante la acumulación de las células senescentes en los tejidos, se han investigado algunas moléculas que sean capaces de modificar la secreción de algunos de los componentes del SASP. A estas moléculas se les denomina senomórficos (Alimbetov, *et al.*, 2016). Los senomórficos son capaces de actuar a diferentes niveles de la vía secretoria, sin embargo, las moléculas que tienen además otros efectos biológicos, tales como la modulación del estado redox o la inmunomodulación, están cobrando una clara ventaja sobre otras moléculas que solo tienen efectos senomórficos, debido al efecto antiinflamatorio causando la disminución de la producción de diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias responsables de orquestar el daño asociado a la inflamación en el tejido circundante (Maciel-Barón, *et al.*, 2017). Una de estas moléculas con actividad polifarmacológica es el sulforafano (SFN) (Guerrero-Beltrán, *et al.*, 2012).

El SFN (1-isotiocianato-(4R)-(metilsulfinil) butano) es un compuesto organosulfurado que se encuentra los vegetales crucíferos, principalmente en el brócoli, aunque también en menor concentración en la coliflor, la calabaza o las coles de Bruselas (Lavich, *et al.*, 2015). Su precursor, la glucorafanina, puede ser encontrado en concentraciones relativamente altas en el brócoli (0.8-21.7  $\mu\text{mol/g}$  de peso seco) en comparación con otros crucíferos. Este precursor es hidrolizado por la enzima mirosinasa cuando el vegetal sufre algún daño mecánico, depredación o es atacado por patógenos, generando como resultado a la molécula activa de SFN más una molécula de D-glucosa (Guerrero-Beltrán, *et al.*, 2012).

La administración de SFN se ha relacionado con la activación de varios blancos moleculares, uno de los más estudiados ha sido el factor relacionado al eritroide 2 (Nrf2 por sus siglas en inglés), una proteína reguladora maestra de la respuesta antioxidante y de detoxificación celular, que también puede promover vías de señalización relacionadas con mecanismos de protección celular (Bai, *et al.*, 2013). Además, se ha propuesto que el SFN puede actuar también por mecanismos independientes de Nrf2, como la inhibición de la activación de la vía de NF- $\kappa$ B, una vía de regulación maestra de la respuesta inflamatoria, por medio de la inhibición de la fosforilación del inhibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) o impidiendo directamente la traslocación nuclear del dímero de NF- $\kappa$ B (Jin, *et al.*, 2008; Santín-Marquez, *et al.*, 2019).

Aunado a lo anterior, se ha demostrado que el SFN puede regular otros mecanismos de supervivencia y reparación celular, como la dinámica mitocondrial, mediante el

impedimento de la fisión y favorecimiento de la fusión mitocondrial, por medio de la unión a la proteína reguladora de la fisión Drp1 (Mealey, *et al.*, 2017).

## **2. Antecedentes**

Se ha demostrado que la administración de SFN induce la expresión de algunas enzimas antioxidantes a través de la vía de Nrf2/Keap1 en modelos *in vitro* de neuronas aisladas de ratones utilizadas como modelo de Alzheimer, debido a que fueron genéticamente modificadas para generar agregados amiloides de manera inducible, previniendo la formación de agregados extracelulares (Zhao, *et al.*, 2018).

Nuestro grupo de trabajo también ha demostrado en un modelo *in vitro* de cultivos de astrocitos primarios de rata Wistar, que el tratamiento con SFN disminuyó la expresión de moléculas del SASP con actividad proinflamatoria, como la interleucina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), e incrementó la expresión de moléculas con actividad antiinflamatoria, como la interleucina 10 (IL-10), modificando los perfiles secretorios en células senescentes hacia un perfil preferentemente antiinflamatorio (Maciel-Barón, *et al.*, 2018). Por otro lado, la administración crónica de SFN en ratones disminuye el deterioro cognitivo causado por lesiones hipocampales parecidas a las encontradas en el desarrollo del Alzheimer, y disminuyendo el estrés oxidante en la región de manera dependiente de Nrf2 por medio de la síntesis de enzimas antioxidantes, como la hemo oxigenasa (HO-1) y la NADPH quinona oxido-reductasa 1 (NQO1; Pu, *et al.*, 2018).

También se ha demostrado que en modelos *in vivo* de ratas, la administración de SFN previene la neuroinflamación y regula los niveles de neurotransmisores en modelos de hiperamonemia por medio de la regulación de la secreción de citocinas proinflamatorias en la microglia (Hernández-Rabaza, 2016).

### **3. Planteamiento del problema**

#### **3.1. Justificación**

Debido al aumento en la población de PAM, se ha incrementado la prevalencia de enfermedades asociadas al envejecimiento como las enfermedades neurodegenerativas, las cuales han cobrado importancia debido a que disminuyen la calidad de vida y la independencia de las PAM. Por otra parte, se sabe que la acumulación de células senescentes, así como la desregulación de la homeostasis redox y la inflamación crónica en el sistema nervioso central son factores clave para el desarrollo de diversas demencias y otros procesos neurodegenerativos. Por lo tanto, es importante el estudio de moléculas que sean capaces de regular dichos procesos para reducir el daño asociado a la edad en el sistema nervioso central y así prevenir las patologías asociadas a ello.

El SFN es una molécula reguladora de la respuesta antioxidante a través de la activación de la vía de Nrf2, así como la disminución de la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B. Además, se ha propuesto que el SFN tiene otros efectos independientes de las dos vías canónicas antes mencionadas que promueven la activación de vías de protección y reparación celular, lo que convierte

al SFN un posible candidato para proteger al sistema nervioso contra el daño asociado al envejecimiento. Desafortunadamente, la mayoría de los estudios que utilizan al SFN como tratamiento, se han realizado en modelos *in vitro* y sólo unos pocos se han llevado a cabo en modelos *in vivo*, pero no en organismos viejos. Por si fuera poco, la mayoría de dichos estudios solo se realizan en machos, aunque ya se sabe que las hembras tienen una mayor prevalencia a las demencias asociada a la edad.

Por lo tanto, en este estudio empleamos un modelo *in vivo* de ratas viejas, tanto machos como hembras, para estudiar el efecto de un tratamiento crónico con SFN y conocer sus posibles efectos protectores en el sistema nervioso central en el envejecimiento, así como el dimorfismo sexual que pudiera observarse.

### **3.2. Pregunta de investigación**

¿La administración de sulforafano prevendrá el daño en el sistema nervioso central de las ratas hembras y machos causado por la inflamación y el estrés oxidante asociado al envejecimiento?

### **3.3. Objetivo general**

Determinar si el sulforafano previene el daño celular causado por la inflamación y el estrés oxidante durante el envejecimiento en el sistema nervioso central en un modelo de envejecimiento *in vivo*.

### **3.4. Objetivos particulares**

- 3.4.1. Determinar la integridad de los procesos de memoria y aprendizaje en ratas machos y hembras después del tratamiento con SFN.
- 3.4.2. Determinar el efecto del SFN sobre la homeostasis redox de la corteza cerebral y del hipocampo en ratas machos y hembras.
- 3.4.3. Determinar el efecto del SFN sobre el estado inflamatorio de la corteza cerebral y del hipocampo en ratas machos y hembras.
- 3.4.4. Determinar si durante el envejecimiento *in vivo* existe un incremento en el número de células senescentes en las regiones cerebrales de corteza cerebral e hipocampo.
- 3.4.5. Determinar si el número de células senescentes en la corteza cerebral y el hipocampo disminuyen después del tratamiento con SFN. Analizar las diferencias en el envejecimiento del sistema nervioso central de ratas machos y hembras.
- 3.4.6. Evaluar las posibles diferencias en la respuesta al tratamiento con sulforafano en ratas machos y hembras.

### **4. Hipótesis**

Puesto que el SFN es un inductor de la respuesta antioxidante y un inhibidor de vías proinflamatorias, protegerá a las células del sistema nervioso central del daño adjudicado al estrés oxidante y la inflamación crónica característica de la edad avanzada en un modelo *in vivo*.

## **5. Material y métodos**

### **5.1. Animales:**

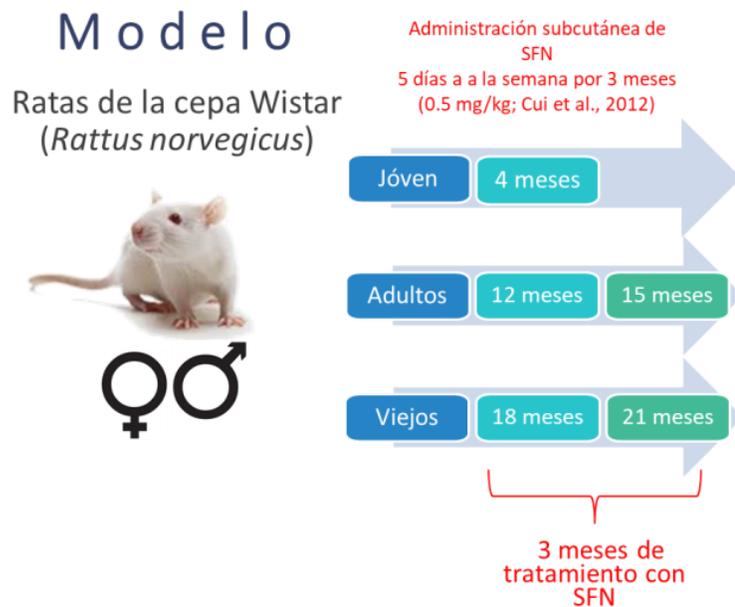
Los experimentos se realizaron empleando ratas albinas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) machos y hembras, de 3 edades distintas. Jóvenes (4 meses), adultas (12-15 meses) y viejas (18-21 meses) que fueron mantenidas en un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad, con alimento estándar (Harlan Laboratories Inc. Indianapolis) y agua *ad libitum*. Para las pruebas se tomaron a individuos machos y hembras de cada grupo de edad y fueron considerados como grupos independientes. Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas de la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999, así como para la correcta disposición de los desechos biológicos NOM-087-ECOL-1995. Este proyecto se encuentra aprobado por la Comisión Académica de Ética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud con el dictamen 1851.

### **5.2. Administración de sulforafano:**

El SFN (LKT Laboratories, No. de Cat. 4478-93-7) fue administrado de acuerdo al esquema propuesto por Miao, *et al.* (2012) de 0.5 mg/Kg de peso del animal, disuelto en 1% de DMSO y administrado por vía subcutánea por 5 días a la semana durante 3 meses a los grupos adultos y viejos de ambos sexos. A los grupos controles se les administró solamente el volumen del vehículo compuesto por solución salina y DMSO proporcional al peso del individuo.

### 5.3. Grupos experimentales:

Los grupos experimentales se muestran en la Fig.1. De cada sexo se tuvieron los siguientes grupos: un grupo de ratas jóvenes de 4 meses de edad como control, un grupo de animales adultos con tratamiento de SFN por 3 meses hasta una edad final de 15 meses, al igual que un grupo de la misma edad al que únicamente se le administró el vehículo, un grupo de animales viejos con tratamiento de SFN por 3 meses hasta una edad final de 21 meses, al igual que un grupo de la misma edad al que se le administró solamente el vehículo. Dando como resultado 10 grupos experimentales.



**Fig.1.** Grupos experimentales. El modelo de envejecimiento *in vivo* se realizó utilizando ratas hembras y machos de la cepa Wistar. Los grupos se distribuyeron como se muestra en el diagrama, dando un total de 10 grupos experimentales.

## **5.4 Pruebas de memoria:**

### **5.4.1 Prueba de reconocimiento de objeto novedoso**

La prueba se llevó a cabo en una caja de observación de acrílico transparente de 45x45x45 cm. Se realizó una sesión de habituación de 5 min en la caja de observación por 3 días, dejando que el individuo explorara de forma libre el interior. El cuarto día se realizó la pre-prueba, que consistió en introducir dos objetos pequeños de características similares, previamente desinfectados, en dos extremos opuestos de la caja de observación. Posteriormente se introdujo al individuo y se le permitió explorar libremente durante 5 min. Se registró el tiempo que se exploró cada uno de los objetos, así como el número de interacciones que tuvo el individuo con cada objeto. Al quinto día se llevó a cabo la prueba, que consistió en introducir a la caja de observación sólo uno de los objetos presentados el día anterior (al que se referirá como objeto conocido), sustituyendo al otro por uno distinto que será desconocido para el individuo (al que se referirá como objeto novedoso). De igual manera se dejó explorar al individuo en la caja de observación durante 5 min. Nuevamente, se contabilizó el tiempo de interacción, así como el número de interacciones con ambos objetos.

### **5.4.2 Prueba de Laberinto de Barnes**

La prueba se realizó en una plataforma circular elevada de 1.2 m de diámetro con 28 agujeros en la periferia y sólo en uno de ellos se colocó un túnel de escape. La plataforma se ubicó dentro de una sala de observación que contaba con pistas

visuales alrededor de la plataforma para facilitar la ubicación espacial del individuo. La prueba fue grabada para su análisis utilizando el software EthoVision® XT (Noldus, Wageningen, Netherlands). El primer día se realizó la habituación, que consistió en dejar explorar al individuo libremente por la plataforma sin la presencia del túnel de escape. Posteriormente, en los días 2-4 se realizaron dos rondas de entrenamiento separadas por ~1h entre cada una de ellas, utilizando iluminación intensa en la sala de observación como estímulo aversivo para inducir la conducta de huida en los individuos. Las rondas de entrenamiento consistieron en colocar al individuo en el centro de la plataforma orientado siempre hacia el mismo punto y permitiéndole explorar libremente la plataforma hasta encontrar el túnel de escape. Una vez que el túnel de escape fue localizado por el individuo, se le permitió descansar dentro durante un minuto. En caso de que el animal no encontrara el túnel de escape, se le guio desde el centro de la plataforma hasta el túnel de escape y posteriormente se le permitió descansar un minuto dentro del túnel de escape. Finalmente, el día de la prueba, se realizaron 10 rondas de 3 ensayos de 1 min cada una por cada individuo experimental cambiando la localización del túnel de escape a 120° de su posición original en la ronda 5 y regresándolo a su posición inicial en la ronda 8. Se registró el tiempo que tardó el individuo en entrar al túnel de escape (latencia), así como el número de agujeros visitados antes de entrar al túnel de escape (errores primarios). El porcentaje de éxito fue calculado a partir del número total de veces que el animal pudo completar la tarea dentro del tiempo de cada ensayo.

## 5.5 Extracción de proteínas

De cada grupo experimental se disectaron la corteza cerebral (Cx) y el hipocampo (Hc) los cuales fueron homogenizados mecánicamente en un tubo que contenía 800  $\mu$ L y 400  $\mu$ L respectivamente, de buffer de lisis (100  $\mu$ L de ditioneitol 1M, 100  $\mu$ L fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 0.1M, 1 tableta de mini Complete™ (Roche, USA), 10 mL T-PER™ (Thermo Scientific). El homogenado fue centrifugado a 13,500 rpm a 4 °C durante 15 min. Los sobrenadantes fueron reservados y almacenados a -80 °C en un ultracongelador. Antes de cada experimento, se determinó la concentración de proteínas por espectrofotometría a 595nm, utilizando reactivo de Bradford (Bio-Rad, USA).

## 5.6 Western blot

Las muestras de proteínas se separaron por SDS-PAGE usando un gel al 12%. Se cargaron 30 $\mu$ g de proteína por pozo. Se corrieron a 75 mV por 15 minutos y posteriormente a 120 mV por una hora y media. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas en membranas de PVDF (Amersham Hybond™-P). Los sitios inespecíficos para la unión de los anticuerpos fueron bloqueados con una solución de leche al 8% y las membranas fueron lavadas con TBS-Tween20™ (Thermo Scientific, USA). Las membranas se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente: Nrf2 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology sc-365949), Keap-1 1:500 (Santa Cruz Biotechnology sc-15246), superóxido dismutasa

1:1000 (Santa Cruz Biotechnology sc-8637), catalasa 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology sc-271803), glutation peroxidasa 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology sc-133160),  $\gamma$ H2AX 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology sc-517348), GLB1 1:1500 (Santa Cruz Biotechnology sc-65670), Lamina B1: 1:500 (Abcam ab8982), p38 1:2000 (Abcam ab-31828) p21 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology sc-6246) y  $\beta$ -actina 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology sc-47778) como control constitutivo,.

Después se realizaron lavados y fueron incubadas por 90 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. Las bandas de proteínas fueron reveladas mediante los reactivos de quimioluminiscencia Inmobilon<sup>TM</sup> Western (Millipore, USA).

### **5.7 Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa**

La actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) se evaluó a través del sistema xantina/xantina oxidasa (XA/XO) descrito en los protocolos de Stirpe & Della Corte (1969) y Paoletti, et al., (1989). El sistema XA/XO genera constantemente radical superóxido, que al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce para formar una sal de formazán, misma que puede ser detectada por medio de espectrofotometría. Se colocaron 25  $\mu$ L de cada muestra, 25  $\mu$ L de xantina oxidasa (0.1 U en sulfato de amonio 2M, Absorbancia<0.015) y 1.45 mL de solución de trabajo, compuesta de 1.5 mg de xantina, 20.4 mg de NBT y 2.9 mg de EDTA. Las lecturas fueron registradas a una longitud de onda de 560 nm en un equipo Thermo Scientific<sup>TM</sup> GENESYS 10S UV-Vis (Madison, WI USA) durante 5 min,

tomando una lectura cada 30 seg. Los resultados se expresaron en unidades de SOD por mg de proteína (USOD/mg de proteína). Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir el 50% de la reacción del radical superóxido con el NBT.

### **5.8 Determinación de la actividad enzimática de la catalasa**

La actividad enzimática de la catalasa (CAT) se evaluó mediante la disminución en la concentración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en la celda de acuerdo al protocolo de Aebi (1984). Se tomaron 10  $\mu$ L de cada muestra, más 1mL de solución de  $H_2O_2$  y de PBS 0.1M. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 240 nm durante 3 min, tomando una lectura cada 10 seg. Una unidad de CAT fue considerada como la cantidad de enzima necesaria para catalizar 1 $\mu$ mol de  $H_2O_2$  por min.

### **5.9 Determinación de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa**

La actividad antioxidante de la enzima glutatión peroxidasa (Gpx) fue analizada por espectrofotometría (Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV-Vis; Madison, WI USA) utilizando el protocolo de Ahmad *et al*, (1989) modificado por Hernández-Arciga, *et al*, (2020). En este protocolo se evalúa la actividad de Gpx a una longitud de onda de 340nm cada 3 seg durante 40 seg. Una unidad de Gpx fue considerada como la cantidad de enzima necesaria para neutralizar 1 $\mu$ mol de  $H_2O_2$  usando NADPH como cofactor.

### **5.10 Determinación del cociente de glutatión reducido/glutatión oxidado**

Las concentraciones de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en la corteza cerebral e hipocampo fueron determinadas de acuerdo al protocolo de Hernández-Álvarez *et al* (2019). Se utilizaron 200 mg de la región de interés en 800  $\mu$ L de búfer de lisis (10% de HCl y 10 mM de ácido batofenantrolindisulfónico). La suspensión se centrifugó a 13,500 rpm y a 4 °C durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se inyectó en un equipo de HPLC usando una bomba binaria 1525 (Waters, MA) conectada a una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent, CA; 250  $\times$  4:6 mm i.d., tamaño de partícula: 5  $\mu$ m). La fase móvil estaba compuesta de acetonitrilo al 1% y búfer de fosfato monobásico 20 mM a pH 7.0, a un flujo de 1mL/min. El GSH y GSSG fueron detectados en la misma corrida a 210 nm empleando un detector UV/visible 2489 (Waters, MA). El área bajo la curva fue cuantificada. La curva estándar fue preparada con 10, 25, 50, 100, 200 y 400  $\mu$ M del estándar de GSH y GSSG.

### **5.11 Cuantificación del daño a proteínas por carbonilación**

Se empleó el método descrito por Mesquita (2014) para cuantificar el daño generado a las proteínas por carbonilación. Las muestras de proteínas fueron centrifugadas a 5000 x g durante 15 min a 4° C. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes en tubos de 1.5 mL. En una placa de 96 pozos se agregaron 20  $\mu$ L de muestra y se adicionaron 20  $\mu$ L de Dinitrofenilhidrazina (DNPH; 10 mM disuelto en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 M), y se dejó incubar la placa en oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo se añadieron 10  $\mu$ L de NaOH 6 M y se incubaron durante 10 min

más en oscuridad. Finalmente se leyó la placa a 450 nm en un lector de microplacas H Reader 1 Elisa Reader (HLAB). La concentración de carbonilos en las muestras fue determinada multiplicando el valor de la absorbancia a 450 nm por el factor de extinción (46.1). Se ajustó el valor obtenido con la concentración de proteínas en cada muestra.

### **5.12 Obtención de tejidos para la preparación histológica**

Los animales de experimentación fueron profundamente sedados con 500 µL de pentobarbital sódico y perfundidos vía intracardiaca por 10 min con un flujo de 15 mL/min con solución salina a temperatura ambiente, seguida de una solución de paraformaldehído al 4% disuelto en PBS 1X a 4 °C por 10 minutos. Se disectó el cerebro y se sumergió en la solución de paraformaldehído al 4% durante toda una noche a 4 °C, posteriormente se lavó la solución de fijado con PBS 1X a 4 °C. Después se sustituyó el PBS 1X por una solución de sacarosa al 30% en agitación a temperatura ambiente y luego se almacenó por 24 horas a 4 °C. Posteriormente se retiró la solución de sacarosa y se embebió el cerebro en n-metilbutano a -80 °C y rápidamente se congeló en hielo seco. Se embebió el cerebro en Tissue Tek (Sakura 4583) y fueron almacenados en un ultracongelador a -80 °C. Se cortaron secciones coronales de 15 µm de espesor en un criostato.

#### **5.12.1 Tinción con hematoxilina-eosina**

Las laminillas en las que se montaron los cortes fueron preparadas previamente incubándolas en una solución de poli-L-lisina al 10% a 37 °C. Una vez montados los cortes, las laminillas se sumergieron en hematoxilina por 5 min y después se lavaron

con agua destilada. Posteriormente fueron sumergidas en una solución de eosina al 0.2% por un minuto. Se colocaron 25  $\mu$ L de medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector, USA) y sellada para su observación en el microscopio óptico de luz a 20X.

### **5.12.2 Tinción de células senescentes por X-gal**

Los tejidos fueron hidratados con PBS 1X durante 10 min en agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente se permeabilizaron con PBS- Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 1% por 10 min en agitación suave. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se incubaron las laminillas con la solución de X-gal (ácido cítrico 0.2M, ferrocianuro 100 mM, ferricianuro 100mM, NaCl 5M, MgCl<sub>2</sub> 1M, y X-gal 50 mg/ml (Thermo-Scientific, USA)) durante toda una noche a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS 1X. Se colocaron 25  $\mu$ L de medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector, USA) y fueron selladas para su observación en el microscopio.

### **5.13 Determinación de citocinas y quimiocinas**

La determinación fue realizada mediante el kit de ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay (Thermofisher, USA) el cual contiene 14 citocinas (G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL10, IL-12p70, IL-13) y 8 quimiocinas (Eotaxina, Gro- $\alpha$ , IP-10, MCP-1, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, RANTES) distintas. Las medidas fueron realizadas de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

#### **5.14 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos univariados y las gráficas fueron hechos en el software Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Los datos se presentaron como la media  $\pm$  su desviación estándar de cada grupo experimental. Se realizó la prueba de normalidad de Omnibus de D'Agostino & Pearson's y la prueba de Levene para la homoscedasticidad. No todos los grupos presentaron distribución normal, además que la n era pequeña, por lo que se realizaron pruebas de H de Kruskal–Wallis, seguidas de una prueba *post hoc* de Dunn. Para todos los casos se tomó una  $p < 0.05$  para considerar las diferencias significativas entre grupos.

#### **5.15 Análisis Factorial**

Debido al gran número de variables en el estudio, se realizó un análisis factorial (FA) para agruparlas y poder compararlas según su ingerencia sobre el modelo. En caso de que el número de datos un fuera el mismo, datos faltantes fueron imputados para poder llevar a cabo la prueba. Se realizó un FA para cada región del cerebro (Cx e Hc), considerando al método factorial como la máxima semejanza y al método de rotación como: Varimax usando la función de factanal del paquete estadístico en R. Aplicamos una prueba de Kaiser-Meyere-Olkin (KMO); las variables que tuvieron un valor individual de MSA (measure of sampling adequacy)  $< 0.50$  fueron excluidas del estudio. Los datos de Cx tuvieron un valor de MSA de 0.61, mientras que los del Hc tuvieron un MSA de 0.64. Posteriormente se aplicó un prueba de esfericidad de Bartlett para Cx ( $X^2 = 137.2$ ,  $p = 2.34e^{-16}$ ,  $df = 28$ ) y para Hc ( $X^2 = 119$ ,  $p = 3.45e^{-13}$ ,  $df = 28$ ). Con lo anterior se realizó un gráfico de sedimentación de los

*eigenvalues* obtenidos para identificar el número de factores para los modelos. Tanto Cx como Hc requirieron de tres factores. Posteriormente, al correr el FA se confirmó que los 3 factores calculados fueron suficientes para explicar el modelo: Cx ( $X^2 = 7.18$ ,  $p = 0.42$ ,  $df = 7$ ) y para Hc ( $X^2 = 7.18$ ,  $p = 0.42$ ,  $df = 7$ ). Con estos se generó un gráfico 3D para Cx y otro para Hc.

### **5.16 Análisis discriminante**

Las nuevas variables generadas con el FA más el cociente de número de interacción entre tiempo de interacción (IN/IT) obtenido de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso fueron utilizados para llevar a cabo el análisis discriminante. Específicamente, se realizó un análisis discriminante regularizado (RDA por sus siglas en inglés), el cual está diseñado para pequeñas bases de datos. La búsqueda en cuadrícula del RDA fue determinada mediante la validación de Cross para determinar los valores gamma y lambda óptimos para el modelo, utilizando el paquete de R llamado KLaR. La función Accuracy se empleó para seleccionar el mejor modelo usando el valor más alto. Los valores finales utilizados para el modelo fueron gamma: 0.00 y lambda: 1.00, ya que esos valores corresponden a un modelo lineal, por lo que considerando que nuestro modelo no cumple con homoscedasticidad (Box'sM = 2445.3,  $F_{252,1517} = 1.4E-0.06$ ), pero sí cumple con normalidad multivariada (Skewness:  $b = 1089.7$ ,  $z = 89.67$ ,  $df = 84$ ,  $p = 0.49$ ; Kurtosis:  $b = 60.58$ ,  $z = -0.76$ ,  $p = 0.45$ ), decidimos llevar a cabo un análisis discriminante cuadrático (QDA) con selección de variable paso a paso usando el software JMP9 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

## 6 Resultados

### 6.1 Pruebas de memoria

#### 6.1.1 Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

En la prueba de reconocimiento de objeto novedoso se utilizó al grupo joven de cada sexo como control para observar la discriminación entre el objeto conocido y el objeto novedoso, evaluando el tiempo y el número de interacciones con cada uno de los objetos.

En el caso de las hembras, se observó que el tiempo de interacción (IT por sus siglas en inglés) (Fig.2A) en el grupo joven fue significativamente mayor en el objeto novedoso en comparación con el objeto familiar ( $p=0.038$ ). El grupo de hembras adultas no tratadas no fue capaz de discernir entre el objeto novedoso y el objeto conocido, ya que en ambos grupos se registraron tiempos de exploración similares. Después del tratamiento con SFN, el grupo de hembras adultas fue capaz de distinguir el objeto conocido del objeto novedoso, explorando significativamente más tiempo el objeto novedoso en comparación al objeto conocido ( $p=0.042$ ). En cuanto a los grupos de hembras viejas no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de exploración del objeto novedoso ni del objeto conocido del grupo control ni del tratado con SFN.

En cuanto al número de interacciones (IN por sus siglas en inglés) de los grupos de hembras (Fig.2C), nuevamente, se encontró que el grupo joven exploró más veces el objeto novedoso en comparación con el objeto conocido ( $p=0.037$ ). En contraste, ningún grupo de hembras adultas ni viejas tuvo diferencias estadísticamente

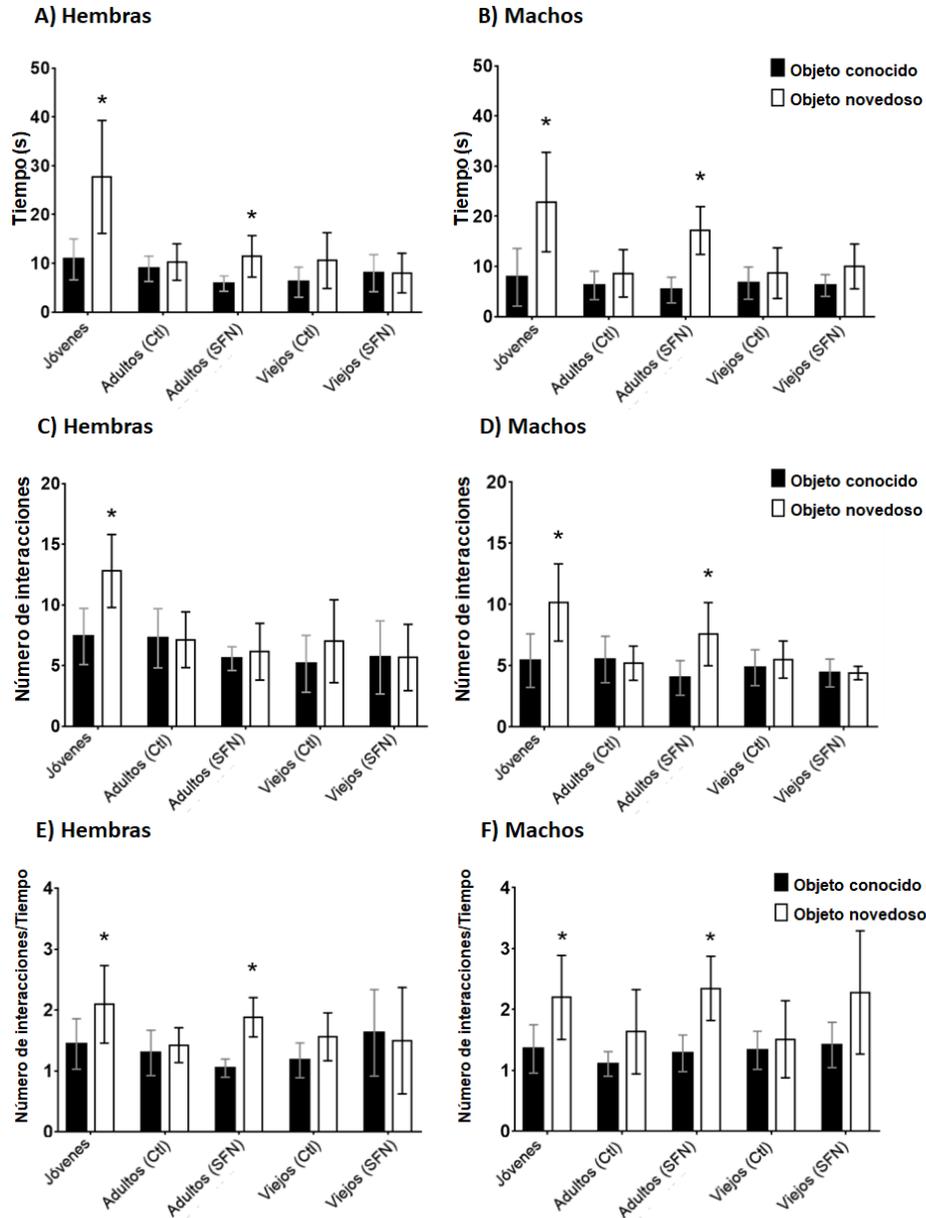
significativas entre el IN con el objeto conocido en comparación con el objeto novedoso.

Para determinar cuánto tiempo exploraban los individuos los objetos por cada interacción se realizó el cociente “tiempo de interacción/número de interacciones” (IT/IN por sus siglas en inglés). En el caso de las hembras el cociente fue significativamente mayor en el grupo joven (Fig.2E), por lo que exploraban más tiempo por cada interacción ( $p=0.047$ ). De manera similar a lo encontrado en la gráfica de IT, no se encontraron diferencias significativas en el grupo de las ratas hembras adultas control, ni en ninguno de los grupos de hembras viejas, sin importar si fueron o no tratados con SFN. Sin embargo, el tratamiento con SFN en el grupo de las adultas incrementó el cociente IT/IN siendo significativamente mayor en comparación del grupo control de la misma edad ( $p=\leq 0.001$ ), lo que significa que exploraron más tiempo el objeto novedoso por cada interacción que tuvieron con él.

Con respecto a los machos, al evaluar el tiempo de exploración (Fig.2B), el grupo joven exploró más tiempo el objeto novedoso en comparación con el objeto conocido ( $p=0.041$ ). Y al igual que lo observado en las hembras, se notó que con la edad los individuos dejan de explorar el objeto novedoso ya que tanto en el grupo de machos adultos no tratados, como en el grupo de machos viejos no tratados se tuvieron tiempos de exploración similares en el objeto novedoso y el objeto conocido, por lo que no fueron capaces de discernir entre uno y otro. El tratamiento con SFN en el grupo de machos adultos fue capaz de prevenir el deterioro cognitivo, ya que el tiempo de exploración del objeto novedoso fue significativamente mayor comparado

con el objeto conocido ( $p=0.005$ ). Nuevamente, el tratamiento con SFN en el grupo de machos viejos no tuvo efecto alguno sobre el tiempo de exploración del objeto novedoso en comparación con el objeto conocido.

En cuanto al número de interacciones de los grupos de machos (Fig.2D), también se determinó un mayor número de interacciones con el objeto novedoso en el grupo joven en comparación con el número de interacciones con el objeto conocido ( $p=0.045$ ). En el caso del grupo de machos adultos no hubo diferencias entre el número de interacciones de los objetos. Interesantemente, el tratamiento crónico con SFN en este grupo también incrementó el IN con el objeto novedoso, siendo significativamente más alto que el número de interacciones con el objeto conocido ( $p=0.039$ ). En cuanto a los grupos de machos viejos, no se observaron diferencias en el IN del objeto novedoso en comparación con el objeto conocido, sin importar si fueron o no tratados con SFN. Al evaluar el cociente IT/IN (Fig.2F) se encontró que tanto el grupo de machos jóvenes, como el grupo de adultos tratados con SFN obtuvieron un cociente significativamente mayor en el objeto novedoso en comparación con el objeto conocido ( $p=0.048$ ;  $p=0.003$ , respectivamente), por lo que ambos grupos interactuaron más tiempo con el objeto novedoso. Los grupos de machos adultos no tratados y ambos grupos viejos no tuvieron diferencias estadísticamente significativas en el cociente del objeto conocido ni del objeto novedoso.



**Fig.2** Prueba de reconocimiento de objeto novedoso en hembras y machos. **A)** Tiempo de exploración del objeto conocido y novedoso de hembras. **B)** Tiempo de exploración del objeto conocido y novedoso de machos. **C)** Número de interacciones con objeto conocido y novedoso de hembras. **D)** Número de interacciones con objeto conocido y novedoso de machos. **E)** Cociente del número de interacciones entre el tiempo de interacción con objeto conocido y novedoso de hembras. **F)** Cociente del número de interacciones entre el tiempo de interacción con objeto conocido y novedoso de machos. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=10; Adultos Ctl: n=7; Adultos SFN: n=6; Viejos Ctl: n=5; Viejos SFN: n=5. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

Los resultados sugieren que el tratamiento con SFN en la adultez previene el deterioro cognitivo asociado a la edad tanto en machos como en hembras. Esto no sucede así en los grupos viejos, ya que no existieron diferencias significativas con sus grupos controles en ninguno de los parámetros evaluados ni en machos ni en hembras.

### **6.1.2 Laberinto de Barnes**

Se utilizó la prueba del laberinto de Barnes para evaluar la memoria y el aprendizaje en los grupos experimentales. Se midió la latencia, es decir, el tiempo que tardaron los individuos en encontrar el túnel de escape y el número de errores primarios que cometieron antes de encontrar el túnel de escape. Finalmente se calculó el porcentaje de éxito de cada grupo, es decir, el porcentaje de veces que los individuos completaron la tarea a lo largo de toda la prueba.

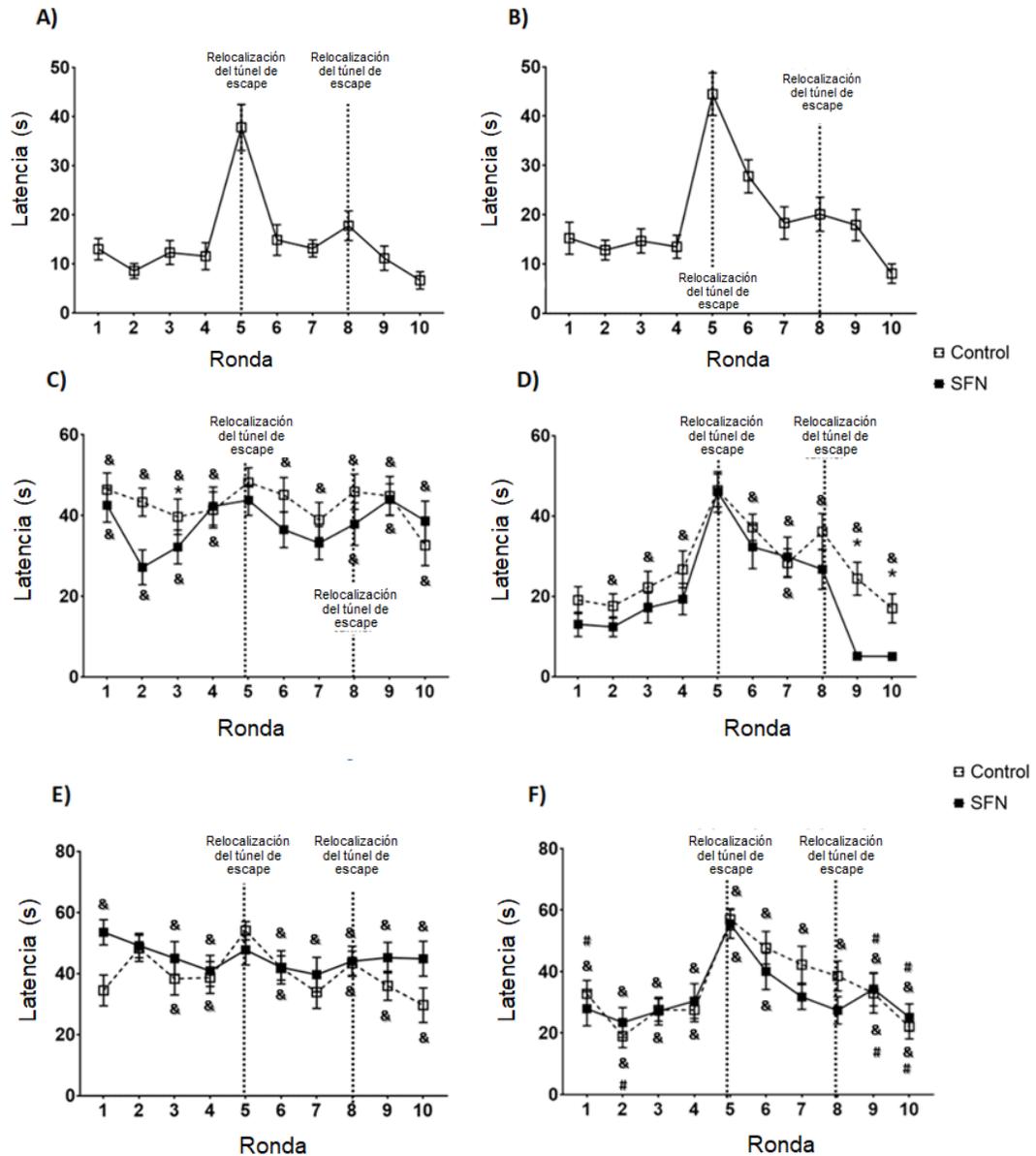
En los grupos jóvenes de machos y hembras (Fig.3A y 3B) se logró observar un comportamiento similar en las latencias de la prueba de laberinto de Barnes, en la que durante las primeras 4 rondas en las que el túnel de escape se mantuvo en el lugar en el que el individuo fue entrenado para encontrarlo, las latencias se mantuvieron estables entre los 10 y 20 seg y no hubieron diferencias significativas entre ellas. En la ronda número 5, cuando el túnel de escape fue relocalizado a 120° de su posición original, la latencia se incrementó significativamente ( $p \leq 0.001$ ) con respecto a las primeras 4 rondas debido a que el individuo debe explorar más agujeros hasta encontrar al túnel de escape en su nueva posición. Una vez que el individuo encontró la nueva posición del túnel de escape, la latencia disminuyó

significativamente ( $p \leq 0.001$ ) en las siguientes dos rondas, llegando a latencias similares a las observadas en las primeras 4 rondas. En la octava ronda el túnel de escape volvió a su posición original, por lo que la latencia incrementó nuevamente, pero no a los niveles encontrados en la ronda 5, debido a que los animales exploraron como primera opción el agujero en donde se encontraba el túnel de escape desde un inicio si los procesos asociados a memoria se encuentran íntegros. En las últimas dos rondas la latencia tiende a disminuir tanto en machos como en hembras.

Cuando evaluamos las latencias en los grupos de hembras adultas (Fig.3C) determinamos un incremento significativamente mayor en las primeras 4 rondas del grupo de hembras adultas no tratadas en comparación con el grupo de hembras jóvenes ( $p \leq 0.001$ ) con un promedio de  $45.3 \pm 6.12$ . No se encontraron diferencias significativas en las latencias de las diferentes rondas a lo largo de la prueba, lo que indica que exploraron tiempos similares en todas las rondas, sin importar la localización del túnel de escape. En cuanto al grupo de hembras adultas tratadas con SFN no se encontraron diferencias significativas con el grupo control. Tampoco se notaron incrementos estadísticamente significativos en las latencias cuando el túnel de escape fue relocalizado. Con respecto a las latencias de los grupos de hembras viejas (Fig.3E), tampoco se encontraron incrementos significativos entre ninguna de las rondas a lo largo de la prueba, lo que sugiere que tuvieron latencias similares, lo que indica que existe un deterioro en los procesos asociados a la memoria y aprendizaje. El tratamiento con SFN no disminuyó significativamente las latencias en

comparación con el grupo de hembras viejas control y en ambos grupos de hembras viejas se mantuvieron en valores estadísticamente similares a los observados en los grupos de ratas adultas y latencias más altas en la mayoría de las rondas al ser comparadas con el grupo de las ratas jóvenes.

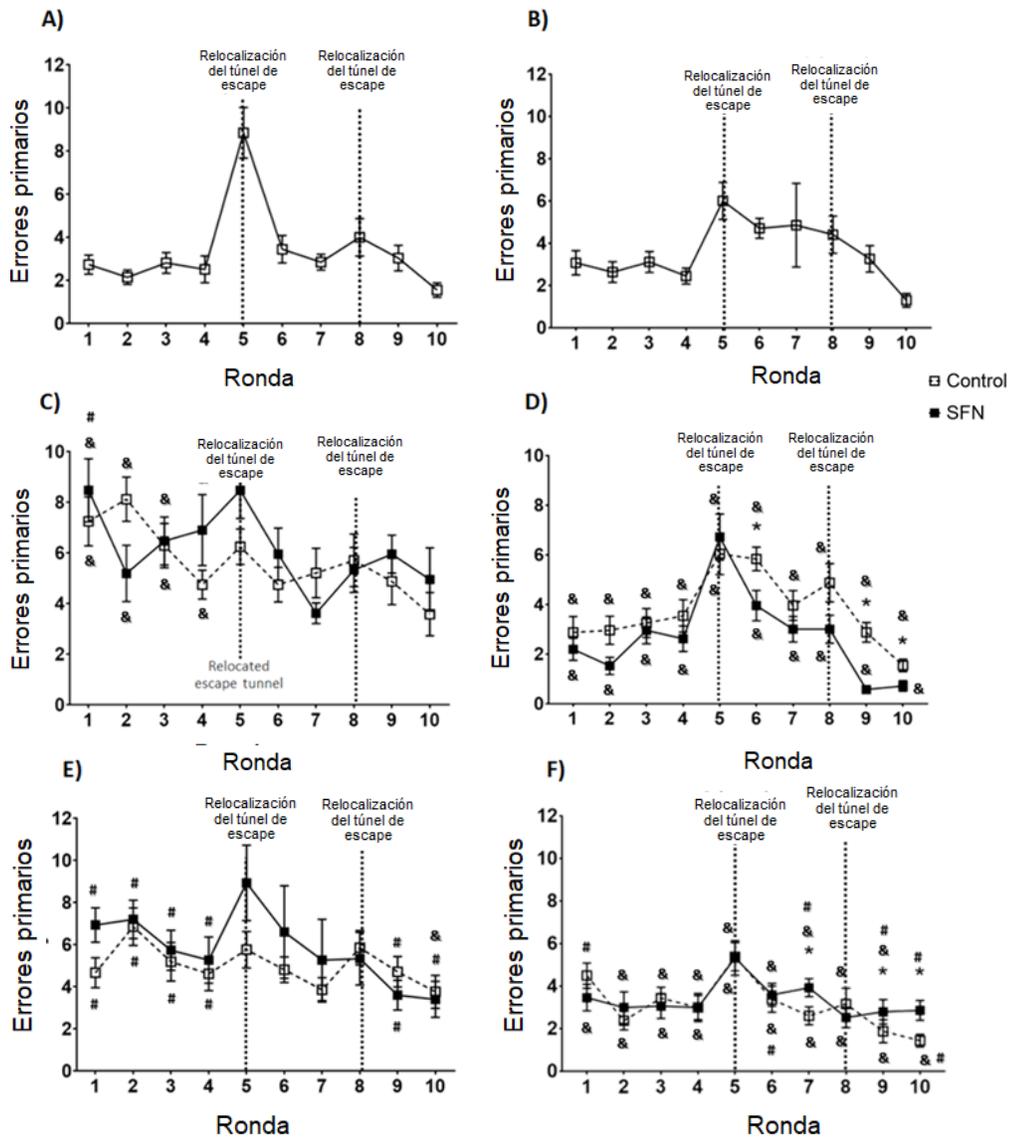
En el caso de las latencias de los grupos de machos adultos (Fig.3D) determinamos que las latencias al relocalizar el túnel de escape en la ronda 5 fueron significativamente más altas tanto para los animales adultos no tratados como para los adultos tratados con SFN. El grupo de machos adultos no tratados presentó latencias significativamente más altas que el grupo joven en las rondas 2 ( $p=0.028$ ), 3 ( $p=0.023$ ) y 4 ( $p=0.016$ ), mientras que el grupo de animales adultos tratados con SFN no presentó diferencias significativas con el grupo joven en ninguna de las primeras 4 rondas. Al relocalizar el túnel de escape en la ronda 5 se observó un incremento de la latencia en ambo grupos, sin embargo, ésta disminuyó de forma gradual en las siguientes dos rondas, aunque sin llegar a los tiempos observados en el grupo de machos jóvenes. En la relocalización del túnel de escape a su posición original en la ronda 8, se observó que el grupo de machos adultos controles se mantuvo en valores similares a los observados en las tres rondas anteriores, y se mantuvieron más altos que los observados en el grupo de animales jóvenes ( $p\leq 0.001$ ,  $p=0.025$  y  $p=0.006$ , respectivamente).



**Fig.3** Latencia en la prueba de laberinto de Barnes de hembras y machos. La latencia hace referencia al tiempo desde que la prueba comenzó hasta encontrar el túnel de escape de los grupos de: **A)** hembras jóvenes, **B)** machos jóvenes, **C)** hembras adultas Ctl y hembras adultas tratadas con SFN, **D)** machos adultos Ctl y machos adultos tratados con SFN, **E)** hembras viejas Ctl y hembras viejas tratadas con SFN y **F)** machos viejos Ctl y machos viejos tratados con SFN. Las líneas punteadas verticales muestran las rondas en las que el túnel de escape fue relocalizado. Cada punto representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=10; Adultos Ctl: n=8; Adultos SFN: n=7; Viejos Ctl: n=6; Viejos SFN: n=6. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad. (&)  $p < 0.05$  contra el grupo joven. (#)  $p < 0.05$  contra el grupo adulto del mismo tratamiento.

El grupo de machos adultos tratados con SFN obtuvo latencias significativamente más bajas que el grupo control de la misma edad en las rondas 9 ( $p \leq 0.001$ ) y 10 ( $p \leq 0.001$ ), llegando a valores similares a los encontrados en el grupo joven. En cuanto a las latencias observadas en los grupos de machos viejos (Fig.3F) no se observaron efectos del tratamiento con SFN en ninguna de las rondas de la prueba. Por otra parte, sí se notó un incremento significativo entre las primeras 4 rondas y la ronda 5, en donde el túnel de escape fue relocalizado. En ambos grupos viejos se notó el incremento significativo de las latencias, lo que indica que los procesos asociados a la memoria y aprendizaje se encuentran deteriorados.

Al cuantificar los errores primarios en los grupos jóvenes de hembras (Fig.3A) y de machos (Fig.3B) se observó que el número de errores correspondía a las latencias registradas, con lo que incrementaba o disminuía de forma directamente proporcional a la latencia. Así mismo, se registró un incremento en el número de errores al relocalizar el túnel de escape en la ronda 5 tanto en hembras como en machos, aunque en machos el incremento en los errores fue menor al observado en hembras ( $p = 0.002$ ). En las rondas 6 y 7 se notó una disminución significativa del número de errores en el grupo de hembras jóvenes ( $p \leq 0.001$ ;  $p \leq 0.001$ , respectivamente), mientras que en los machos no hubo una disminución significativamente diferente en ninguna de esas dos rondas. En la última relocalización del túnel de escape no se encontró un incremento significativo en el número de errores primarios ni en hembras ni en machos jóvenes y en las rondas 9 y 10 continuaron disminuyendo.

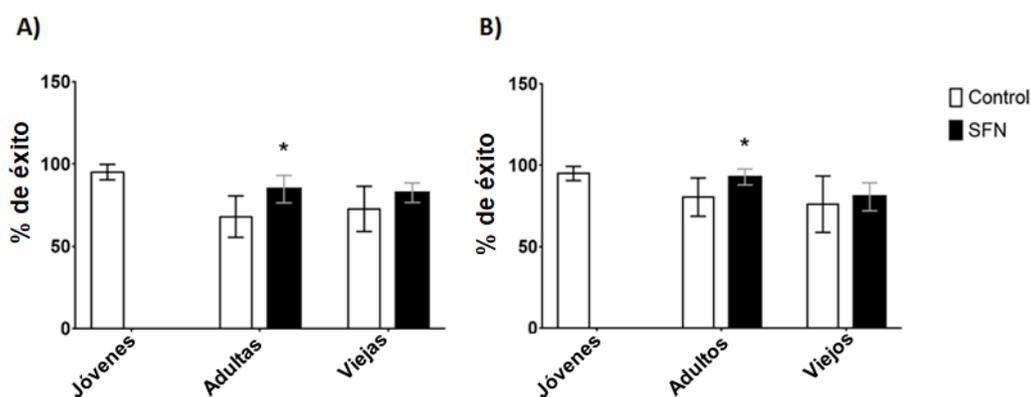


**Fig.4** Errores primarios cometidos en la prueba de laberinto de Barnes de hembras y machos. Los errores primarios se toman como el número de agujeros que el individuo exploró desde que la prueba comenzó hasta encontrar el túnel de escape de los grupos de: **A)** hembras jóvenes, **B)** machos jóvenes, **C)** hembras adultas Ctl y hembras adultas tratadas con SFN, **D)** machos adultos Ctl y machos adultos tratados con SFN, **E)** hembras viejas Ctl y hembras viejas tratadas con SFN y **F)** machos viejos Ctl y machos viejos tratados con SFN. Las líneas punteadas verticales muestran las rondas en las que el túnel de escape fue relocalizado. Cada punto representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=10; Adultos Ctl: n=8; Adultos SFN: n=7; Viejos Ctl: n=6; Viejos SFN: n=6. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad. (&)  $p < 0.05$  contra el grupo joven. (#)  $p < 0.05$  contra el grupo adulto del mismo tratamiento.

En cuanto a los errores primarios cometidos por las hembras adultas (Fig.3C), se observó que estos incrementaron significativamente, tanto el grupo control como el grupo tratado con SFN. De manera similar a lo encontrado en las latencias, el número de errores no incrementó significativamente cuando el túnel de escape fue relocalizado en la ronda 5 en comparación con las rondas 1, 3 y 4. Mientras que fue significativamente más alto que en la ronda 2 ( $p=0.016$ ). En cuanto a las rondas 6 y 7 se observó que el número de errores disminuyó, y en las rondas 8, 9 y 10 se mantuvieron similares sin disminuir y no se encontraron efectos significativos con el tratamiento de SFN. Sin embargo se determinó que en las primeras 4 rondas el número de errores primarios disminuyó significativamente ( $p=0.031$ ) y se mantuvo en números similares de la ronda número 5 a la ronda 10. Al evaluar los errores primarios de los grupos de hembras viejas (Fig.3E) se observó que fueron similares en la mayor parte de las rondas a lo largo de la prueba y sólo se encontró un incremento significativo en la ronda 5 al relocalizar el túnel en comparación a las rondas 3 y 4 ( $p=0.034$ ;  $p=0.030$ , respectivamente) en el grupo de hembras tratadas con SFN. Sin embargo, no se encontraron diferencias con el tratamiento de SFN en el número de errores primarios en comparación a los encontrados en el grupo control de la misma edad. El número de errores primarios también se mantuvo estable a lo largo de las rondas de la prueba en el grupo de ratas viejas no tratadas.

El número de errores primarios de los machos adultos no tratados (Fig.3D) se mantuvo constante en las primeras cuatro rondas, incrementó significativamente en la ronda 5 al relocalizar el túnel de escape ( $p\leq 0.001$ ) y disminuyó en las siguientes

dos rondas. Al llegar a la ronda 8, en la que se relocalizó el túnel de escape a su posición original, los errores comenzaron a disminuir también en las últimas dos rondas. Con el tratamiento de SFN se observó un comportamiento similar a lo ocurrido en las latencias. De igual manera no hubo diferencias significativas en las primeras siete rondas de la prueba cuando se comparó con el grupo control de la misma edad, pero al llegar a la ronda 8 los errores primarios fueron significativamente menores a los del grupo control ( $p=0.016$ ), y lo mismo sucedió en las rondas 9 ( $p\leq 0.001$ ) y 10 ( $p=0.033$ ). En cuanto a los grupos de machos viejos (Fig.3F) el número de errores primarios se mantuvieron similares entre el grupo control y el no tratado, encontrándose diferencias significativas sólo en las rondas 8 ( $p=0.047$ ) y 10 ( $p=0.039$ ), en las que el grupo de animales viejos tratados con SFN, cometió un mayor número de errores en comparación con el grupo control.



**Fig.5** Porcentaje de éxito en prueba de laberinto de Barnes de hembras y machos. El porcentaje de éxito se calculó con el número de veces en las que el individuo logró entrar al túnel de escape antes de que el tiempo de cada ensayo terminara: **A)** Porcentaje de éxito de cada uno de los grupos de hembras. **B)** Porcentaje de éxito de cada uno de los grupos de machos. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=10; Adultos Ctl: n=8; Adultos SFN: n=7; Viejos Ctl: n=6; Viejos SFN: n=6. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

Al calcular el porcentaje de éxito de los grupos evaluados (Fig.5A y 5B), se encontró que los grupos adultos tratados con SFN tuvieron un mayor porcentaje de éxito en comparación con el grupo adulto no tratado (hembras:  $p=0.036$ ; machos:  $p=0.048$ ). No se encontraron diferencias entre los grupos viejos control y los grupos de hembras o de machos viejos tratados.

El tratamiento con SFN mejoró la memoria y el aprendizaje de los grupos adultos tratados, aunque fue más evidente en los machos en comparación con las hembras de la misma edad.

## **6.2 Efecto del SFN sobre el estado redox y la respuesta antioxidante en el sistema nervioso central**

### **6.2.1 Efecto del SFN sobre la respuesta del factor de transcripción Nrf2**

Se sabe que el SFN puede inducir la respuesta antioxidante y de detoxificación celular por medio de la activación de la vía de Nrf2. Debido a esto, evaluamos los niveles de Nrf2 y su represor citosólico Keap1 en la Cx y el Hc de todos los grupos experimentales.

#### **6.2.1.1 Nrf2 y Keap1 en la corteza cerebral de hembras**

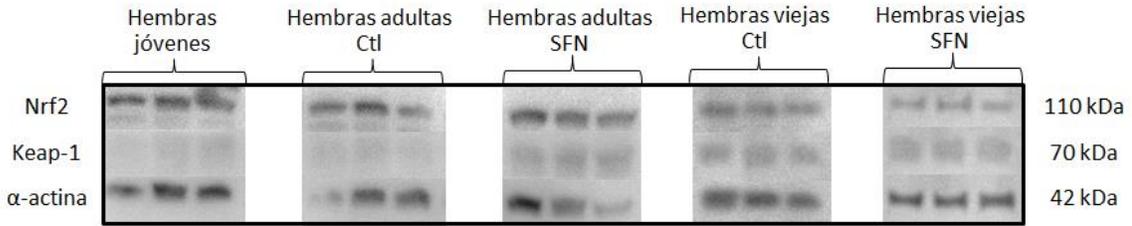
Los niveles de Nrf2 disminuyeron significativamente en la Cx de hembras adultas no tratadas ( $p=0.028$ ; Fig. 6A y 6B), mientras que los niveles de Nrf2 en el grupo de hembras adultas tratadas con SFN fueron significativamente mayores que los observados en el grupo no tratado de la misma edad ( $p=0.032$ ), incluso obteniendo

niveles mayores que en el grupo joven ( $p \leq 0.001$ ). En cambio, en ambos grupos de hembras viejas, tanto el los animales del grupo tratado como los del grupo no tratado, tuvieron niveles significativamente más bajos de Nrf2 que los observados en los grupos antes mencionados. Además, no se identificaron efectos significativos del tratamiento con SFN en los grupos de hembras viejas.

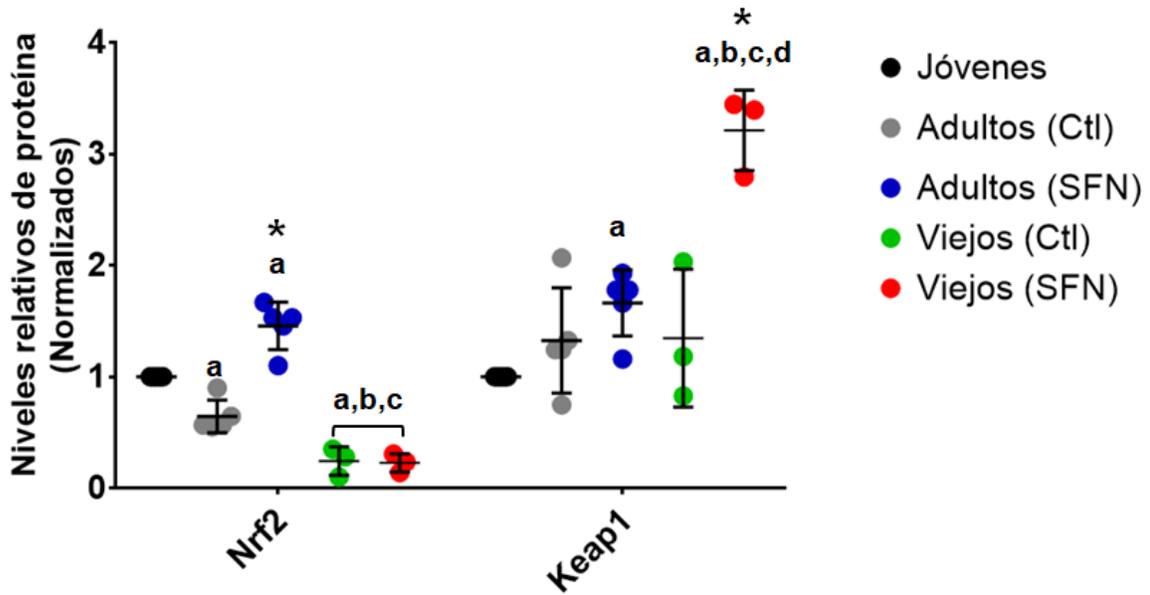
En cuanto a los niveles de Keap1 en la Cx de los grupos de hembras, no se observaron diferencias entre el grupo joven con el grupo adulto no tratado, ni entre los niveles del grupo adulto no tratado con el grupo tratado de la misma edad.

Se encontraron niveles significativamente más altos de Keap1 en las Cx del grupo de hembras adultas tratadas con SFN en comparación con el grupo joven ( $p=0.009$ ). El grupo de ratas hembras viejas obtuvo niveles similares de Nrf2 en comparación con los grupos adultos y el grupo joven. En cambio, las Cx del grupo de hembras viejas tratadas con SFN tuvieron niveles de Nrf2 significativamente más altos que todos los grupos restantes (Jóvenes:  $p \leq 0.001$ ; Adultas Ctl:  $p = 0.014$ ; Adultas SFN:  $p = 0.028$ ; viejos Ctl:  $p = 0.012$ ).

**A) Hembras Cx**



**B)**



**Fig.6** Niveles relativos de Nrf2 y Keap1 en Cx de hembras. **A)** Western blots representativos de Nrf2 y Keap1 en hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **B)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas normalizadas contra el grupo joven. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p < 0.0$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

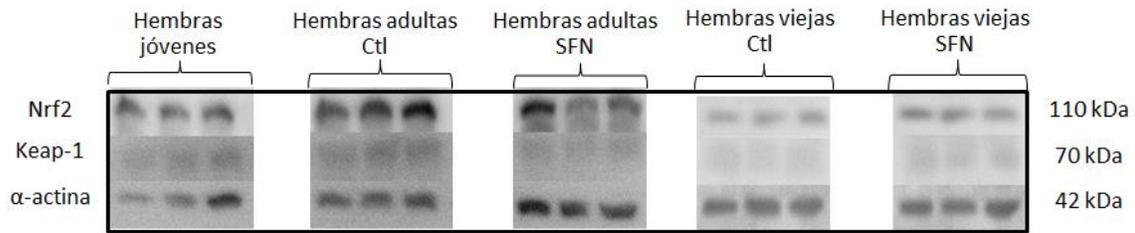
### 6.2.1.2 Nrf2 y Keap1 en el hipocampo de hembras

Cuando se evaluaron los niveles de Nrf2 en el Hc de las hembras, se encontraron niveles más altos en los grupos tratados con SFN en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p=0.035$ ). El Hc del grupo de hembras adultas tratado con SFN incluso tuvo niveles más altos de Nrf2 en comparación con el grupo joven ( $p \leq 0.001$ ). De manera similar a lo observado en la Cx, los Hc de los grupos de hembras viejas obtuvieron valores similares. No se observó ningún efecto adverso con el tratamiento de SFN (Fig.7A y 7B).

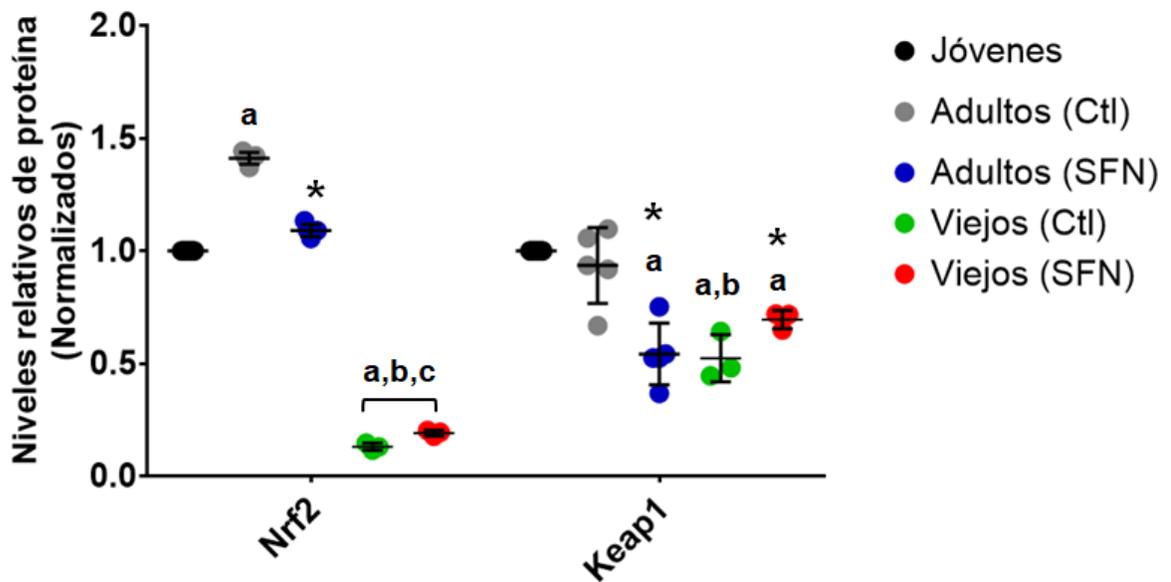
De manera similar, el tratamiento con SFN redujo significativamente los niveles de Keap1 en el Hc de las hembras adultas comparadas con el grupo joven ( $p=0.004$ ) y con el grupo no tratado de la misma edad ( $p=0.016$ ). Los niveles de Nrf2 también disminuyeron significativamente en el Hc de ambos grupos de hembras viejas, tanto en las tratadas con SFN (Jóvenes:  $p=0.020$ ; Adultas Ctl:  $p \leq 0.001$ ; Adultas SFN:  $p=0.003$ ), como en las del grupo no tratado (Jóvenes:  $p=0.018$ ; Adultas Ctl:  $p=0.001$ ; Adultas SFN:  $p=0.048$ ). No se encontraron diferencias significativas en los niveles relativos de Keap1 en los Hc de los grupos de hembras viejas tratados y no tratados.

El cociente de Nrf2/Keap1 (Fig.8) se calculó como un indicador de la activación de la vía de Nrf2. Se encontraron niveles más altos del cociente Nrf2/Keap1 en ambas regiones cerebrales estudiadas en los grupos de ratas hembras adultas tratadas con SFN en comparación con los grupos controles de la misma edad (Cx:  $p = 0.018$ ; Hc:  $p = 0.001$ ). Lo que sugiere una síntesis *de novo* más alta o una tasa de degradación menor.

**A) Hembras Hc**

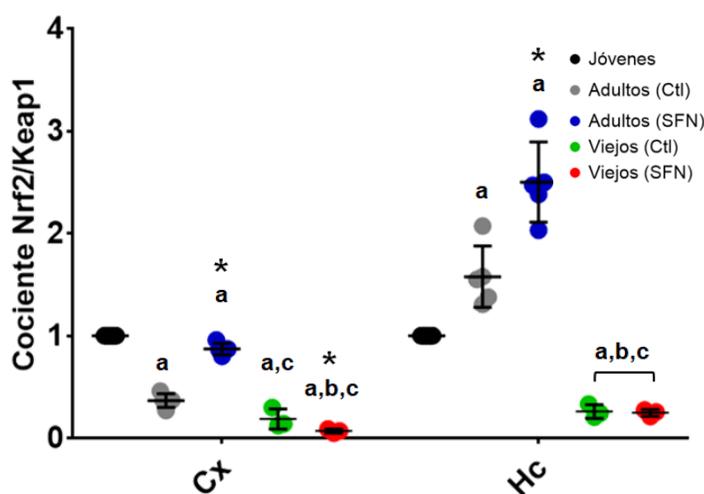


**B)**



**Fig.7** Niveles relativos de Nrf2 y Keap1 en Hc de hembras. **A)** Western blots representativos de Nrf2 y Keap1 en hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **B)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas normalizadas contra el grupo joven. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (**a**)  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven (**b**)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (**c**)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (**d**)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (**e**)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

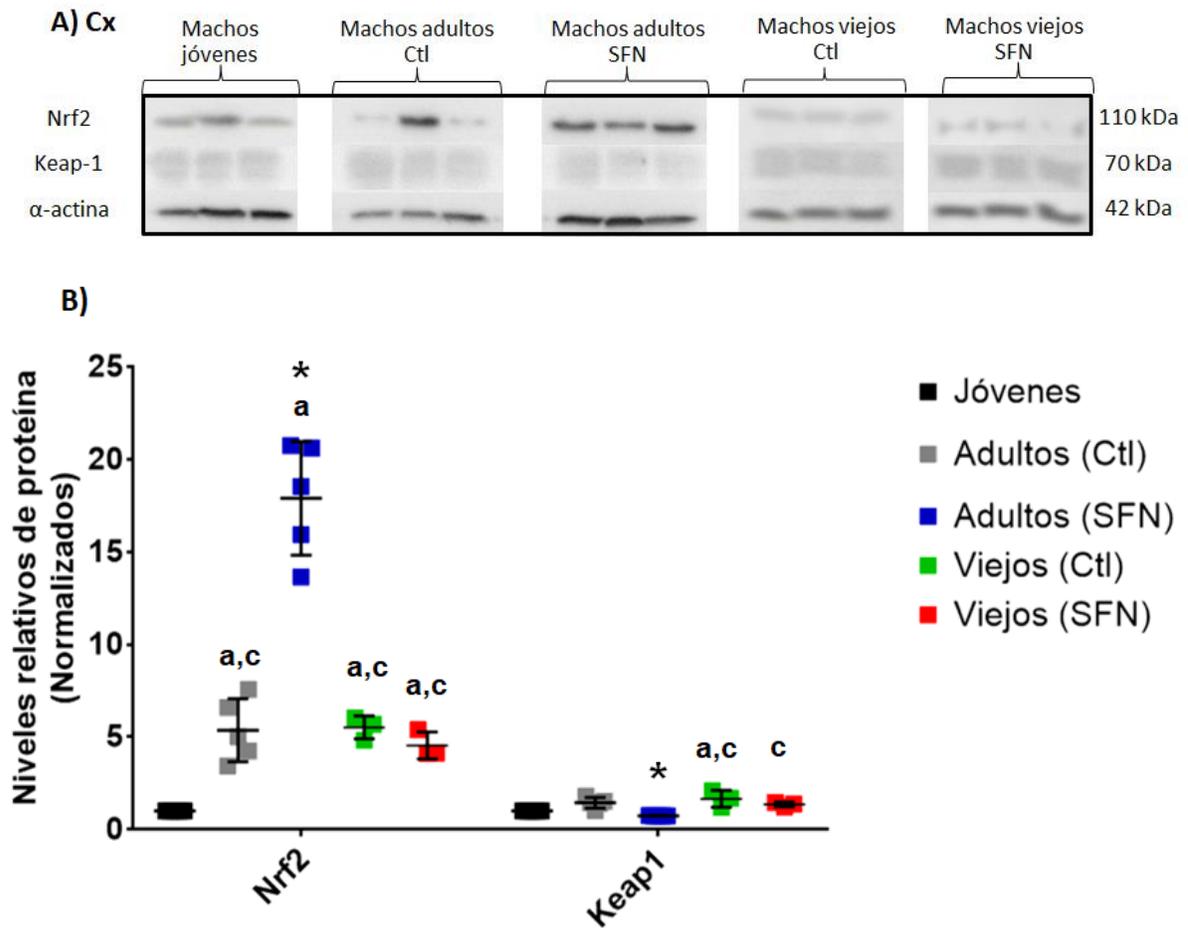
En el caso de los grupos de hembras viejas observamos cocientes menores a los encontrados en los grupos jóvenes (Cx: Viejas Ctl:  $p = 0.002$ , Viejas SFN:  $p \leq 0.001$ ; Hc: Viejas Ctl:  $p = 0.020$ , Viejas SFN:  $p \leq 0.018$ ), adultas no tratadas (Cx: Viejas SFN:  $p = 0.035$ ; Hc: Viejas Ctl:  $p \leq 0.001$ , Viejas SFN:  $p \leq 0.001$ ), y que las ratas en adultas tratadas con SFN (Cx: Viejas Ctl:  $p = 0.022$ , Viejas SFN:  $p \leq 0.001$ ; Hc: Viejas Ctl:  $p = 0.003$ , Viejas SFN:  $p = 0.004$ ). En resumen, el tratamiento con SFN incrementó los niveles relativos de Nrf2 y disminuyó los valores relativos de Keap1 lo que, en consecuencia, incrementó el cociente de Nrf2/Keap1 en hembras adultas y que podría sugerir que el SFN induce la activación de la vía de Nrf2.



**Fig.8** Cociente Nrf2/Keap1 en Cx e Hc de hembras. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes:  $n=5$ ; Adultos Ctl:  $n=5$ ; Adultos SFN:  $n=5$ ; Viejos Ctl:  $n=3$ ; Viejos SFN:  $n=3$ . Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p<0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p<0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p<0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p<0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p<0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p<0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

### 6.2.1.3 Nrf2 y Keap1 en la corteza cerebral de machos

Con respecto a los machos, en la Cx se observó que los niveles de Nrf2 incrementaron con la edad (Fig. 5A; 5B ).



**Fig.9** Niveles relativos de Nrf2 y Keap1 en Cx de machos. **A)** Western blots representativos de Nrf2 y Keap1 en machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **B)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas normalizadas contra el grupo joven. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

Los niveles obtenidos en el grupo de ratas machos adultos no tratados ( $p=0.018$ ), el grupo de machos viejos no tratadas ( $p=0.011$ ), así como el grupo de machos viejos tratados con SFN ( $p \leq 0.001$ ) fueron, en promedio, 5 veces más altos que los

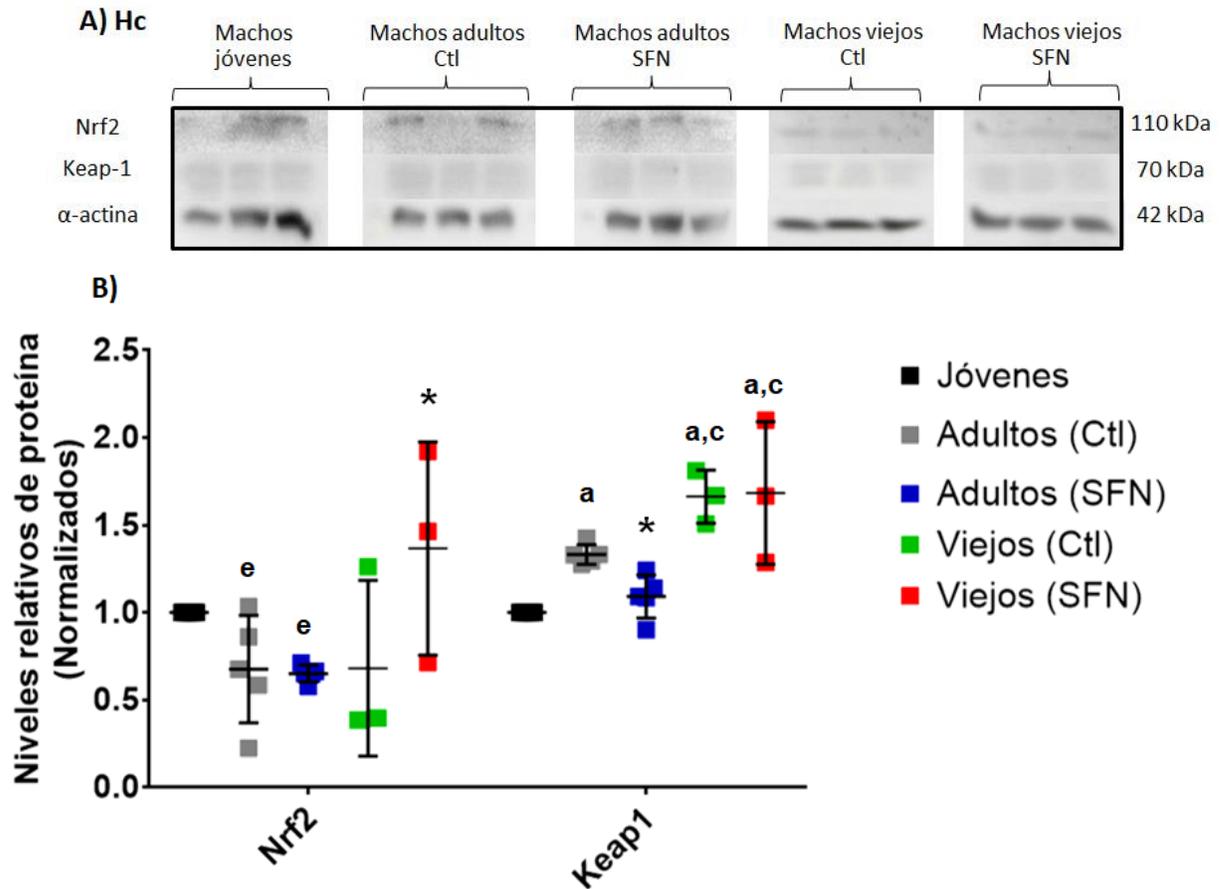
observados en el grupo de ratas jóvenes. En la Cx del grupo de machos adultos tratados con SFN obtuvo niveles de Nrf2 significativamente más altos que todos los grupos restantes (Jóvenes:  $p \leq 0.001$ ; Adultos Ctl:  $p \leq 0.001$ ; Viejos Ctl:  $p \leq 0.001$ ; Viejos SFN:  $p = 0.005$ ).

Los niveles de Keap1 correspondientes a la Cx (Figs. 9A y 9B) fueron menores en los adultos tratados con SFN cuando se compararon con el grupo no tratado de la misma edad ( $p = 0.003$ ). Así mismo se observaron niveles más altos de Keap1 en la Cx de ambos grupos viejos, tanto en los tratados con SFN como en los viejos no tratados en comparación con los grupos de ratas jóvenes (Viejos Ctl:  $p = 0.016$ ; Viejos SFN:  $p \leq 0.001$ ) y adultos tratados con SFN (Viejos SFN:  $p = 0.002$ ). No se encontraron diferencias en los niveles de Keap1 en la Cx entre los grupos viejos tratados y controles de la misma edad.

#### **6.2.1.4 Nrf2 y Keap1 en el hipocampo de machos**

En el caso del Hc de los machos, (Figs. 10A y 10B), no se observaron diferencias significativas entre los niveles de Nrf2 entre los machos jóvenes y los adultos no tratados. Por otra parte, en el Hc de los macho viejos tratados con SFN se obtuvieron niveles más altos de Nrf2 comparados con los del grupo no tratado de la misma edad ( $p = 0.004$ ). De igual manera a lo observado en la corteza cerebral, el tratamiento con SFN redujo los niveles de Keap1 en el Hc en comparación con el grupo no tratado de la misma edad ( $p = 0.037$ ).

El cociente Nrf2/Keap1 (Fig. 11) fue más alto en la Cx de los machos jóvenes al compararse con los demás grupos (Adultos Ctl:  $p=0.018$ ; Adultos SFN:  $p\leq 0.001$ ; Viejos Ctl:  $p=0.011$ ; Viejos SFN:  $p=0.012$ ).



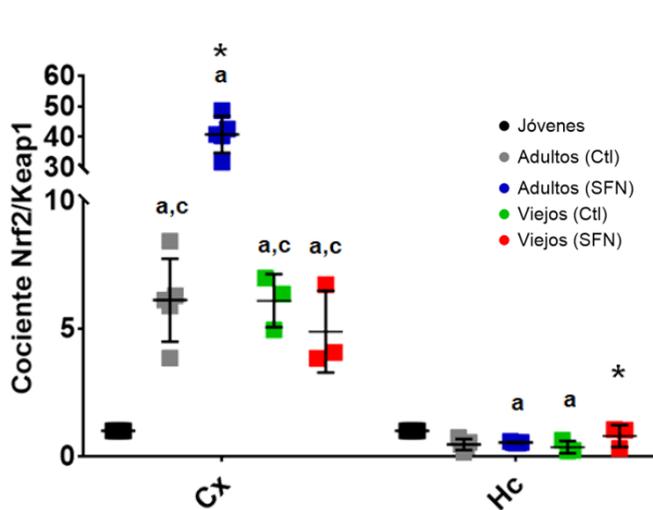
**Fig.10** Niveles relativos de Nrf2 y Keap1 en Hc de machos. **A)** Western blots representativos de Nrf2 y Keap1 en machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **B)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas normalizadas contra el grupo joven. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes:  $n=5$ ; Adultos Ctl:  $n=5$ ; Adultos SFN:  $n=5$ ; Viejos Ctl:  $n=3$ ; Viejos SFN:  $n=3$ . Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p<0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p<0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p<0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p<0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p<0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p<0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

Más aún, el cociente de Nrf2/Keap1 fue significativamente menor en el grupo adulto no tratado comparado con el grupo joven y encontramos que en la Cx del grupo adulto tratado con SFN obtuvo cocientes de Nrf2/Keap1 similares a los encontrados en el grupo joven, por lo que, de igual manera fue mayor que el cociente encontrado en la Cx del grupo adulto no tratado ( $p \leq 0.001$ ).

En ambos grupos viejos, sin importar si fueron tratados con SFN o con el vehículo, se observaron cocientes de Nrf2/Keap1 más bajos que aquellos encontrados en los grupos adultos tratados con SFN (Viejos Ctl:  $p \leq 0.001$ ; Viejos SFN:  $p = 0.005$ ).

Por otra parte, los cocientes de Nrf2/Keap1 en el Hc de los machos fueron homogéneos en la mayor parte de los grupos evaluados y sólo se obtuvieron valores significativamente menores en Hc del grupo adulto tratado con SFN ( $p = 0.043$ ) y del grupo viejo control ( $p = 0.001$ ) cuando se comparó con el grupo joven. Cabe destacar que el grupo viejo tratado con SFN obtuvo cocientes más altos que los observados en el grupo control de la misma edad ( $p = 0.022$ ).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con SFN induce la activación de la vía de Nrf2, probablemente aumentando directamente los niveles de Nrf2, o mediante la disminución de su represor citosólico, Keap1 en los grupos adultos de hembras y machos.



**Fig.11** Cociente Nrf2/Keap1 en Cx e Hc de machos. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p < 0.05$ ; ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

### 6.2.1.5 Comparación del cociente Nrf2/Keap1 entre machos y hembras

Al comparar el cociente de Nrf2/Keap1 entre sexos se observó que, en general, las hembras obtuvieron valores significativamente más altos en comparación a los machos, tanto en Cx (jóvenes:  $p \leq 0.001$ ; adultos Ctl:  $p = 0.004$ ; adultos SFN:  $p \leq 0.001$ ; viejos Ctl:  $p = 0.057$  y viejos SFN:  $p = 0.036$ ) como en Hc (jóvenes:  $p \leq 0.001$ ; adultos Ctl:  $p = 0.003$ ; adultos SFN:  $p = 0.001$ ; viejos Ctl:  $p = 0.003$  y viejos SFN:  $p = 0.001$ ).

En cuanto a los grupos de animales adultos pudimos observar un efecto dependiente de la región evaluada y del sexo. En la Cx los valores de Nrf2/Keap1 se comportaron de manera opuesta en ambos sexos, ya que en las hembras disminuyó con la edad, mientras que en machos el cociente fue mayor. Aunque a pesar de ello fue menor que el cociente encontrado en hembras. Por el contrario, en el Hc incrementaron los valores obtenidos de Nrf2/Keap1 hasta 50 veces más de los valores observados en

machos (Nrf2/Keap1 hembras:  $10.25 \pm 2.73$ ; Nrf2/Keap1 machos  $0.19 \pm 0.12$ ). En el Hc de los machos no hubo ninguna diferencia con respecto al grupo de animales jóvenes.

A pesar de que en ambos sexos se observó que el tratamiento con SFN en los grupos adultos indujo el aumento de los valores de Nrf2/Keap1, se notó que las hembras adultas tratadas con SFN presentaron una respuesta más intensa ( $10.17 \pm 0.92$ ) en comparación con los machos de la misma edad y tratamiento ( $3.01 \pm 0.63$ ).

Este efecto fue incluso más notorio en el Hc, en donde las hembras adultas tratadas con SFN obtuvieron una respuesta 70 veces mayor que la observada en los machos adultos tratados con SFN (Nrf2/Keap1 hembras:  $16.22 \pm 3.58$ ; Nrf2/Keap1 machos  $0.22 \pm 0.01$ ).

En los grupos de hembras viejas se identificaron los cocientes de Nrf2/Keap1 más bajos de todos los grupos evaluados tanto en Cx como en Hc. A pesar de ello también fueron más altos que los obtenidos en los grupos de machos viejos, incluso cuando estos fueron mayores que los registrados en el grupo de ratas jóvenes.

## **6.2.2 Respuesta enzimática antioxidante**

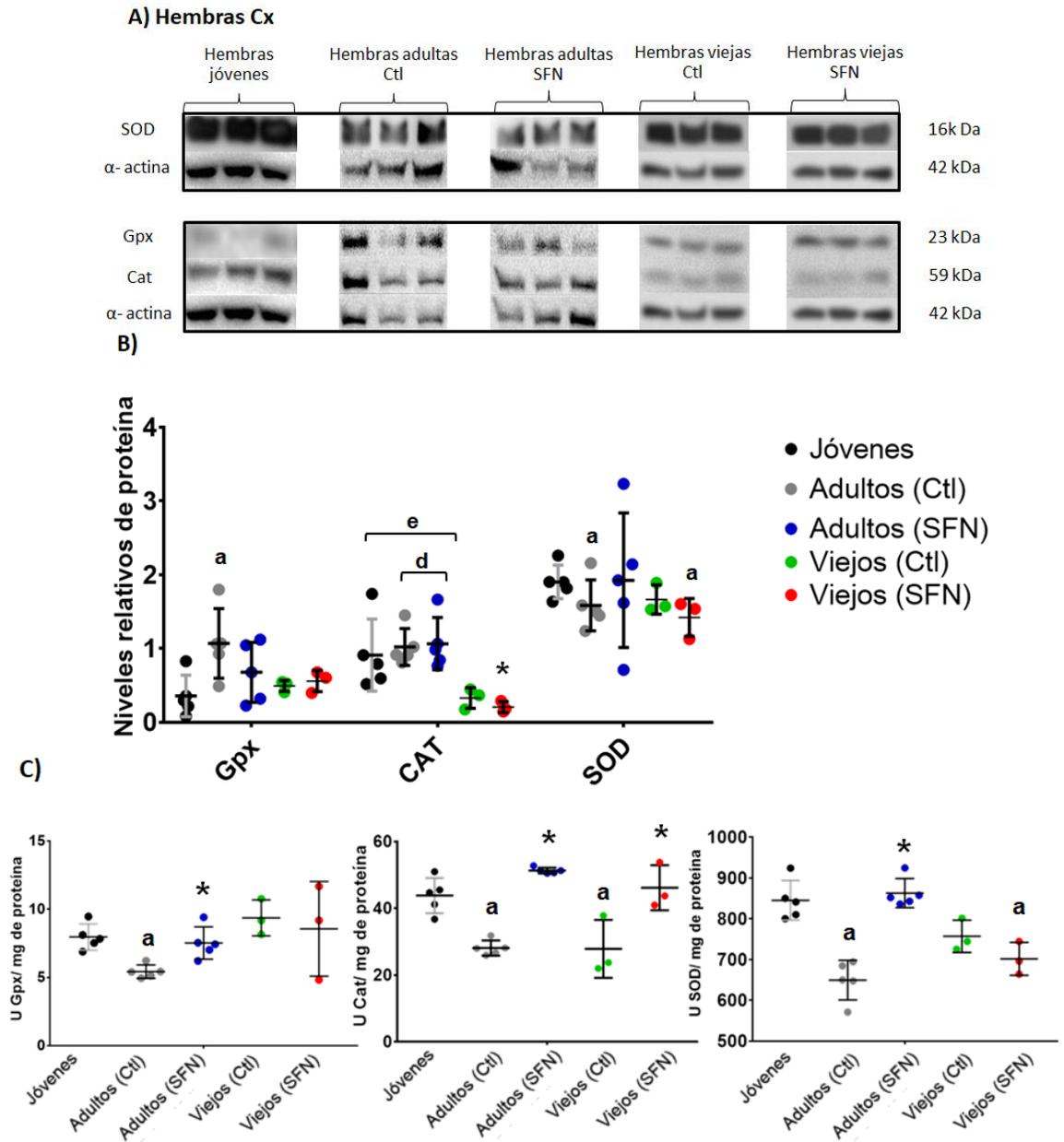
### **6.2.2.1 Actividad y expresión de enzimas antioxidantes en la corteza cerebral de hembras**

Al determinar los niveles de las tres enzimas antioxidantes (SOD, CAT y Gpx; Figs.12A y 12B), así como su actividad en las hembras (Fig. 12C) se observó que los

niveles de Gpx fueron mayores en el grupo de hembras adultas a las que se les administró únicamente el vehículo en comparación con el grupo joven ( $p=0.005$ ), pero no se encontraron diferencias con el grupo de la misma edad tratadas con SFN, ni con ninguno de los grupos de ratas viejas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de CAT en la Cx entre el grupo de ratas jóvenes y ambos grupos de ratas adultas.

Sin embargo, se observaron niveles significativamente más bajos en la Cx de ambos grupos de ratas viejas en comparación con el grupo joven y los grupos adultos (Viejas Ctl: vs Adultas Ctl  $p=0.011$ ; vs Adultas SFN  $p=0.011$ . Viejas SFN: vs Jóvenes  $p=0.008$ ; vs Adultas Ctl  $p=0.001$ ; vs Adultas SFN  $p=0.001$ . Fig.12A; 12B). También se determinaron niveles más bajos de CAT en la Cx del grupo de ratas viejas tratadas con SFN en comparación con el grupo no tratado de la misma edad ( $p=0.046$ ).

En el caso de SOD (Fig.12A y 12B) se observaron niveles significativamente más bajos en la Cx de ambos grupos de ratas adultas, tanto en las tratadas ( $p=0.043$ ) como en aquellas a las que sólo se les administró el vehículo ( $p=0.012$ ).



**Fig.12** Evaluación de las enzimas antioxidantes en la Cx de hembras. **A)** Western blots representativos de Gpx, CAT y SOD en hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **B)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas normalizadas contra actina. **C)** Evaluación de la actividad antioxidante de las tres enzimas estudiadas. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

A pesar de que se encontraron niveles similares de las tres enzimas en la mayoría de los grupos evaluados (Fig. 7C), sí se encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante de las enzimas en la Cx de las hembras tratadas con SFN en comparación con las hembras del grupo control de la misma edad (Gpx  $p=0.041$ ; CAT  $p\leq 0.001$ ; SOD  $p\leq 0.001$ ). Cabe mencionar que el tratamiento con SFN no tuvo ningún efecto observable en la actividad antioxidante de Gpx o de SOD en los grupos de ratas viejas, pero sí en la actividad de CAT ( $p=0.008$ ).

#### **6.2.2.2 Actividad y expresión de enzimas antioxidantes en el hipocampo de hembras**

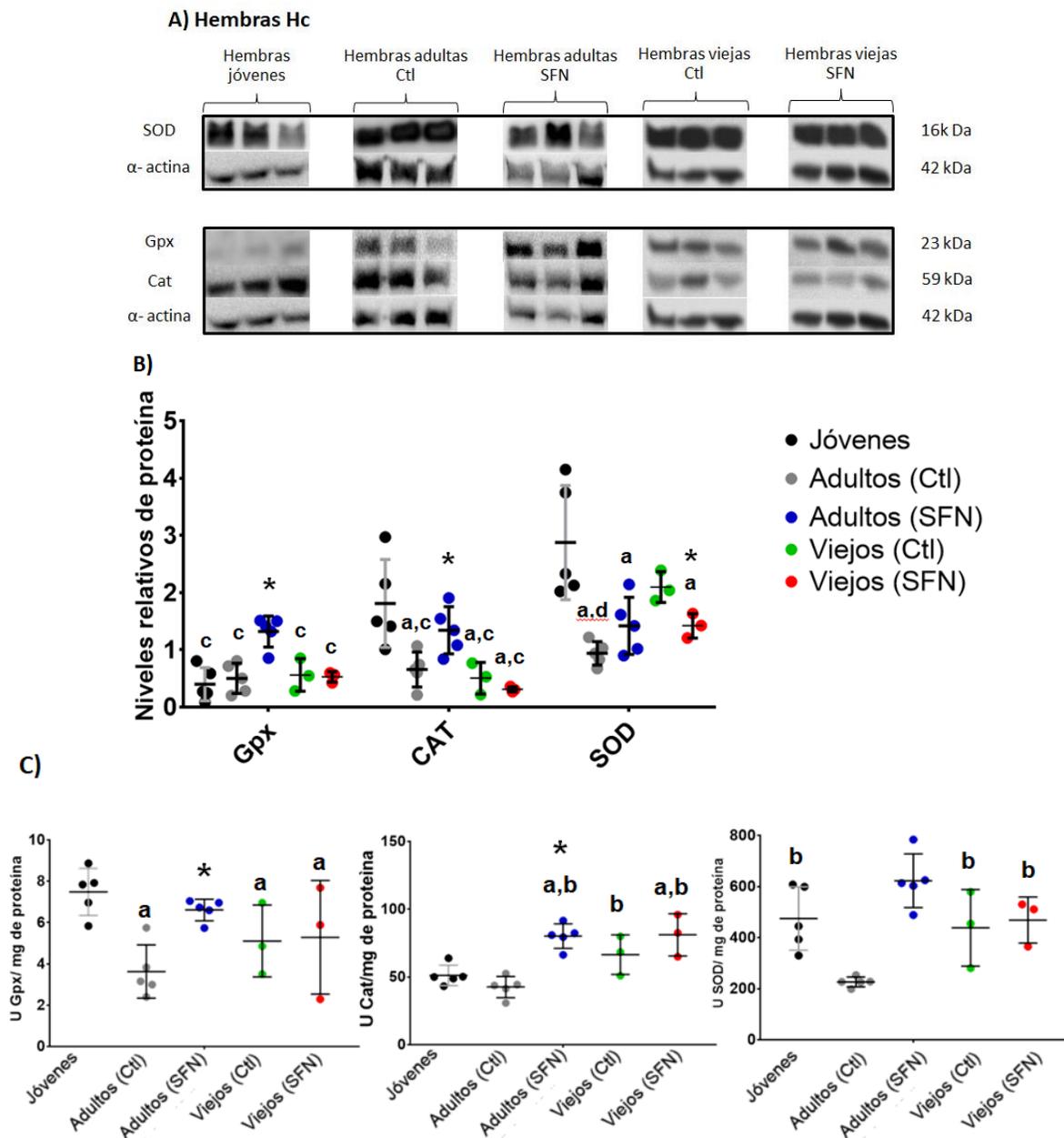
En el caso del Hc de las hembras (Figs.13A y 13B), se encontraron diferencias significativas entre los niveles de algunas de las enzimas antioxidantes evaluadas. Los niveles de Gpx en Hc fueron mayores en el grupo de hembras adultas tratadas con SFN en comparación con todos los demás grupos experimentales (Jóvenes:  $p=0.001$ ; Adultas Ctl:  $p=0.006$ ; Viejas Ctl:  $p=0.016$ ; Viejas SFN:  $p=0.014$ ), (Figs. 8A y 8B).

De igual forma, se observaron niveles elevados de CAT en el Hc de los grupos de ratas jóvenes y adultas tratadas con SFN en comparación con el grupo de ratas adultas no tratadas (Joven:  $p=0.025$ ; Adultas SFN:  $p=0.046$ ), con el grupo de ratas viejas control (Joven:  $p=0.006$ ; Adultas SFN:  $p=0.020$ ) y con el grupo de ratas viejas tratadas con SFN (Joven:  $p\leq 0.001$ ; Adultas SFN:  $p=0.001$ ), (Fig.13A y 13B).

Cuando se evaluó el Hc de las hembras se obtuvieron diferencias en los niveles de SOD del grupo de hembras jóvenes, en el que se detectaron niveles significativamente más altos en comparación con los grupos de hembras adultas (Adultas Ctl:  $p \leq 0.001$ ; Adultas SFN:  $p = 0.002$ ), así como con el grupo de hembras viejas tratadas con SFN ( $p = 0.018$ ). No se encontraron diferencias entre los niveles de SOD en el Hc de los grupos de hembras adultas ni de viejas, sin importar si fueron tratadas o no con SFN. Los niveles de enzimas antioxidantes en Hc parecieron no ser afectados por el tratamiento con SFN, e incluso se notó una reducción significativa en los niveles de algunas enzimas antioxidantes en los grupos de hembras viejas tratadas con SFN cuando se comparó con el grupo control de la misma edad.

Sin embargo, la actividad antioxidante de las enzimas evaluadas en el Hc se detectó un incremento en la actividad de las tres enzimas en el grupo de hembras adultas a las que se les administró el SFN en comparación con el grupo de hembras control de la misma edad (Gpx:  $p = 0.020$ ; CAT:  $p = 0.001$ ; SOD:  $p \leq 0.001$ ), pero que no se observó efecto alguno del tratamiento en los grupos de ratas hembras más viejas en ninguna de las enzimas evaluadas (Fig. 13C). En el caso de la actividad antioxidante de Gpx en el Hc, se observó una mayor actividad en el grupo de hembras jóvenes comparado con los demás grupos (Adultas Ctl:  $p = 0.001$ ; Viejas Ctl:  $p = 0.014$ ; Viejas SFN:  $p = 0.031$ ), con excepción del grupo de ratas hembras adultas tratadas con SFN, en el que se obtuvieron valores similares al del grupo de hembras jóvenes. Por otra parte, la actividad de CAT en Hc se mostró constante entre el grupo de hembras

jóvenes y el grupo de hembras adultas control, pero se incrementó en los grupos tratados con SFN, tanto en Hc de hembras adultas ( $p=0.001$ ) como en el grupo de hembras viejas ( $p=0.004$ ). Además se observó un aumento en la actividad de CAT en Hc con la edad, cuya actividad antioxidante fue mayor en el grupo de ratas hembras viejas control que el grupo de hembras adultas control ( $p=0.035$ ).



**Fig.13** Evaluación de las enzimas antioxidantes en el Hc de hembras. **A)** Western blots representativos de Gpx, CAT y SOD en hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **B)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas normalizadas contra actina. **C)** Evaluación de la actividad antioxidante de las tres enzimas estudiadas. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

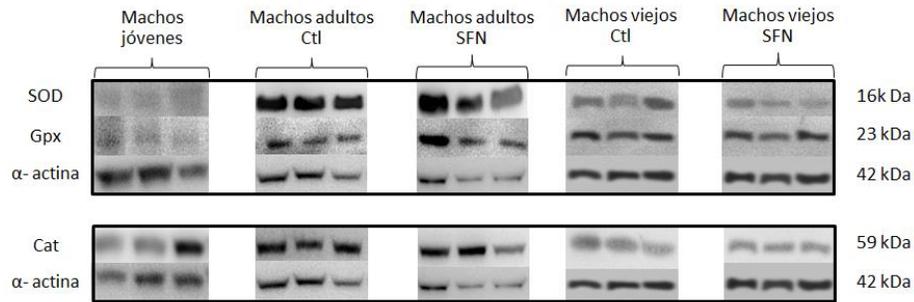
### 6.2.2.3 Actividad y expresión de enzimas antioxidantes en la corteza cerebral de machos

Al evaluar la Cx de los machos (Figs.14A y 14B) se encontraron niveles elevados de la enzima Gpx en el grupo de los adultos control ( $p=0.003$ ), el grupo de adultos tratados con SFN ( $p=0.021$ ) y el grupo machos viejos no tratados ( $p=0.039$ ) cuando se compararon con el grupo joven. El tratamiento con SFN no tuvo efecto sobre los niveles de Gpx de la Cx en los grupos de machos adultos. En contraste, se pudo observar una reducción significativa en los niveles de Gpx de la Cx al compararse con el grupo de machos control de la misma edad ( $p=0.047$ ), (Figs.14A y 14B). En el caso de CAT se observaron niveles más altos en la Cx del grupo de ratas jóvenes en comparación con los grupos de animales adultos (Ctl:  $p=0.028$ ; SFN:  $p=0.002$ ) y en los grupos viejos (Ctl:  $p=0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ), pero no se hallaron diferencias entre los niveles de CAT de los grupos de machos adultos tratados y no tratados. Por otra parte, se observó una reducción en los niveles del grupo de machos viejos tratados con SFN comparado con el grupo control de la misma edad ( $p=0.024$ ), (Fig.14A y 14B). De manera similar a lo observado en relación a los niveles de Gpx, los niveles de SOD en la Cx se incrementaron en ambos grupos de machos adultos en comparación con el grupo joven y, nuevamente, el tratamiento con SFN incrementó significativamente los niveles de SOD en la Cx en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p=0.028$ ). En los grupos de machos viejos se observó un comportamiento similar al de las hembras viejas de la misma edad, en el que el tratamiento con SFN redujo los niveles de SOD en Cx en comparación con el grupo

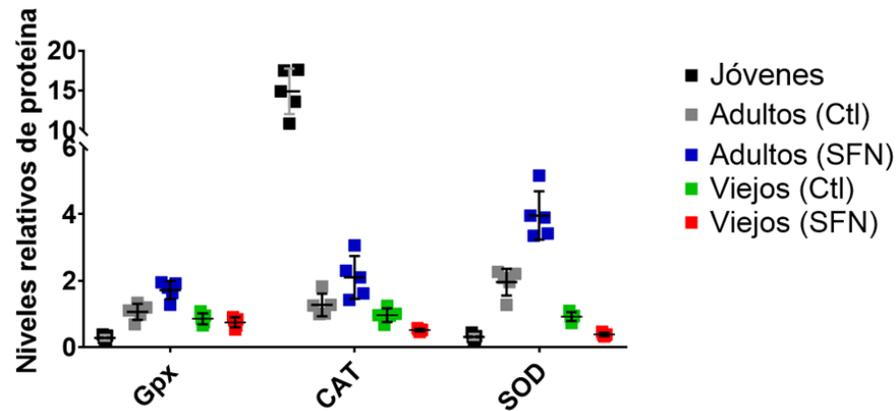
viejo administrado sólo con el vehículo ( $p=0.019$ ). También se observó una disminución significativa en los niveles de SOD en el grupo de machos viejos no tratados (Adultos Ctl:  $p=0.028$ ; Adultos SFN:  $p=0.031$ ) así como en el grupo de machos viejos tratados con SFN (Adultos Ctl:  $p=0.018$ ; Adultos SFN:  $p\leq 0.001$ ), (Figs.14A y 14B).

Al evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes, se observó que el tratamiento con SFN incrementó su actividad en la Cx del grupo de machos adultos al compararlo con el grupo control de la misma edad (Gpx:  $p\leq 0.001$ ; CAT:  $p=0.044$ ; SOD:  $p=0.001$ ), pero no tuvo ningún efecto sobre la actividad antioxidante de las enzimas en los grupos de machos viejos. En el caso de la actividad de CAT, el grupo joven y el grupo de adultos controles tuvieron valores similares y fueron significativamente más bajos que los encontrados en el grupo de machos adultos tratados con SFN (Jóvenes:  $p=0.014$ ; Adultos Ctl:  $p=0.044$ ), al igual que en el grupo de machos viejos no tratados (Jóvenes:  $p=0.02$ ; Adultos Ctl:  $p=0.043$ ) y machos viejos tratados con SFN (Jóvenes:  $p=0.045$ ; Adultos Ctl:  $p=0.009$ ; Fig.14C). La actividad antioxidante de SOD en Cx se comportó de manera similar a lo encontrado en la actividad antioxidante de CAT, en la que el grupo de machos adultos no tratados obtuvo una actividad menor en comparación al grupo joven ( $p=0.013$ ), mientras que el grupo de machos adultos tratados con SFN y ambos grupos de machos viejos obtuvieron actividades similares. El grupo de machos adultos tratados con SFN tuvo una mayor actividad de SOD en la Cx en comparación a su grupo control de la misma edad ( $p\leq 0.001$ ), (Fig.14C).

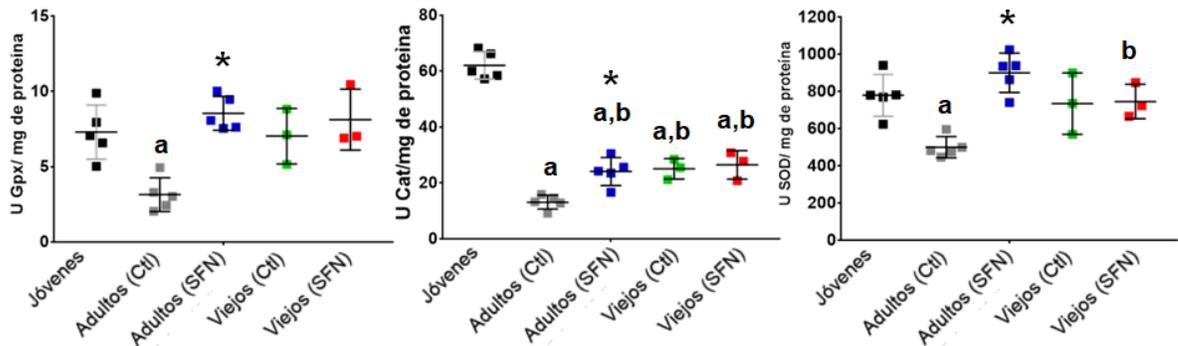
**A) Machos Cx**



**B)**



**C)**

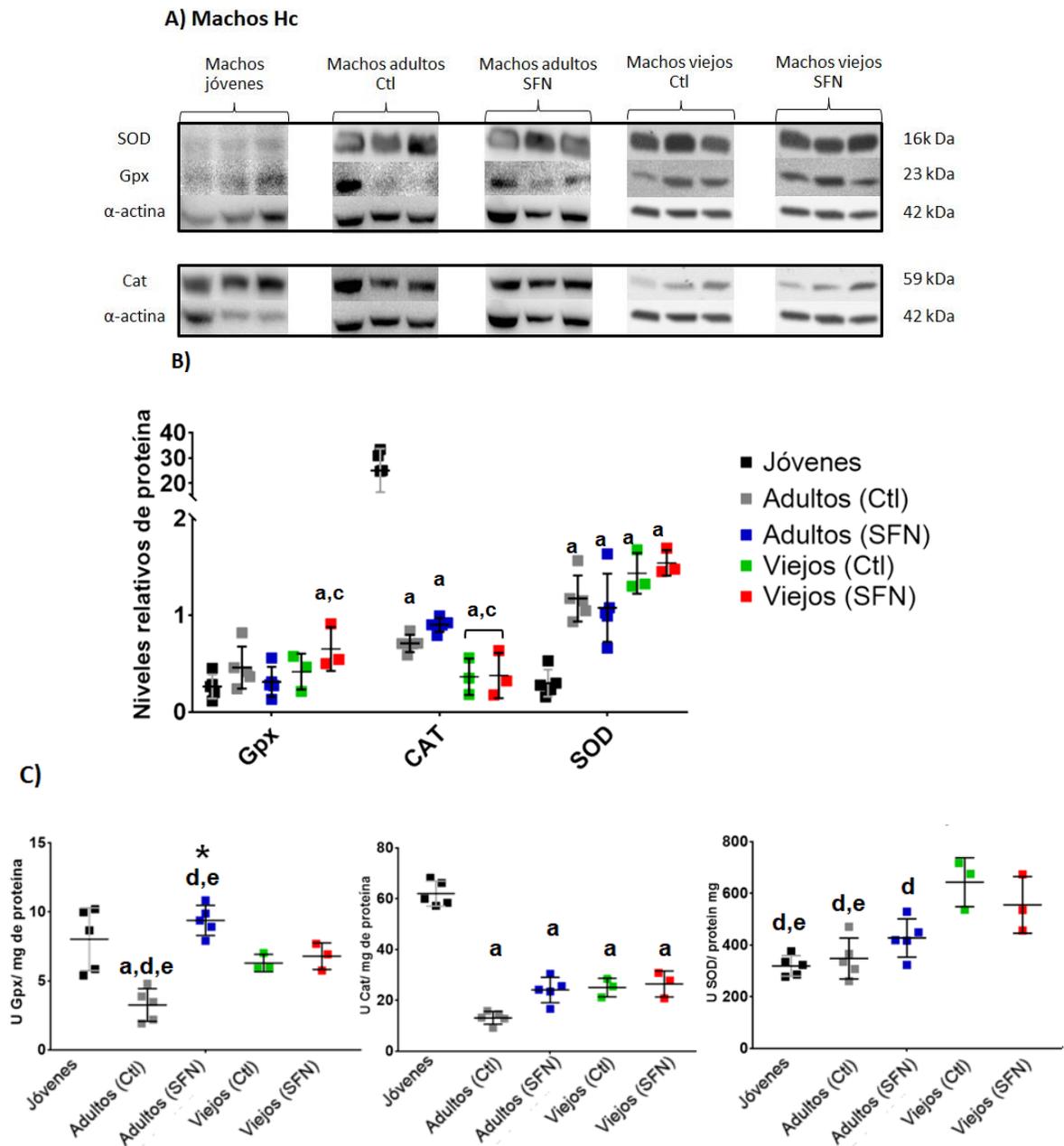


**Fig.14** Evaluación de las enzimas antioxidantes en la Cx de machos. **A)** Western blots representativos de Gpx, CAT y SOD en machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **B)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas normalizadas contra actina. **C)** Evaluación de la actividad antioxidante de las tres enzimas estudiadas. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

#### 6.2.2.4 Actividad y expresión de enzimas antioxidantes en el hipocampo de machos

Finalmente, al evaluar los niveles de las enzimas obtenidas del Hc de los individuos macho no se encontraron diferencias significativas en los niveles de Gpx entre los grupos adultos (Figs.15A y 15B), pero se encontraron niveles más altos en el grupo de individuos viejos tratados con SFN cuando se comparó con el grupo de machos jóvenes ( $p=0.001$ ) y con el grupo tratado con SFN ( $p=0.009$ ). De manera similar a lo observado en los niveles de CAT en la Cx, se encontraron niveles significativamente altos de esta enzima antioxidante que la observada en el resto de los grupos (Adultos Ctl:  $p=0.003$ ; Adultos SFN:  $p=0.002$ ; Viejos Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Viejos SFN:  $p\leq 0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de machos adultos o viejos tratados con SFN. Los niveles de SOD incrementaron significativamente en el Hc con la edad (Adultos Ctl:  $p=0.035$ ; Adultos SFN:  $p=0.007$ ; Viejos Ctl:  $p=0.002$ ; Viejos SFN:  $p\leq 0.001$ ), (Fig. 15A y 15B).

Cuando se evaluó la actividad antioxidante de las enzimas, la Gpx en Hc de machos mostró tener valores similares a los que se observaron en la Cx, por lo que la actividad de Gpx en el grupo de adultos no tratados fue menor a la encontrada en el grupo de animales jóvenes ( $p=0.005$ ), (Fig.15A y 15B). Las enzimas antioxidantes en el Hc del grupo de machos adultos tratados con SFN tuvo una actividad antioxidante de Gpx mayor al compararla con la del grupo de machos control de la misma edad ( $p\leq 0.001$ ), así como al compararlo con el grupo de machos viejos no tratado ( $p=0.039$ ).



**Fig.15** Evaluación de las enzimas antioxidantes en el Hc de machos. **A)** Western blots representativos de Gpx, CAT y SOD en machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **B)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas normalizadas contra actina. **C)** Evaluación de la actividad antioxidante de las tres enzimas estudiadas. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

El grupo de machos adultos no tratados mostraron tener una menor actividad antioxidante de Gpx cuando se comparó con ambos grupos de machos viejos (Viejos Ctl:  $p=0.036$ ; Viejos SFN:  $p=0.028$ ), (Fig.15C).

En resumen, el tratamiento con SFN incrementó la actividad antioxidante de las enzimas evaluadas en los grupos de animales adultos de ambos sexos, pero no tuvo efectos significativos sobre la actividad antioxidante en los grupos de animales viejos de ambos sexos. Además, el tratamiento con SFN disminuyó los niveles de las enzimas antioxidantes en los grupos viejos de ambos sexos en comparación con su grupo control de la misma edad. A pesar de que los niveles de las enzimas fueron similares en los grupos estudiados, el tratamiento con SFN incrementó la actividad de la mayoría de las enzimas evaluadas tanto en el Hc como en la Cx.

### **6.2.3 El efecto del SFN sobre el estado redox y el daño a proteínas por oxidación**

Se determinó el cociente de GSH/GSSG como un indicador del estado redox, así como la carbonilación de proteínas como indicador de daño relacionado a la oxidación como consecuencia del estrés oxidante.

#### **6.2.3.1 Estado redox en la corteza cerebral**

En la Cx de ambos sexos, los grupos de animales adultos obtuvieron cocientes de GSH/GSSG más bajos en comparación a los obtenidos en los grupos de ratas jóvenes del sexo correspondiente (Hembras:  $p=0.022$ ; Machos:  $p=0.005$ ), (Fig.16A). Además, el grupo de hembras adultas tratadas con SFN, obtuvo cocientes de

GSH/GSSG mayores a los observados en el grupo al que sólo se le administró el vehículo ( $p \leq 0.001$ ), (Fig.16A), mientras que no se encontraron diferencias significativas con el grupo de hembras jóvenes. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos de hembras viejas, sin importar si fueron o no tratadas con SFN. Aun así, los grupos de hembras viejas obtuvieron valores más altos en comparación con el grupo de ratas adultas no tratadas (Viejas Ctl:  $p=0.005$ ; Viejas SFN:  $p=0.047$ ; Fig.16A).

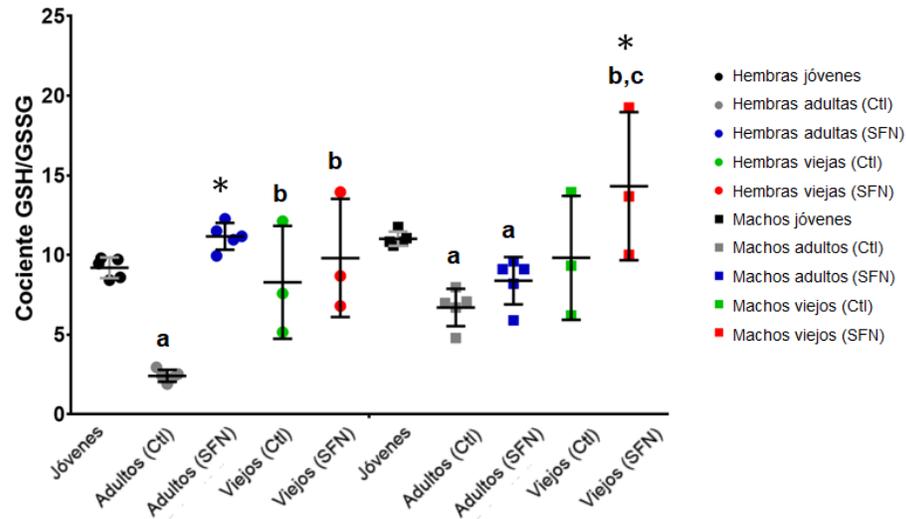
En cuanto a los machos, se observó que los grupos viejos tratados con SFN tuvieron cocientes de GSH/GSSG más altos al compararlos con el grupo no tratado de la misma edad ( $p=0.028$ ). Los machos viejos tratados con SFN obtuvieron un cociente GSH/GSSG más alto que los grupos adultos (Adultos Ctl:  $p=0.001$ ; Adultos SFN:  $p=0.014$ ), (Fig.16A).

### **6.2.3.2 Estado redox en el hipocampo**

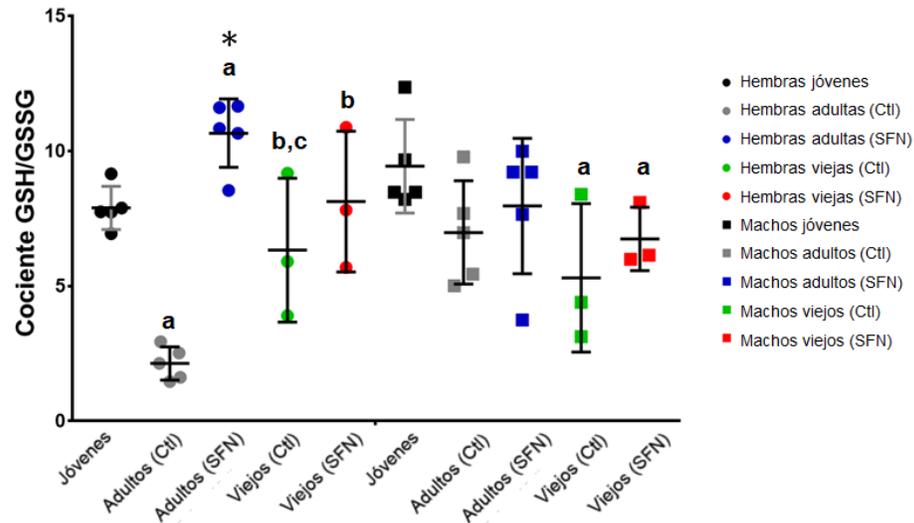
Por otra parte, en el Hc, el tratamiento con SFN sólo incrementó el cociente de GSH/GSSG en hembras adultas al compararlas con su grupo control de la misma edad ( $p \leq 0.001$ ) y con el grupo joven ( $p=0.038$ ), (Fig. 11B). Ambos grupos de hembras viejas obtuvieron cocientes de GSH/GSSG similares a los observados en los grupos de hembras jóvenes, e incluso más altos a los encontrados en el grupo de hembras adultas no tratadas (Viejas Ctl:  $p=0.046$ ; Viejas SFN:  $p=0.009$ ). En el Hc no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de hembras jóvenes y adultas, aunque se observaron cocientes de GSH/GSSG menores en los grupos de

hembras viejas en comparación con el grupo de hembras jóvenes (Viejas Ctl:  $p=0.003$ ; Viejas SFN:  $p=0.043$ ).

**A) Cx**



**B) Hc**



**Fig.16** Determinación del cociente GSH/GSSG en la Cx y el Hc de hembras y machos. **A)** Cociente de GSH/GSSG correspondiente a la Cx de grupos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN de ambos sexos. **B)** Cociente de GSH/GSSG correspondiente al Hc de grupos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN de ambos sexos. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes:  $n=5$ ; Adultos Ctl:  $n=5$ ; Adultos SFN:  $n=5$ ; Viejos Ctl:  $n=3$ ; Viejos SFN:  $n=3$ . Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p<0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p<0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p<0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p<0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p<0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p<0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

En resumen, el tratamiento con SFN incrementó el cociente GSH/GSSG en las hembras adultas en ambas regiones cerebrales evaluadas, mientras que en el caso de los machos, no se observó ningún efecto significativo al comparar al grupo de ratas jóvenes con los grupos de animales viejos y tampoco se observó efecto alguno en los grupos de animales viejos de ninguno de los dos sexos tratados con SFN. Sin embargo, el tratamiento con SFN sí disminuyó el cociente GSH/GSSG del grupo de animales adultos en comparación con el grupo control de la misma edad.

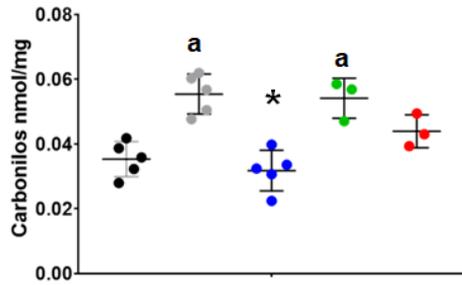
### **6.2.3.3 Daño a proteínas en la corteza cerebral e hipocampo**

Para determinar si el tratamiento con SFN también podía reducir el daño oxidante, se evaluó la carbonilación de proteínas.

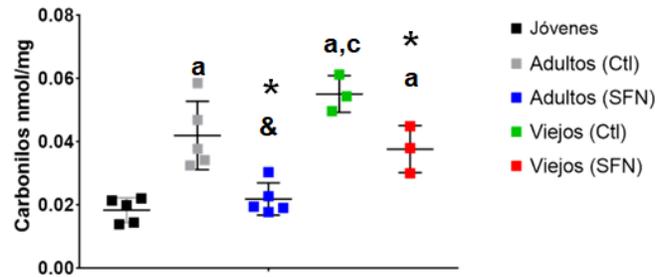
El tratamiento con SFN fue capaz de disminuir el contenido de proteínas carboniladas en la Cx e Hc de los grupos de animales adultos de ambos sexos al ser comparados con los individuos del grupo control de la misma edad. (Hembras: Cx:  $p=0.005$ ; Hc:  $p=0.039$ ; Machos: Cx:  $p=0.039$ ; Hc:  $p=0.048$ ), (Fig.17A y 17D).

En los grupos tratados con SFN se identificó una disminución del contenido de proteínas carboniladas, mostrando una mejoría notoria en el estado redox, así como un efecto protector en los grupos de animales adultos de ambos sexos y, de forma inesperada, también en los grupos de animales viejos.

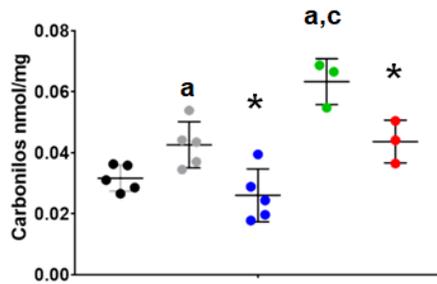
**A) Hembras Cx**



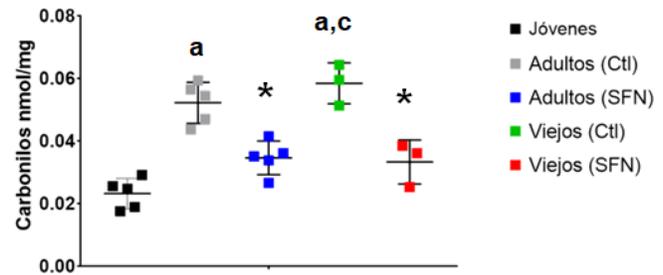
**B) Machos Cx**



**C) Femenas Hc**



**D) Males Hc**



**Fig.17** Evaluación del daño a proteínas por carbonilación en la Cx y el Hc de hembras y machos. **A)** Niveles de grupos carbonilos correspondientes a la Cx de grupos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN de ambos sexos. **B)** Niveles de grupos carbonilos correspondientes al Hc de grupos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN de ambos sexos. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: **(a)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven **(b)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl **(c)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN **(d)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl **(e)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and **(\*)**  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

### 6.2.4 Análisis factorial para evaluar la relación entre las variables del estado redox

Para reducir las dimensiones representadas por todas las variables evaluadas en un sistema más simple para su análisis, llevamos a cabo un análisis factorial (FA) como

se describe en la sección de métodos. El cociente de Nrf2/Keap1, los niveles de todas las enzimas antioxidantes así como su actividad enzimática fueron incluidas en el análisis, junto con el cociente GSH/GSSG y el contenido de proteínas carboniladas. El FA redujo las variables a un sistema conformado de tres factores.

En el caso de la Cx, los tres factores explicaron el 67% de la variación en el modelo. El factor 1 fue denominado "Cx H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>", y se encontraba negativamente relacionado con el nivel relativo de la Gpx y positivamente con la actividad de CAT. El factor 2, llamado "Cx RS" representa al estado redox (redox state por su traducción al inglés), el cual estaba positivamente relacionado a la actividad de SOD, el cociente GSH/GSSG y la actividad de Gpx, pero se encontraba negativamente relacionado al contenido de carbonilos. Por último, el factor 3 fue denominado "CX FLD" el cual representa a la primera línea de defensa (first line of defense por su traducción al inglés) contra las ERO, que estaba positivamente relacionada con el cociente de Nrf2/Keap1 y con los niveles relativos de SOD (Fig.18A).

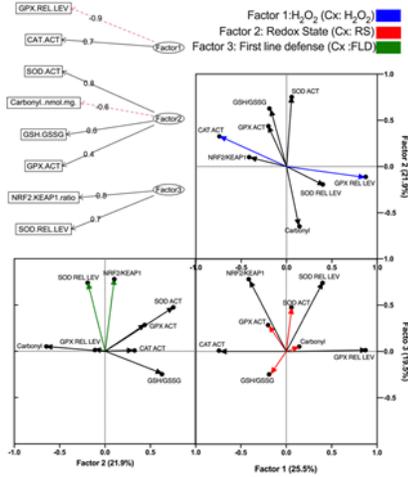
En el caso del Hc, los tres factores explicaron el 59% de la variación del modelo. Dichos factores tuvieron nombres similares, pero consistieron de diferentes componentes. El factor 1 fue denominado "Hc RS" y representaba al estado redox, el cual estaba representado positivamente por la actividad antioxidante de CAT y el cociente de GSH/GSSG, y negativamente con el contenido de carbonilos. El factor 2 fue llamado "Hc FLD" el cual representa la primera línea de defensa y está positivamente relacionado con la actividad de SOD, y sus niveles relativos, así como

con los niveles relativos de Gpx. Finalmente, el factor 3 fue denominado como “Hc Gpx”, el cual estaba positivamente representado por la actividad de Gpx (Fig.18C).

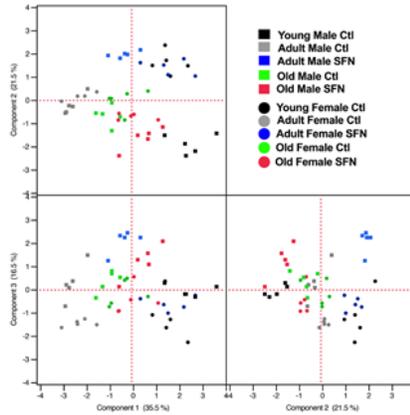
En la gráfica de puntos correspondiente a región de la Cx (Fig.18B), observamos que para ambos sexos, los grupos de animales jóvenes estaban localizados principalmente en el centro y en los paneles derechos en donde el factor 1 “Cx H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>” está localizado mientras que los grupos de animales adultos no tratados de ambos sexos se encontraban localizados principalmente en los paneles izquierdos en donde la representación del factor 1 y el factor 2 “Cx RS” estaban presentes. Los machos viejos tratados con SFN, fueron quienes mostraron una mejora, localizándose principalmente hacia el factor 3 “Cx FLD”, en comparación con el grupo de hembras adultas no tratadas.

La gráfica de puntos correspondiente a la región del Hc (Fig.18D) muestra que los grupos de animales jóvenes de ambos sexos en conjunto con los animales adultos tratados con SFN se localizaban principalmente en el centro del gráfico y en los paneles derechos. Particularmente el grupo de machos jóvenes se localizó en el panel inferior derecho, donde el factor 1 “Hc RS” está localizado. De manera distinta a lo que se encontró en el grupo de las hembras jóvenes que se localizaban principalmente en el panel del centro en el que el factor 2 “Hc FDL” se encuentra localizado, relacionado con la mejora en los factores relacionados con el estado redox y primera línea de defensa. Este análisis sugiere que el tratamiento con SFN puede recuperar la homeostasis redox en la Cx de los machos viejos, así como en el Hc de las hembras viejas.

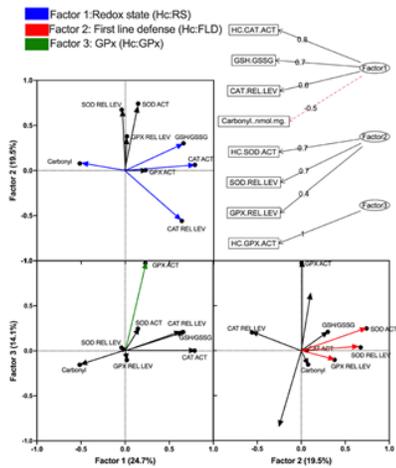
**(A) Gráfico de cargas Cx**



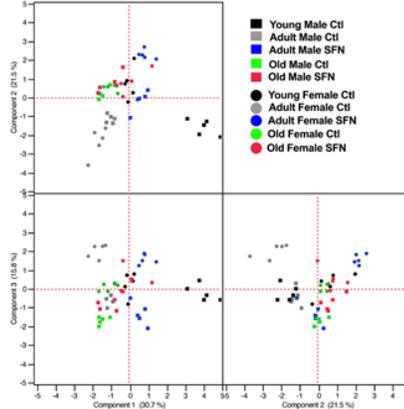
**(B) Gráfico de puntos Cx**



**(C) Gráfico de cargas Hc**



**(D) Gráfico de puntos Hc**



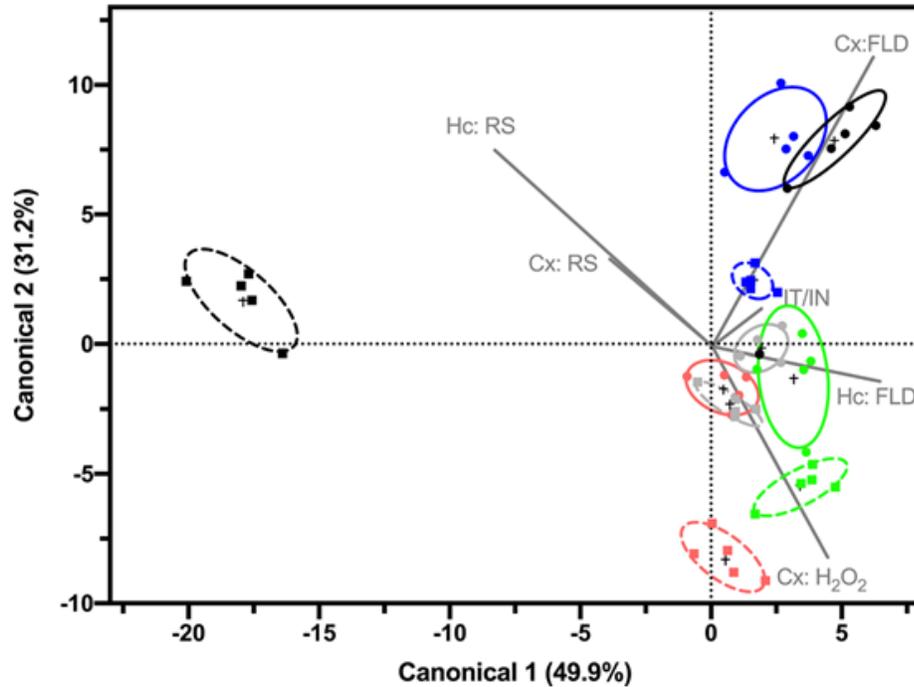
**Fig.18** Análisis factorial de la Cx e Hc de machos y hembras. Se utilizaron todas las variables de ambos sexos para llevar a cabo la prueba de Kaiser-Meyere-Olkin (KMO). Las variables con un MSA<0.50 fueron excluidas del análisis. Las cargas pueden variar desde -1 a 1. Las cargas cercanas a -1 o 1 indican que la variable influye fuertemente sobre el factor. Las cargas cercanas a 0 indican que la variable tiene una influencia débil sobre el factor. **A)** Diagrama de árbol para facilitar la interpretación de los factores obtenidos para Cx. **B)** Gráfico de puntos para las variables correspondientes a Cx. **C)** Diagrama de árbol para facilitar la interpretación de los factores obtenidos para Hc. **D)** Gráfico de puntos para las variables correspondientes a Hc. Cada punto representa a un individuo. Los puntos representan a las hembras, mientras que los cuadrados representan a los machos.

### 6.2.5 Análisis discriminante

El modelo discriminante se realizó con los factores generados en el FA, y además se incluyó la variable IT/IN proveniente de los datos obtenidos en la prueba de reconocimiento de objetos novedosos, ya que la covarianza fue significativa (lambda de Wilks=  $3.6e-6$ ,  $F_{54,183}= 236.2$ ,  $p<0.0001$ ). Ambas dimensiones canónicas explicaban un total del 81.12% de la varianza total. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con SFN mejora en gran medida la FLD en la Cx de las hembras adultas, siendo muy similar a los observados en las hembras jóvenes. En el caso del grupo de hembras adultas no tratadas correlacionaron negativamente con el RS tanto de Cx como de Hc, teniendo una correlación débil con la FLD. Ambos grupos viejos también se correlacionaron negativamente con el RS y, de manera débil, con el factor  $H_2O_2$  que involucra a las enzimas que contienen contra altas concentraciones de  $H_2O_2$ . Los grupos de hembras viejas y adultas no tratadas fueron estadísticamente similares.

En cuanto a los machos, el grupo de animales jóvenes obtuvo una fuerte correlación con el RS tanto en la Cx como en el Hc, y se correlacionó negativamente con la FLD y el  $H_2O_2$ , debido a que al tener un buen RS, no se requirió activar la respuesta antioxidante. Es importante resaltar que el grupo de machos adultos tratados con SFN están correlacionados con la FLD, lo que también incrementó su correlación con el RS, probablemente en un intento para restablecer su homeostasis redox, aunque en menor medida al compararlos con las hembras de la misma edad y tratamiento. Por otra parte, los grupos de machos viejos se encontraron positivamente

correlacionados con el factor  $H_2O_2$  y negativamente con la FLD y el RS, lo que significa que estaban en un estado de estrés oxidante (Fig. 19).



**Fig.19** Análisis discriminante sobre los factores de machos y hembras. Se graficaron la primer y segunda dimensión canónica en las que se representó la mayor parte de la variación, dicho porcentaje se indica en cada una de las dimensiones. Se graficaron las 5 variables más representativas (Hc: RS, Hc: FLD, Cx: FLD, Cx: RS, Cx: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en conjunto con el parámetro de memoria tiempo de interacción/número de interacciones de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso. La longitud y la dirección de los rayos de la gráfica corresponden a el nivel de asociación con cada grupo individual. Cada punto representa a un individuo. Los puntos representan a las hembras, mientras que los cuadrados representan a los machos. Los grupos experimentales se encuentran rodeados por una elipse del 95% de confianza. La cruz en el centro de la elipse representa a la media.

### 6.2.6 Efecto del SFN sobre el perfil inflamatorio en el sistema nervioso central

Se realizó el análisis de un perfil de 22 citocinas y quimiocinas para evaluar el estado inflamatorio y los niveles de algunos componentes del SASP. En el caso de la

citocina IL-4 y de las quimiocinas MCP-1 y MIP-2 se determinaron niveles inferiores al rango de detección del kit, por lo que no se tomaron en cuenta para la realización del análisis. Las citocinas se dividieron de acuerdo a su actividad en tres paneles: citocinas proinflamatorias y reguladoras, quimiocinas y citocinas antiinflamatorias.

#### **6.2.6.1 Perfil inflamatorio en la corteza cerebral de ratas**

##### **Wistar hembras**

En la Cx de las ratas hembras se encontró un aumento en los niveles de las citocinas proinflamatorias y reguladoras en relación con la edad, independientemente del tratamiento. Además, se determinó un incremento en los niveles de la mayoría de las citocinas en la Cx de las hembras adultas no tratadas en comparación con el grupo de ratas jóvenes. Interesantemente, los niveles de citocinas encontrados en los grupos de ratas hembras viejas no tratadas fueron menores a los observados en los grupos de hembras adultas controles o, en su defecto, fueron similares (Fig.20).

- G-CSF y IL-5. No se encontraron diferencias en los niveles de estas citocinas en la Cx de las hembras sin importar el tratamiento o la edad de las mismas.
- GM-CSF, IFN- $\gamma$  e IL-6. Se encontró una disminución de los niveles de GM-CSF ( $p=0.047$ ), IFN- $\gamma$  ( $p=0.038$ ) y IL-6 ( $p=0.046$ ) en las hembras adultas tratadas con SFN en comparación a los grupos controles de la misma edad. No se encontraron otras diferencias al realizar el análisis entre los otros grupos.
- TNF- $\alpha$ . Esta citocina disminuyó con el tratamiento de SFN en la Cx de las hembras adultas ( $p=0.024$ ). Los niveles de TNF- $\alpha$  en las hembras adultas control

fueron mayores que en el grupo de hembras jóvenes ( $p=0.047$ ) y que el grupo de hembras viejas tratadas con SFN ( $p=0.036$ ).

- IL-1 $\alpha$ . Esta interleucina aumentó en las hembras adultas no tratadas ( $p=0.015$ ) y las viejas tratadas con SFN ( $p=0.019$ ) en comparación con el grupo de hembras jóvenes. El grupo de hembras adultas tratadas con SFN tuvo niveles menores de IL-1 $\alpha$  en comparación con las no tratadas de la misma edad ( $p=0.036$ ). Las hembras adultas tratadas con SFN también tuvieron niveles significativamente menores que los de ambos grupos de hembras viejas (Ctl:  $p=0.012$ ; SFN:  $p=0.015$ ).

- IL-1 $\beta$ . Esta interleucina incrementó con la edad, siendo sus niveles mayores en la hembras adultas control en comparación con las ratas jóvenes ( $p<0.001$ ). El grupo de hembras viejas no tratadas también tuvo niveles mayores de IL-1 $\beta$  en relación con el grupo de ratas jóvenes ( $p<0.001$ ), y sus niveles fueron más altos que los encontrados en las ratas adultas no tratadas ( $p<0.001$ ). El SFN disminuyó los niveles de IL-1 $\beta$  de las hembras adultas en comparación al grupo control de la misma edad ( $p=0.026$ ), aunque no alcanzaron los niveles obtenidos para el grupo de las hembras jóvenes, ya que fueron significativamente mayores en el grupo de hembras adultas tratadas con SFN en comparación con las hembras jóvenes ( $p<0.001$ ). En cuanto a las hembras viejas, no se encontraron diferencias con el tratamiento de SFN, aunque se registraron los niveles más altos de IL-1 $\beta$  en ambos grupos en comparación con el grupo de hembras jóvenes y ambos grupos de hembras adultas (Viejas ctl: Jóvenes:  $p\leq 0.001$ ; Adultas ctl:  $p\leq 0.001$ ; Adultas SFN:  $p\leq 0.001$ . Viejas SFN: joven:  $p\leq 0.001$ ; adultas ctl:  $p\leq 0.001$ ; adultas SFN:  $p=0.023$ ).

- IL-17A. Esta interleucina presentó niveles similares en el grupo de hembras jóvenes, adultas tratadas con SFN, viejas control, y viejas tratadas con SFN, pero los niveles fueron significativamente mayores en las adultas no tratadas en comparación con el grupo de las jóvenes ( $p=0.038$ ) y con el grupo de las ratas viejas ( $p=0.041$ ).
- IL-2. Esta interleucina presentó niveles significativamente mayores en las hembras adultas del grupo control ( $p=0.002$ ), las adultas tratadas con SFN ( $p=0.044$ ) y el grupo de hembras viejas tratados con SFN ( $p=0.046$ ) cuando se comparan con las ratas jóvenes. Nuevamente, el grupo de hembras adultas no tratadas presenta niveles mayores de IL-2 cuando se compara con ambos grupos de ratas hembra viejas (Ctl:  $p=0.031$ ; SFN:  $p=0.031$ ).

En el panel B de la figura 20 también se observa que en la Cx, los niveles de la mayoría de las quimiocinas incrementan en el grupo de hembras adultas control y disminuyen en el grupo de hembras viejas.

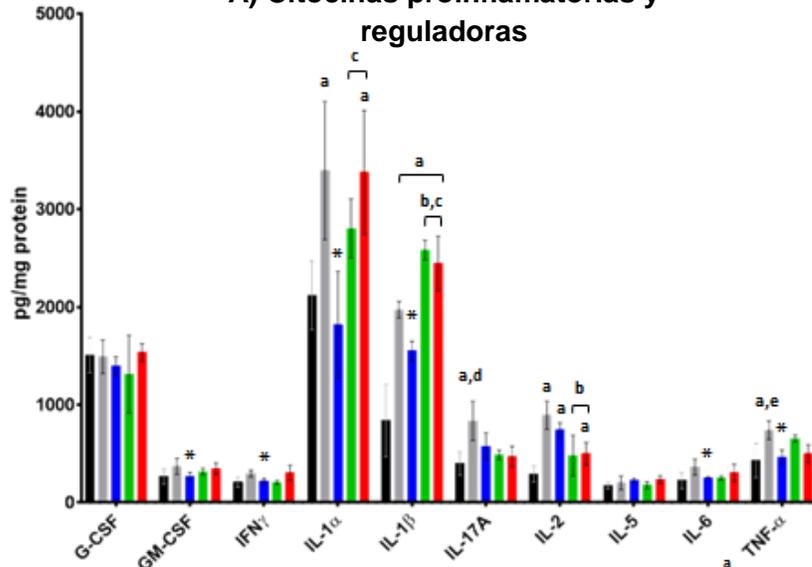
- Eotaxina. Se encontraron niveles similares de esta quimiocina en los grupos de hembras jóvenes, adultas tratadas con SFN y ambos grupos de ratas viejas. Las ratas adultas no tratadas obtuvieron niveles significativamente mayores que las jóvenes ( $p=0.048$ ) y que el grupo de animales tratados con SFN de la misma edad ( $p=0.039$ ).
- Gro- $\alpha$ . Esta quimiocina mostró un comportamiento similar al observado en la eotaxina, ya que también se encontraron niveles más altos en las hembras adultas no tratadas en comparación con las hembras jóvenes ( $p=0.024$ ). De igual manera, la

administración de SFN disminuyó los niveles de Gro- $\alpha$  en las ratas adultas en comparación con los animales del grupo no tratado de la misma edad ( $p=0.018$ ). Se registraron los niveles más altos de la quimiocina en el grupo viejo tratado con SFN en comparación con el grupo joven ( $p=0.049$ ).

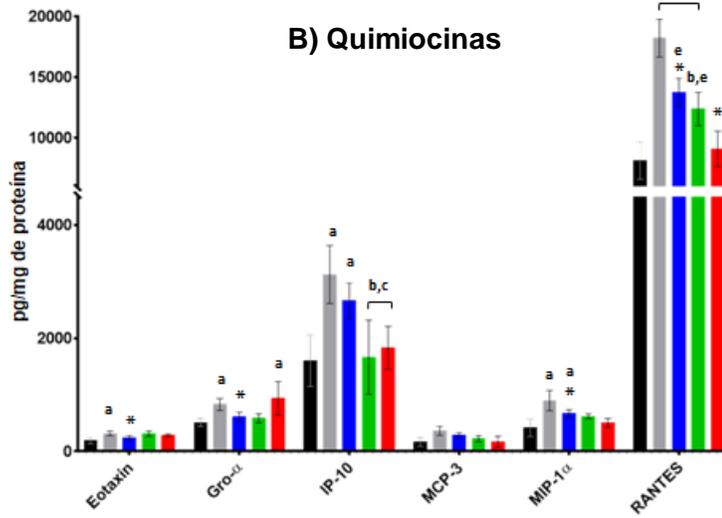
- IP-10. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de hembras jóvenes y ambos grupos de hembras viejas en relación a esta quimiocina (Fig.20B). Tampoco se encontraron diferencias entre los grupos adultos sin importar si fueron o no tratadas con SFN. Sin embargo, los niveles en ambos grupos fueron significativamente más altos que en el grupo de las ratas jóvenes (ctl:  $p=0.009$ ; SFN:  $p=0.013$ ), en el de las ratas viejas no tratadas (ctl:  $p=0.037$ ; SFN:  $p=0.047$ ), y en el de las ratas viejas tratadas con SFN (ctl:  $p=0.034$ ; SFN:  $p=0.036$ ).
- MCP-3 Para esta quimiocina no se encontraron cambios con la edad, ni con el tratamiento con SFN (Fig.20B).
- MIP-1 $\alpha$ . Esta quimiocina presentó valores similares en las hembras jóvenes y en ambos grupos de ratas viejas, mientras que los grupos de hembras adultas presentaron niveles más altos en comparación con el grupo de hembras jóvenes (ctl:  $p=0.047$ ; SFN:  $p=0.041$ ). A pesar de esto, el tratamiento con SFN sí disminuyó los niveles de MIP-1 $\alpha$  en las hembras adultas en comparación con el grupo no tratado de la misma edad ( $p=0.036$ ).

Hembras Cx

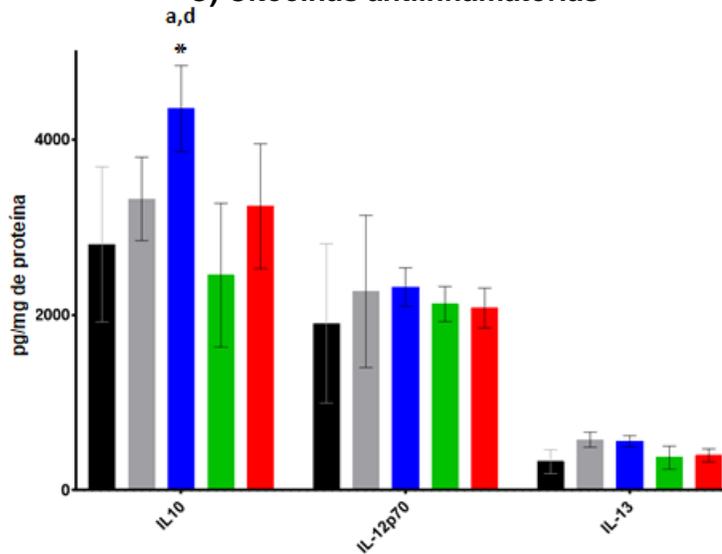
A) Citocinas proinflamatorias y reguladoras



B) Quimiocinas



C) Citocinas antiinflamatorias



**Fig.20** Análisis de citocinas y quimiocinas en la Cx de las hembras. **A)** Panel de citocinas proinflamatorias y reguladoras de la Cx de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **B)** Panel de quimiocinas de la Cx de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **C)** Panel de citocinas antiinflamatorias de la Cx de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: **(a)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven **(b)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl **(c)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN **(d)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl **(e)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and **(\*)**  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

- **RANTES.** Esta molécula mostró los niveles más altos de las 8 quimiocinas evaluadas, siendo en promedio 10 veces mayor a las demás. Los niveles de RANTES se incrementaron en ambos grupos de hembras adultas (ctl:  $p \leq 0.001$ ; SFN:  $p \leq 0.001$ ) y en las hembras viejas no tratadas ( $p \leq 0.001$ ) en comparación con el grupo de hembras jóvenes. Nuevamente, las hembras adultas no tratadas presentaron los niveles más altos de RANTES, incluso mayores que los observados en ambos grupos de hembras viejas (ctl:  $p \leq 0.001$ ; SFN:  $p \leq 0.001$ ). Los niveles observados en las hembras adultas tratadas con SFN fueron significativamente menores que el grupo no tratado de la misma edad ( $p \leq 0.001$ ). Llama la atención que los niveles observados en las hembras viejas tratado con SFN fueron significativamente más bajos que los encontrados en las controles de la misma edad ( $p \leq 0.001$ ).

En el panel de las citocinas antiinflamatorias no se observaron cambios en la IL-12p70 ni en la IL-13 (Fig.20C), mientras que la IL-10 mostró los niveles más altos en el grupo de individuos adultos tratados con SFN al compararlos con el grupo de individuos jóvenes ( $p = 0.005$ ), con las hembras adultas no tratadas ( $p = 0.019$ ) y con el grupo de hembras viejas no tratadas ( $p = 0.002$ ).

### 6.2.6.2 Perfil inflamatorio en el hipocampo de ratas Wistar hembras

En el Hc de las ratas hembra se observó un perfil de citocinas y quimiocinas similar al observado en la Cx.

En el panel de citocinas proinflamatorias y reguladoras (Fig.21A) podemos observar que los niveles de la mayoría de las citocinas incrementan con la edad.

- GM-CSF. Esta fue la única citocina que no tuvo ninguna variación con la edad ni con el tratamiento con SFN.
- G-CSF. Esta citocina aumenta conforme a la edad en las hembras adultas no tratadas ( $p=0.017$ ), hembras viejas no tratadas ( $p=0.012$ ) y hembras viejas tratadas con SFN ( $p=0.033$ ) en comparación con el grupo de hembras jóvenes. El tratamiento con SFN disminuyó los niveles de G-CSF en las hembras adultas hasta niveles similares a los encontrados en las hembras jóvenes, los cuales fueron significativamente menores a los niveles encontrados en las hembras adultas control ( $p=0.005$ ), las hembras viejas control ( $p=0.033$ ) y las hembras viejas tratadas con SFN ( $p=0.010$ ). En los grupos de ratas viejas no se encontró ningún cambio con el tratamiento con SFN.
- IFN- $\gamma$ . Esta citocina incrementa con la edad en las hembras adultas no tratadas ( $p=0.004$ ), las hembras viejas no tratadas ( $p=0.001$ ) y las hembras viejas tratadas con SFN ( $p=0.008$ ) en comparación con el grupo de hembras jóvenes. El tratamiento con SFN en las hembras adultas también redujo los niveles de IFN- $\gamma$  en

comparación con el grupo control de la misma edad ( $p=0.008$ ) y con el grupo de hembras viejas control ( $p=0.009$ ).

- IL-1 $\alpha$  Esta interleucina no presentó diferencias entre el grupo de hembras jóvenes y ambos grupos de hembras adultas, pero sí se observaron niveles más altos de la IL-1 $\alpha$  en las hembras viejas sin importar el tratamiento al compararse con el grupo de hembras jóvenes (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ) y con el grupo de hembras adultas tratadas con SFN (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ).
- IL-1 $\beta$ . Esta interleucina también mostró un incremento con la edad en donde los grupos de hembras adultas (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ) y hembras viejas (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ) alcanzaron niveles significativamente mayores en comparación con el grupo de hembras jóvenes. A pesar de esto se encontró una disminución en los niveles de IL-1 $\beta$  en las hembras adultas ( $p=0.002$ ) y en las hembras viejas ( $p\leq 0.001$ ) tratadas con SFN en comparación con su grupo control de la misma edad.
- IL-17. Aumentó con la edad en el que los grupos de hembras adultas (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ) y viejas (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ) cuando se comparan con el grupo joven. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con SFN y los controles de la misma edad.
- IL-2 e IL-5. Ambas interleucinas mostraron comportamientos muy similares, aumentando con la edad en los grupos de hembras adultas (IL-2: ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p=0.003$ ; IL-5: ctl:  $p=0.029$ ; SFN:  $p=0.038$ ) y hembras viejas (IL-2: ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN

$p \leq 0.001$ ; IL-5: ctl:  $p=0.036$ ; SFN:  $p=0.038$ ) en comparación con las hembras jóvenes. El tratamiento con SFN en los grupos de hembras adultas redujo los niveles de ambas citocinas al compararlos con los niveles presentes en el grupo no tratado (IL-2:  $p=0.022$ ; IL-5  $p=0.039$ ).

- IL-6 y TNF- $\alpha$ . Ambas moléculas también incrementaron con la edad, alcanzando niveles más altos que los de las hembras adultas no tratadas (IL-6:  $p=0.039$ ; TNF- $\alpha$ :  $p=0.039$ ) y ambos grupos de hembras viejas (IL-6: ctl:  $p=0.037$ ; SFN:  $p=0.034$ ; TNF- $\alpha$ : ctl:  $p=0.037$ ; SFN:  $p=0.032$ ). Las ratas adultas tratadas con SFN alcanzaron niveles similares a los encontrados en el grupo de ratas jóvenes, por lo que también los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  en el grupo de ratas adultas no tratadas (IL-6:  $p=0.028$ ; TNF- $\alpha$ :  $p=0.038$ ) y los de ambos grupos de hembras viejas (IL-6: ctl:  $p=0.040$ ; SFN:  $p=0.017$ ; TNF- $\alpha$ : ctl:  $p=0.034$ ; SFN:  $p=0.015$ ) fueron significativamente mayores que los de las adultas

Las quimiocinas (Fig.21B) también aumentaron con la edad.

- Eotaxina. Respecto a esta quimiocina, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de ratas jóvenes y ninguno de los grupos de hembras adultas, sin importar si fueron tratados o no con SFN. En cuanto a los grupos de hembras viejas tampoco se encontraron diferencias significativas con el tratamiento con SFN, aunque los niveles de eotaxina sí fueron significativamente mayores que los encontrados en el grupo de ratas jóvenes (ctl:  $p=0.038$ ; SFN:  $p=0.048$ ) y en el grupo de ratas adultas tratadas con SFN (ctl:  $p=0.047$ ; SFN:  $p=0.048$ ).

- Gro- $\alpha$ , IP-10 y MCP-3. Estas quimiocinas igualmente aumentaron con la edad: Gro- $\alpha$  (Adultas: Ctl:  $p=0.019$ ; SFN:  $p=0.014$ . Viejas: Ctl:  $p=0.025$ ; SFN:  $p=0.038$ ), IP-10 (Adultas: Ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ . Viejas: ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ) y MCP-3 (Adultas: Ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ . Viejas: ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ). Los niveles no variaron con el tratamiento con SFN.
- MIP-1 $\alpha$ . Esta quimiocina mostró niveles mayores en los grupos de hembras adultas (ctl:  $p=0.001$ ; SFN:  $p=0.008$ ) y en los grupos de hembras viejas (ctl:  $p=0.007$ ; SFN:  $p=0.006$ ), aun cuando fueron tratadas con SFN. Cabe resaltar que, las ratas adultas control obtuvieron los valores más altos, incluso cuando se comparó con las hembras viejas (ctl:  $p=0.008$ ; SFN:  $p=0.009$ ). Sin embargo, el tratamiento con SFN en las ratas adultas disminuyó de manera significativa los niveles de MIP-1 $\alpha$  ( $p=0.008$ ). Si bien no bajaron hasta los niveles observados en las ratas jóvenes, si se obtuvieron valores parecidos a los de las hembras viejas.
- RANTES. Al igual que en la Cx, los niveles alcanzados por esta quimiocina fueron los más altos de todas las evaluadas en el Hc. Los niveles de RANTES aumentaron en las hembras adultas (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ) y en las hembras viejas (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ). Así mismo se observaron los niveles más altos en el grupo no tratado de hembras adultas, en comparación con los grupos de hembras viejas, sin importar si fueron o no tratadas con SFN (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ). A pesar de eso, el tratamiento con SFN en las ratas adultas previno el incremento de RANTES en comparación con el grupo no tratado de la misma edad

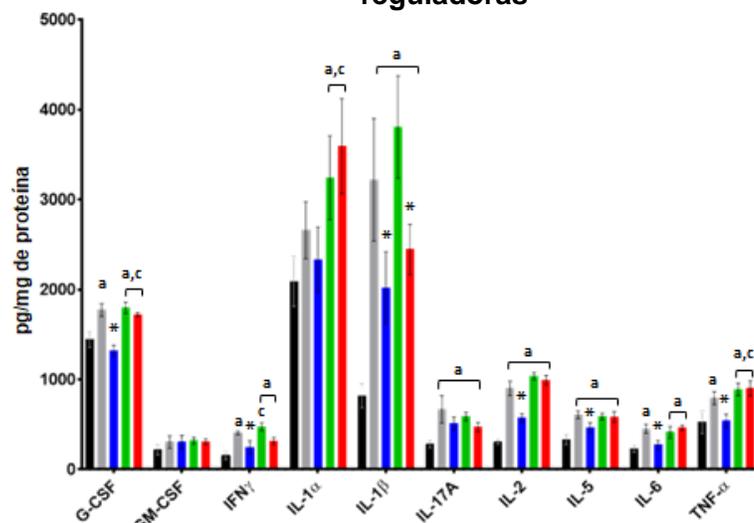
( $p \leq 0.001$ ). Para las ratas viejas, el tratamiento con SFN incrementó los niveles de RANTES en comparación con las hembras no tratadas ( $p \leq 0.001$ ).

En cuanto al panel de citocinas antiinflamatorias (Fig.21C) se observó lo siguiente:

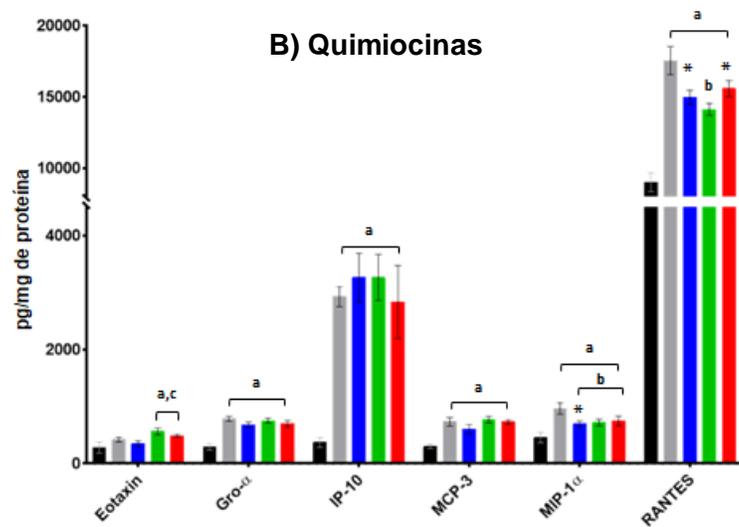
- IL-10. Esta interleucina disminuyó con la edad. Los niveles de IL-10 en las hembras adultas no tratadas ( $p \leq 0.001$ ) y en ambos grupos de hembras viejas (ctl:  $p \leq 0.001$ ; SFN:  $p \leq 0.001$ ) fueron significativamente menores que los encontrados en el grupo de hembras jóvenes. El tratamiento con SFN incrementó los niveles de IL-10 en las ratas adultas en comparación las no tratadas de la misma edad ( $p \leq 0.001$ ). No se encontraron diferencias entre los grupos de ratas adultas no tratadas y los grupos de ratas viejas.
- IL-12p70 presentó un incremento con la edad sin importar el tratamiento, ya que los niveles de IL-12p70 en las hembras adultas (ctl:  $p \leq 0.001$ ; SFN:  $p = 0.016$ ) y en las hembras viejas (ctl:  $p \leq 0.001$ ; SFN:  $p \leq 0.001$ ) fueron estadísticamente superiores que los determinados en el grupo de hembras jóvenes. No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con SFN y sus grupos controles de la misma edad.
- IL-13. No se observaron efectos del tratamiento con SFN sobre el IL-13. Sólo se identificaron niveles significativamente más altos en ambos grupos de hembras adultas (ctl:  $p = 0.048$ ; SFN:  $p = 0.046$ ) en comparación con el grupo de hembras viejas no tratadas.

## Hembras Hc

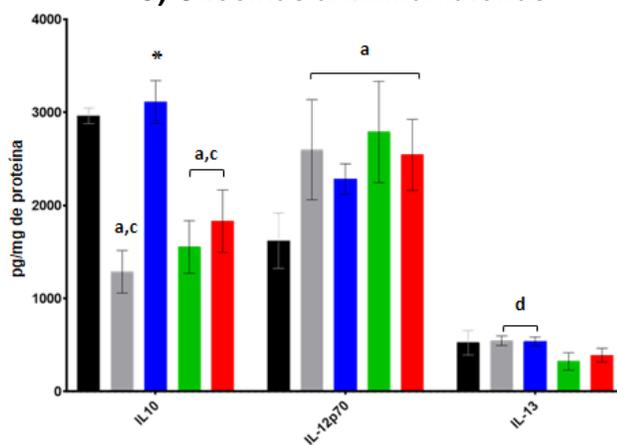
### A) Citocinas proinflamatorias y reguladoras



### B) Quimiocinas



### C) Citocinas antiinflamatorias



**Fig.21** Análisis de citocinas y quimiocinas en el Hc de las hembras. **A)** Panel de citocinas proinflamatorias y reguladoras del Hc de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **B)** Panel de quimiocinas de la Cx de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **C)** Panel de citocinas antiinflamatorias de la Cx de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: **(a)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven **(b)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl **(c)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN **(d)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl **(e)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and **(\*)**  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

En resumen, tanto en Cx como en Hc los niveles de citocinas y quimiocinas incrementan con la edad y en general, en los grupos de hembras adultas tratadas con SFN los niveles de la mayor parte de éstas disminuyeron significativamente. En el caso de las citocinas antiinflamatorias no se encontraron cambios significativos, más que en la IL-10, la cual disminuyó con la edad, pero el tratamiento con SFN la incrementó a niveles similares a los encontrados en los grupos jóvenes.

En general se presentaron niveles más altos en la mayoría de las citocinas y quimiocinas en el grupo de hembras adultas no tratado en comparación con el grupo de hembras jóvenes (Fig.24A) y el tratamiento con SFN logró disminuirlos de manera estadísticamente significativa. Se encontró un aumento mayor de las citocinas y quimiocinas en el Hc de los grupos de hembras adultas y de hembras viejas que en la Cx, región en la que los cambios fueron menores. En cuanto a los grupos de hembras viejas no se encontraron cambios significativos en la mayoría de las citocinas o quimiocinas. El perfil en estos últimos fue similar entre sí, demostrando que en hembras el tratamiento con SFN administrado de los 18 a los 21 meses no tiene un efecto antiinflamatorio, mientras que en el grupo adulto el SFN sí es capaz

de reducir los niveles de la mayoría de las citocinas y quimiocinas evaluadas e incluso de incrementar algunas citocinas antiinflamatorias.

### **6.2.6.3 Perfil inflamatorio la corteza cerebral en ratas**

#### **Wistar machos**

En panel de citocinas proinflamatorias y reguladoras (Fig.22A) no se encontraron tantas variaciones en ratas Wistar machos ni con la edad, ni con el tratamiento como las que se encontraron en la misma región cerebral de las ratas hembras.

- G-CSF, IFN $\gamma$ , IL-17A, IL-2, IL-5 e IL-6. No mostraron ningún cambio en los niveles en relación con la edad, ni con el tratamiento con SFN.
- GM-CSF. Solamente se observaron cambios en esta citocina en el grupo de machos adultos tratados con SFN, en donde hubo una disminución en comparación con el grupo de machos no tratados de la misma edad ( $p=0.043$ ). No se observaron cambios entre los niveles de GM-CSF en los grupos de machos viejos, ni un incremento con la edad con respecto al grupo de machos jóvenes.
- IL-1 $\alpha$ . Presentó un aumento asociado a la edad en los machos adultos no tratado ( $p\leq 0.001$ ) en comparación con el grupo de machos jóvenes. No se encontraron diferencias entre el grupo control de machos viejos y el grupo de machos jóvenes, ni tampoco con el grupo control de machos adultos. De manera interesante, se observaron valores significativamente menores en los grupos de machos adultos ( $p\leq 0.001$ ) y viejos ( $p\leq 0.001$ ) tratados con SFN en comparación con sus grupos controles de la misma edad, llegando a niveles similares a los hallados en

el grupo joven. Aunque los niveles de IL-1 $\alpha$  en el grupo de individuos viejos tratados con SFN también fueron significativamente menores que los encontrados en el grupo de individuos adultos no tratados ( $p \leq 0.001$ ).

- IL-1 $\beta$ . Respecto a esta citocina se observó una disminución en el grupo de machos adultos no tratados con respecto al grupo de machos jóvenes ( $p=0.024$ ). A pesar de eso, el tratamiento con SFN redujo aún más los niveles de IL-1 $\beta$  en relación a los de los animales del grupo control de la misma edad ( $p=0.048$ ), alcanzando, en promedio, un 50% de los niveles observados en el grupo de los animales jóvenes ( $p=0.002$ ). Los machos viejos sin tratamiento mostraron niveles más altos de IL-1 $\beta$  en comparación al grupo de machos jóvenes ( $p=0.044$ ), machos adultos sin tratamiento ( $p=0.006$ ) y adultos tratado con SFN ( $p \leq 0.001$ ). No se observaron efectos del tratamiento con SFN en el grupo de machos viejos.

- TNF- $\alpha$  no presentó diferencias en los niveles observados en el grupo de machos jóvenes, machos adultos control, machos viejos control ni machos viejos tratados con SFN. Sin embargo, los niveles de TNF- $\alpha$  fueron menores en el grupo de machos adultos tratados con SFN en comparación al grupo de animales no tratados de la misma edad ( $p=0.015$ ) y al grupo de machos viejos no tratados ( $p=0.019$ ).

El tratamiento con SFN prácticamente no tuvo efecto sobre los niveles de las quimiocinas evaluadas (Fig.22B).

\* Eotaxina, Gro- $\alpha$ , IP-10 y MIP-1 $\alpha$ . No variaron sus niveles con la edad ni con el tratamiento con SFN.

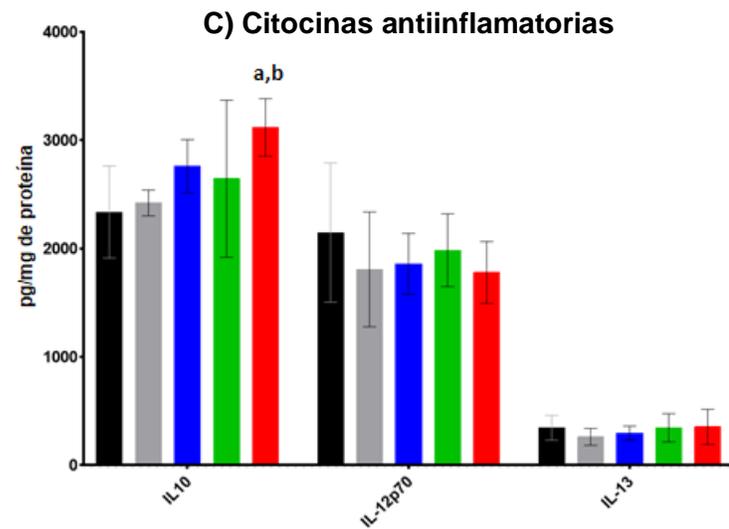
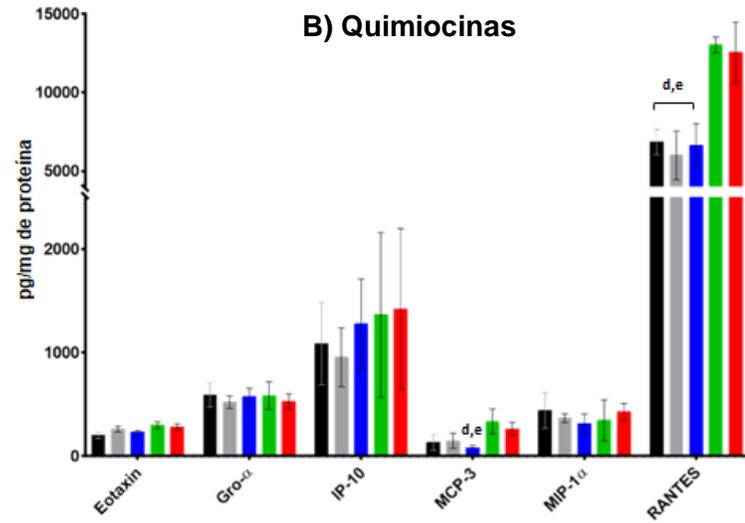
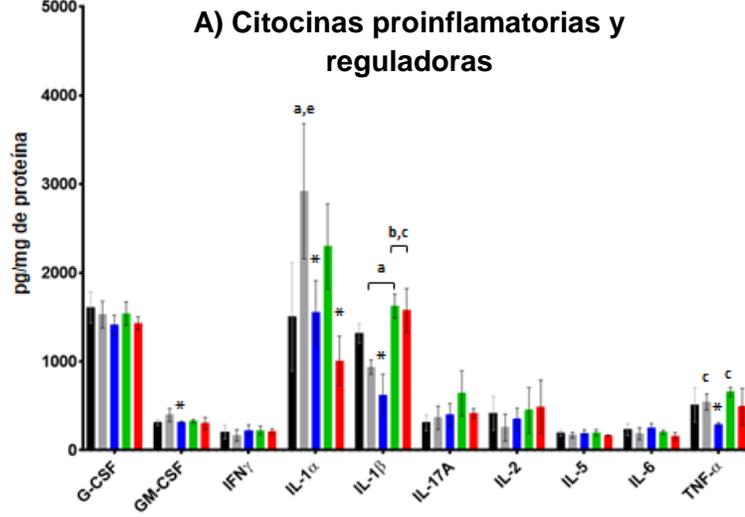
MCP-3. Presentó niveles significativamente menores en el grupo de machos adultos tratados con SFN al compararse con el grupo de machos viejos control ( $p=0.034$ ) y el grupo de viejos tratados con SFN ( $p=0.035$ ). A pesar de ello, no se observaron diferencias significativas entre el grupo de machos adultos tratados con SFN y el grupo de machos control de la misma edad o el grupo de animales jóvenes.

De igual manera, al evaluar el panel de interleucinas antiinflamatorias no se encontraron cambios significativos con el tratamiento con SFN (Fig.22C).

- IL-12p70 e IL-13. No mostraron cambios en sus niveles por el tratamiento con SFN, ni con relación a la edad.
- IL-10. No se modificó con el tratamiento con SFN, ni en los grupos de machos adultos ni en los grupos de machos viejos. Pero si se observaron niveles mayores de IL-10 en el grupo de machos viejos tratados con SFN en comparación con el grupo de machos jóvenes ( $p=0.049$ ) y con el grupo de machos adultos no tratados ( $p=0.015$ ).

El perfil completo de citocinas y quimiocinas indica que en la Cx de las ratas macho los perfiles fueron muy similares entre los grupos, salvo las excepciones mencionadas en los párrafos anteriores (Fig.24A).

**Machos Cx**



**Fig.22** Análisis de citocinas y quimiocinas en la Cx de los machos. **A)** Panel de citocinas proinflamatorias y reguladoras de la Cx de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **B)** Panel de quimiocinas de la Cx de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **C)** Panel de citocinas antiinflamatorias de la Cx de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

#### 6.2.6.4 Perfil inflamatorio en el hipocampo en ratas Wistar machos

En el Hc de los machos se observa que el panel de citocinas proinflamatorias y reguladoras, a diferencia de lo observado en la Cx, sí se vio afectado tanto por la edad como por el tratamiento con SFN (Fig.23A).

- G-CSF. Esta quimiocina aumentó con la edad, ya que los niveles de los grupos de machos adultos no tratados ( $p=0.048$ ), machos viejos no tratados ( $p=0.046$ ) y machos viejos tratados con SFN ( $p=0.042$ ) fueron significativamente más altos en comparación con los del grupo de machos jóvenes. El tratamiento con SFN previno el incremento en los niveles de G-CSF asociado a la edad en el grupo de machos adultos en comparación con su grupo control ( $p=0.038$ ). Los niveles de G-CSF en el grupo de machos adultos tratados con SFN fueron similares a los encontrados en el grupo de machos jóvenes, por lo que también fue significativamente menor en comparación con ambos grupos de animales viejos (ctl:  $p=0.043$ ; SFN:  $p=0.048$ ).

- G-CSF. No presentó diferencias significativas en sus niveles en relación con la edad ni con el tratamiento con SFN.
- IFN $\gamma$ . Mostró un incremento con la edad ya que se observaron niveles significativamente mayores en el grupo de machos adultos no tratados ( $p=0.035$ ). El tratamiento con SFN redujo los niveles de IFN $\gamma$  en el grupo adulto en comparación con el grupo control ( $p=0.049$ ). Los niveles del grupo viejo sin tratamiento también fueron significativamente menores ( $p=0.014$ ). El tratamiento con SFN también redujo significativamente los niveles de IFN $\gamma$  en el grupo de machos viejos en comparación con su grupo control ( $p=0.014$ ).
- IL-1 $\alpha$ . Respecto a esta citocina no se encontraron variaciones en sus niveles entre el grupo de machos jóvenes, el grupo de machos adultos tratados con SFN, el grupo de machos viejos control y el grupo de machos viejos tratados con SFN. El grupo de machos adultos no tratados tuvo los niveles más altos de IL-1 $\alpha$  en comparación con todos los demás grupos (joven:  $p\leq 0.001$ ; adulto SFN:  $p\leq 0.001$ ; viejo ctl:  $p\leq 0.001$ ; viejo SFN:  $p\leq 0.001$ ).
- IL-1 $\beta$ . Incrementó sus niveles con la edad, ya que fueron significativamente mayores en el grupo control de machos adultos ( $p\leq 0.001$ ) en comparación con el grupo de machos jóvenes. Los niveles de IL-1 $\beta$  fueron significativamente mayores en el grupo control de machos viejos en comparación con el grupo joven ( $p\leq 0.001$ ) y el grupo adulto control ( $p\leq 0.001$ ). El tratamiento con SFN fue capaz de prevenir el incremento de los niveles de IL-1 $\beta$  en el grupo de machos adultos ( $p=0.004$ ), llegando a niveles parecidos a los que se observaron en el grupo de machos

jóvenes. No hubo diferencias entre el grupo de machos viejos tratado con SFN con el grupo control.

- IL-17A. No se encontraron diferencias con la edad o el tratamiento con SFN. Se observaron niveles mayores en los machos viejos tratados con SFN comparado con el grupo joven ( $p=0.048$ ).
- IL-2. No presentó efecto alguno del tratamiento con SFN en los grupos de machos adultos o en los grupos de animales viejos. Sin embargo, se encontró un incremento gradual con la edad, ya que los niveles en los grupos de machos adultos fueron significativamente más altos (ctl:  $p=0.038$ ; SFN:  $p=0.045$ ) en comparación con los del grupo de machos jóvenes. Los niveles de IL-2 fueron significativamente más altos en los grupos de machos viejos en comparación con los niveles del grupo de machos jóvenes (ctl:  $p=0.001$ ; SFN:  $p=0.006$ ), machos adultos sin tratamiento (ctl:  $p=0.006$ ; SFN:  $p=0.007$ ) y machos adultos tratado con SFN (ctl:  $p=0.005$ ; SFN:  $p=0.008$ ).
- IL-5. Esta interleucina aumentó con la edad en ambos grupos de machos adultos (ctl:  $p=0.013$ ; SFN:  $p=0.014$ ) y machos viejos (ctl:  $p=0.005$ ; SFN:  $p=0.006$ ) en relación con los del grupo de machos jóvenes. El tratamiento con SFN redujo los niveles de IL-5 en el grupo de animales adultos en comparación con los de los animales del grupo no tratado de la misma edad ( $p=0.049$ ). Los niveles de IL-5 en grupos de machos viejos fueron significativamente mayores que los del grupo de machos adultos tratados con SFN (ctl:  $p=0.005$ ; SFN:  $p=0.006$ ).

- IL-6. Se observó un incremento con la edad; los niveles en el grupo de machos adultos control ( $p=0.038$ ), el de machos viejos control ( $p=0.028$ ) y en los viejos tratados con SFN ( $p=0.031$ ). El tratamiento con SFN redujo los niveles de IL-6 en el grupo de adultos en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p=0.047$ ).
- TNF- $\alpha$ . No presentó diferencias en sus niveles entre el grupo de machos jóvenes y el grupo de adultos no tratados. El tratamiento con SFN en los grupos de machos adultos disminuyó los niveles de TNF- $\alpha$  en comparación con el grupo no tratado de la misma edad ( $p=0.003$ ), incluso llegando a niveles inferiores a los encontrados en el grupo de animales jóvenes ( $p=0.040$ ). El grupo de machos adultos tratados con SFN también tuvo niveles menores de TNF- $\alpha$  que los hallados en el grupo de machos viejos control ( $p=0.004$ ) y el grupo viejo tratado con SFN ( $p=0.017$ ). No hubo diferencias significativas entre el grupo de animales viejos tratados y el grupo control de la misma edad.

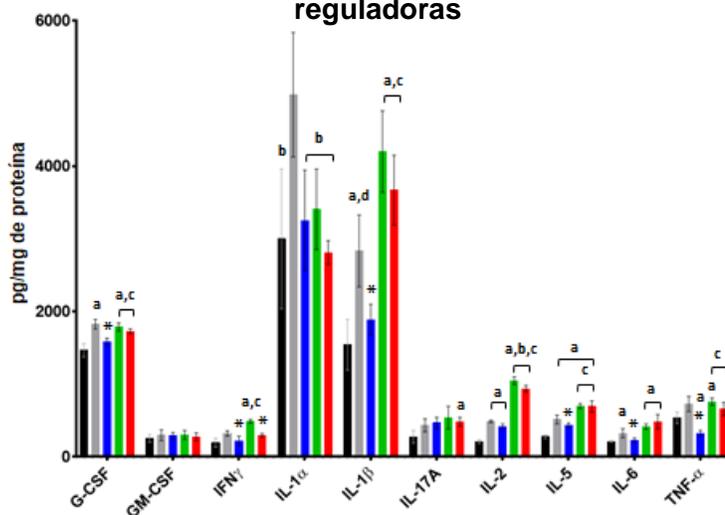
En el panel de quimiocinas evaluadas también se observaron incrementos asociados a la edad. En este caso no se observaron variaciones en los niveles de las quimiocinas evaluadas con el tratamiento con SFN (Fig.23B).

- Eotaxina. Presentó un incremento con la edad, alcanzando valores más altos en los grupos control de machos adultos ( $p=0.041$ ) y viejos ( $p=0.048$ ). No hubo diferencias entre los grupos de machos adultos y viejos tratados con SFN. El grupo control de machos viejos control obtuvo niveles mayores de eotaxina en comparación con el grupo de machos adultos tratados con SFN ( $p=0.042$ ).

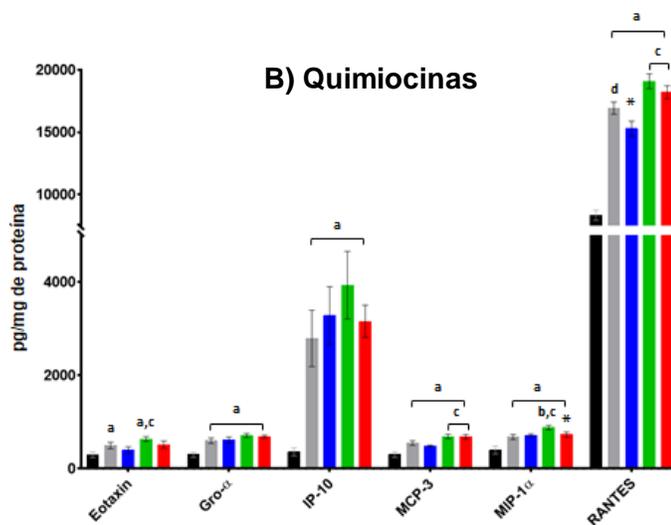
- Gro- $\alpha$  e IP-10. Incrementaron con la edad al compararlos con el grupo de animales jóvenes: Gro- $\alpha$  (adultos: ctl:  $p=0.038$ ; SFN:  $p=0.033$ ; viejos ctl:  $p=0.038$ ; SFN:  $p=0.036$ ) e IP-10 (adultos: ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ; viejos ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ) incrementaron con la edad al compararlos con el grupo joven. No se encontraron diferencias con el tratamiento con SFN en ninguno de los grupos.
- MCP-3. Incrementó con la edad, mostrando niveles superiores en el los grupos de machos adultos (ctl:  $p=0.016$ ; SFN:  $p=0.031$ ) y en los grupos viejos (ctl:  $p=0.043$ ; SFN:  $p=0.045$ ). Ambos grupos de machos viejos obtuvieron niveles estadísticamente mayores que en el grupo adulto tratado con SFN (ctl:  $p=0.013$ ; SFN:  $p=0.024$ ).
- MIP-1 $\alpha$ . Incrementa con la edad. Los grupos adultos (ctl:  $p=0.022$ ; SFN:  $p=0.031$ ) y viejos (ctl:  $p=0.020$ ; SFN:  $p=0.038$ ) obtuvieron niveles significativamente mayores que los encontrados en el grupo joven. En el grupo de machos viejos control también se hallaron niveles más altos de MIP-1 $\alpha$  que los observados en el grupo adulto control ( $p=0.022$ ) y en el grupo adulto tratado con SFN ( $p=0.035$ ). El tratamiento con SFN en el grupo viejo redujo los niveles de MIP-1 $\alpha$  en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p=0.013$ ).

**Machos Hc**

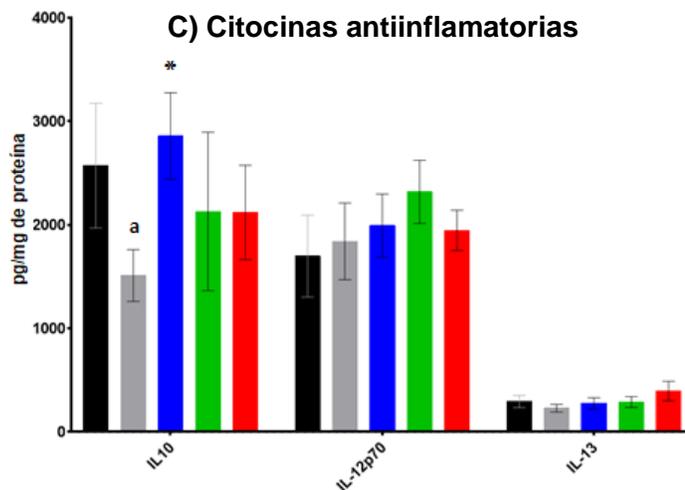
**A) Citocinas proinflamatorias y reguladoras**



**B) Quimiocinas**



**C) Citocinas antiinflamatorias**



**Fig.22** Análisis de citocinas y quimiocinas en el Hc de los machos. **A)** Panel de citocinas proinflamatorias y reguladoras del Hc de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **B)** Panel de quimiocinas del Hc de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **C)** Panel de citocinas antiinflamatorias del Hc de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: **(a)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven **(b)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl **(c)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN **(d)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl **(e)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

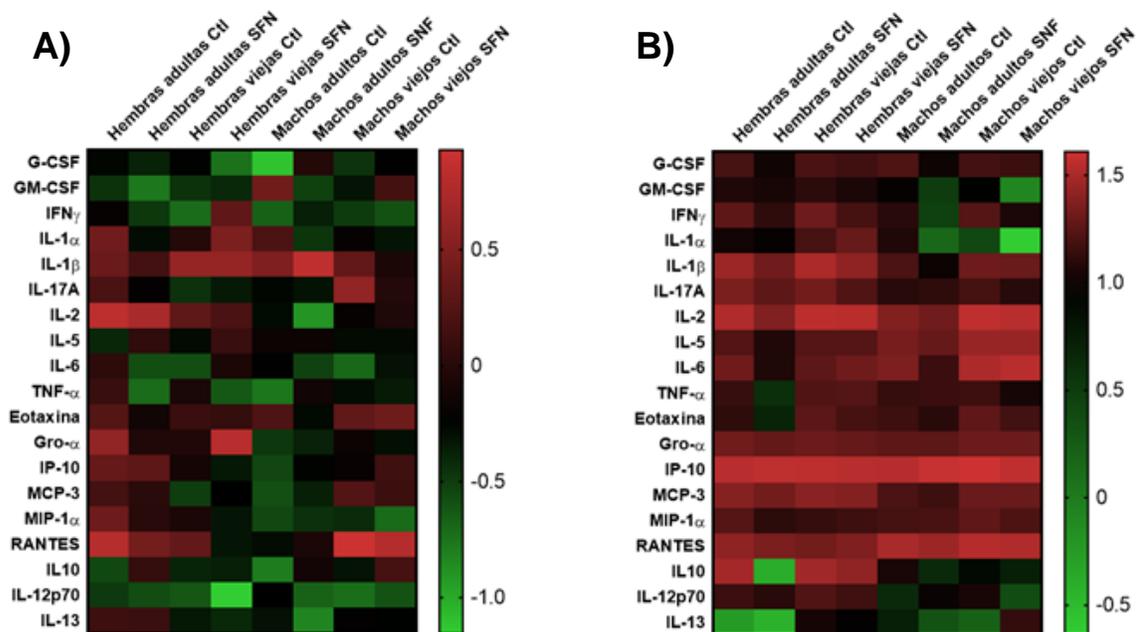
- **RANTES.** Presentó los niveles más altos de todas las quimiocinas evaluadas e incrementaron en ambos grupos de machos adultos (ctl:  $p \leq 0.001$ ; SFN:  $p \leq 0.001$ ) y machos viejos (ctl:  $p \leq 0.001$ ; SFN:  $p \leq 0.001$ ). Se encontró un aumento en el grupo de machos viejos no tratados en comparación con ambos grupos de animales adultos (ctl:  $p \leq 0.001$ ; SFN:  $p \leq 0.001$ ). El tratamiento con SFN del grupo de machos adultos redujo los niveles de RANTES en comparación con el grupo control de machos adultos ( $p \leq 0.001$ ). No se encontraron diferencias entre el grupo de animales viejos tratados con SFN y el grupo control de animales viejo.

En cuanto al panel de citocinas antiinflamatorias se encontraron pocas modificaciones con el tratamiento con SFN o en relación con la edad (Fig.23C).

- **IL-12p70 e IL-13.** Estas interleucinas no mostraron cambios con el tratamiento con SFN ni con la edad.
- **IL-10.** No se encontraron diferencias significativas en sus niveles entre el grupo de machos jóvenes, el grupo de machos adultos tratado con SFN, y ambos grupos de machos viejos. Los niveles de IL-10 en el grupo de machos adultos no tratados fueron significativamente menores en comparación con el grupo de machos jóvenes ( $p = 0.004$ ). El tratamiento con SFN incrementó los niveles de IL-10 en

comparación con los del grupo control de la misma edad ( $p \leq 0.001$ ), llevándolo a niveles similares a los encontrados en el grupo de machos jóvenes.

Los perfiles de citocinas y quimiocinas en el Hc de los machos fueron similares entre el grupo de animales adultos no tratados y los grupos de animales viejos con y sin tratamiento, mientras que el perfil del grupo adulto de machos tratados con SFN fue más parecido al encontrado en el grupo de machos jóvenes (Fig.24B).



**Fig.24** Análisis del perfil completo de citocinas y quimiocinas en la Cx e Hc de hembras y machos. Los valores obtenidos de las gráficas anteriores fueron normalizados con respecto al grupo joven ( $=1$ ) de cada sexo y región del cerebro. **A)** Perfil de citocinas y quimiocinas de la Cx de hembras y machos adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **B)** Perfil de citocinas y quimiocinas del Hc de hembras y machos adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. Cada bloque individual del heatmap representa la media del grupo. Adultos Ctl:  $n=5$ ; Adultos SFN:  $n=5$ ; Viejos Ctl:  $n=3$ ; Viejos SFN:  $n=3$ .

## **6.2.7 Efecto del SFN sobre la senescencia y la inflamación en el sistema nervioso central**

Se evaluaron los niveles relativos de cinco diferentes marcadores de senescencia ( $\gamma$ H2AX, Lámina B1, GLB1, p21 y p38) tanto en Cx como en el Hc de ratas de ambos sexos, jóvenes, adultas y viejas, tratadas con SFN y no tratadas, para determinar la presencia de células senescentes en las regiones de interés. Se evaluó la actividad de la enzima beta-galactosidasa con el X-gal para confirmar histológicamente la presencia de células senescentes en los tejidos.

### **6.2.7.1 Efecto del SFN sobre los marcadores de senescencia en la corteza cerebral y el hipocampo en hembras**

En la Cx (Fig.25A-C) se observó un incremento relacionado con la edad de todos los marcadores evaluados. En el caso de las hembras adultas no tratadas se identificó un incremento significativo en  $\gamma$ H2AX ( $p=0.011$ ), GLB1, ( $p=0.003$ ), p38 ( $p=0.035$ ) y p21 ( $p\leq 0.001$ ) con respecto a las hembras control. Los niveles de los marcadores de senescencia en la Cx del grupo de hembras viejas no tratadas también fueron mayores comparados con los del grupo de hembras jóvenes ( $\gamma$ H2AX:  $p=0.017$ , GLB1:  $p\leq 0.001$ , p38:  $p=0.039$ , y p21:  $p\leq 0.001$ ). Con respecto a los tratamientos con SFN, se observaron niveles significativamente menores de  $\gamma$ H2AX ( $p\leq 0.001$ ), GLB1, ( $p\leq 0.001$ ) y p21 ( $p=0.027$ ) en el grupo de hembras adultas tratadas con SFN en comparación con el grupo no tratado de la misma edad, mientras que no se encontró ningún efecto significativo en los niveles de p38. En cuanto a los grupos de hembras

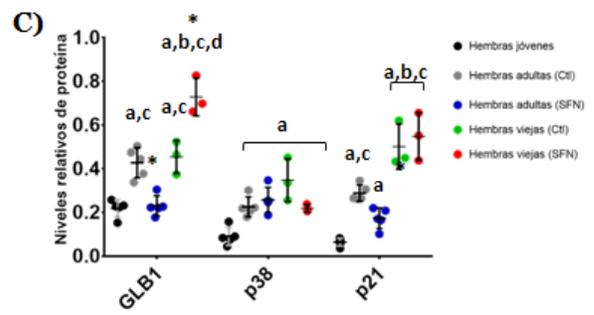
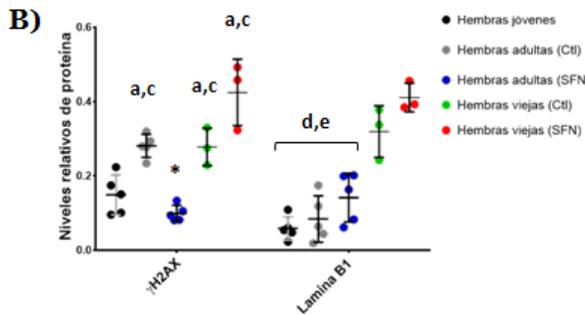
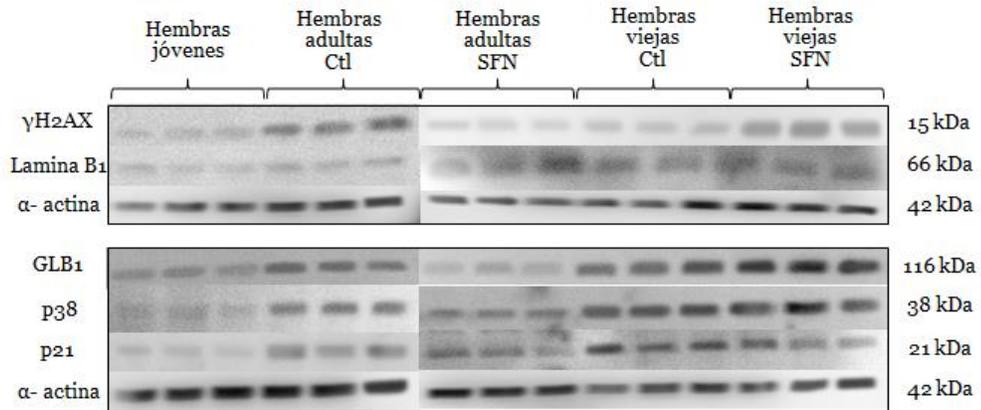
viejas, los efectos del tratamiento con SFN fueron variados. En las hembras viejas tratadas con SFN se encontraron niveles más altos de  $\gamma$ H2AX ( $p=0.025$ ) y GLB1 ( $p\leq 0.001$ ) en comparación con el grupo control de la misma edad. Los marcadores p38 y p21 no presentaron diferencias significativas.

El marcador lamina B1 no presentó alteraciones relacionadas con los tratamientos con SFN en ninguno de los grupos. Sin embargo, se encontró un incremento en los niveles de lamina B1 en los grupos de hembras viejas en comparación con los niveles del grupo de hembras jóvenes y los grupos de hembras adultas.

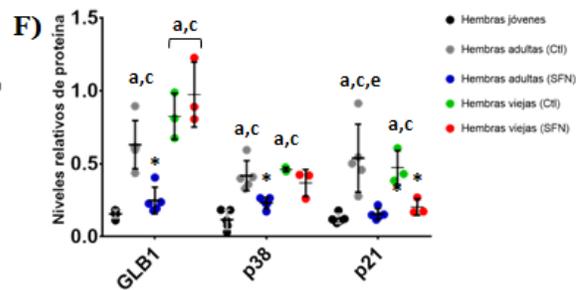
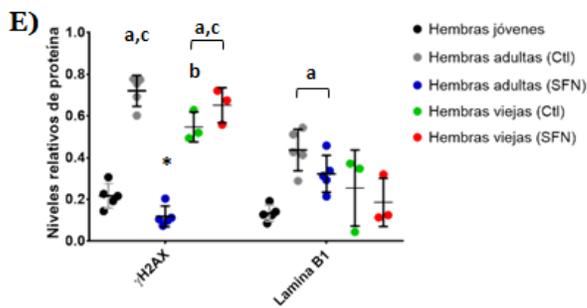
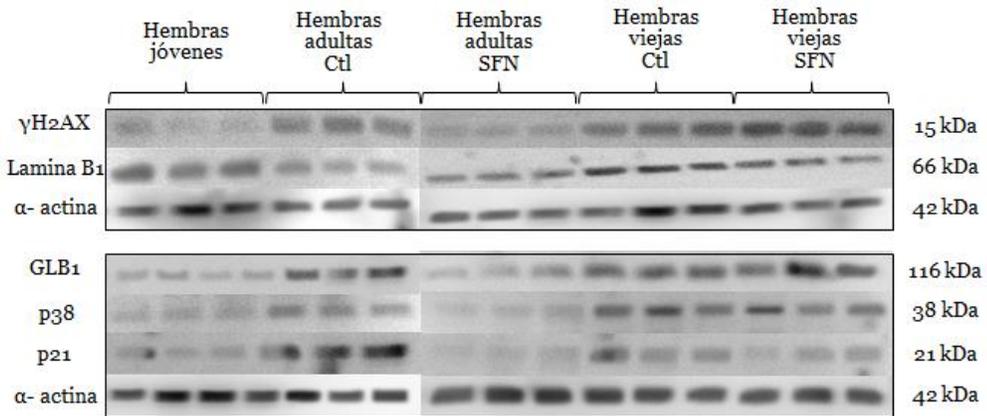
En cuanto al Hc (Fig. 25D-F), los marcadores  $\gamma$ H2AX (Adultas Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Viejas ctl:  $p\leq 0.001$ ; Viejas SFN:  $p\leq 0.001$ ), GLB1 (Adultas Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Viejas Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Viejas SFN:  $p\leq 0.001$ ), p38 (Adultas Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Viejas Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Viejas SFN:  $p=0.001$ ) y p21 (Adultas Ctl:  $p=0.001$ ; Viejos Ctl:  $p=0.014$ ) aumentaron con la edad al compararlos con el grupo de animales jóvenes. Interesantemente, los grupos de ratas adultas tratadas con SFN obtuvieron niveles similares a los encontrados en el grupo de animales jóvenes, y fueron todos significativamente menores en comparación con el grupo de animales no tratados de la misma edad ( $\gamma$ H2AX:  $p=0.017$ , GLB1:  $p\leq 0.001$ , p38:  $p=0.039$ , y p21:  $p\leq 0.001$ ).

La lamina B1 en Hc mostró un comportamiento distinto a lo observado en la Cx, ya que se identificó un aumento en los grupos de hembras adultas (adultas ctl:  $p=0.002$ ; adultas SFN:  $p=0.048$ ), sin importar si fueron o no tratadas con SFN, mientras que los grupos de hembras viejas tuvieron niveles similares a los encontrados en las hembras jóvenes.

### A) Hembras Cx



### D) Hembras Hc



**Fig.25** Marcadores de senescencia en Cx e Hc de hembras. **A)** Western blots representativos de  $\gamma$ H2AX, LaminaB1, GLB1, p38 y p21 en Cx de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **B y C)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en la Cx normalizadas contra actina. **D)** Western blots representativos de  $\gamma$ H2AX, LaminaB1, GLB1, p38 y p21 en Hc de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **E y F)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el Hc normalizadas contra actina. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: **(a)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven **(b)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl **(c)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN **(d)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl **(e)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

#### **6.2.7.2 Efectos del SFN sobre los marcadores de senescencia en la corteza cerebral y el hipocampo en machos**

En los machos se encontraron similitudes en el comportamiento de los datos en comparación con los obtenidos en las hembras. En el caso de la Cx (Fig. 26A-26C) se observó un incremento asociado a la edad en los niveles de los marcadores de senescencia  $\gamma$ H2AX (adultos ctl:  $p \leq 0.001$ ; viejos ctl:  $p = 0.008$ ; viejos SFN:  $p \leq 0.001$ ), GLB1 (adultos ctl:  $p \leq 0.001$ ; viejos ctl:  $p \leq 0.001$ ; viejos SFN:  $p \leq 0.001$ ), p38 (viejos ctl:  $p = 0.010$ ; viejos SFN:  $p = 0.025$ ) y p21 (adultos ctl:  $p = 0.002$ ; viejos ctl:  $p = 0.005$ ; viejos SFN:  $p = 0.003$ ). Es de resaltarse que el tratamiento con SFN disminuyó los niveles de los marcadores de senescencia  $\gamma$ H2AX ( $p = 0.001$ ), GLB1 ( $p = 0.003$ ) y p21 ( $p \leq 0.001$ ) en los grupos de machos adultos.

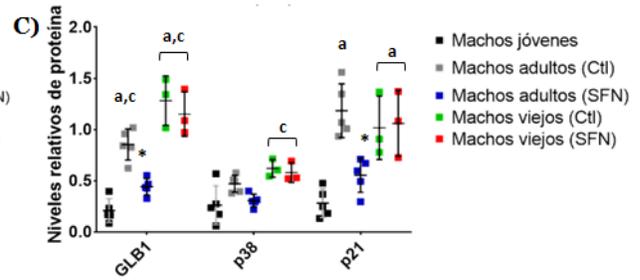
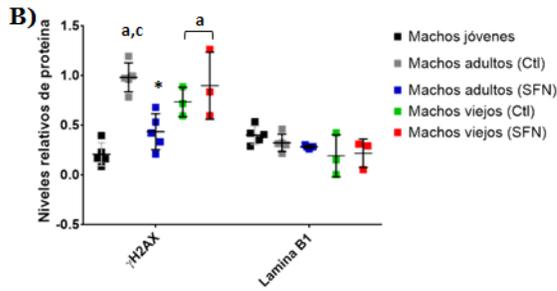
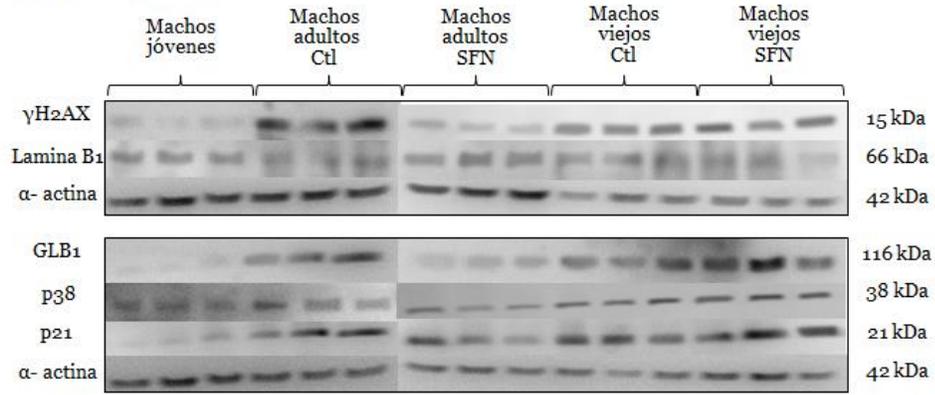
Por otra parte, no se encontraron cambios significativos en la lamina B1 en la Cx relacionada con la edad, ni con el tratamiento con SFN. Mientras que en p38 se

observaron niveles mayores en los grupos control de animales viejos ( $p=0.025$ ) y animales viejos SFN ( $p=0.043$ ) en comparación con el grupo de ratas adultas tratadas con SFN.

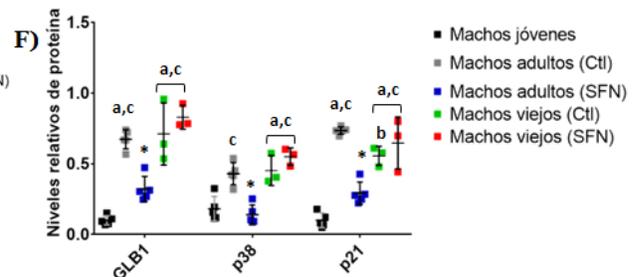
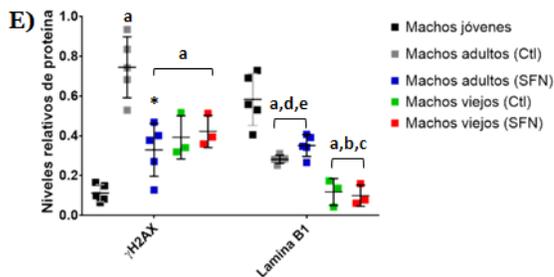
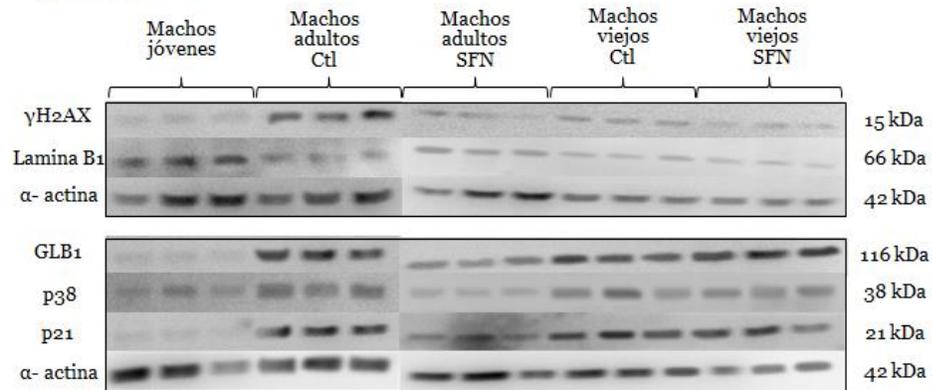
En el Hc (Fig. 26D-F) los marcadores de senescencia también se incrementaron con la edad en comparación con lo observado en el grupo de animales jóvenes:  $\gamma$ H2AX (Adultos Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Adultos SFN:  $p=0.033$ ; Viejos Ctl:  $p=0.019$ ; Viejos SFN:  $p=0.011$ ), GLB1 (Adultos Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Adultos SFN:  $p=0.013$ ; Viejos Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Viejos SFN:  $p\leq 0.001$ ), p38 (Adultos Ctl:  $p=0.001$ ; Viejos Ctl:  $p=0.001$ ; Viejos SFN:  $p\leq 0.001$ ) y p21 (Adultos Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Adultos SFN:  $p=0.010$ ; Viejos Ctl:  $p\leq 0.001$ ; Viejos SFN:  $p\leq 0.001$ ). En cuanto al efecto del tratamiento con SFN, se observaron niveles significativamente menores en los marcadores  $\gamma$ H2AX ( $p\leq 0.001$ ), GLB1 ( $p\leq 0.001$ ), p38 ( $p\leq 0.001$ ) y p21 ( $p\leq 0.001$ ) en los grupos de machos adultos tratados al compararlos con los animales adultos no tratados de la misma edad.

No se encontraron efectos del tratamiento con SFN sobre la lamina B1 en el Hc, pero sí se observó una disminución del mismo en los grupos de animales adultos (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p=0.001$ ) y animales viejos (ctl:  $p\leq 0.001$ ; SFN:  $p\leq 0.001$ ) con respecto al grupo de ratas jóvenes.

### A) Machos Cx



### D) Machos Hc

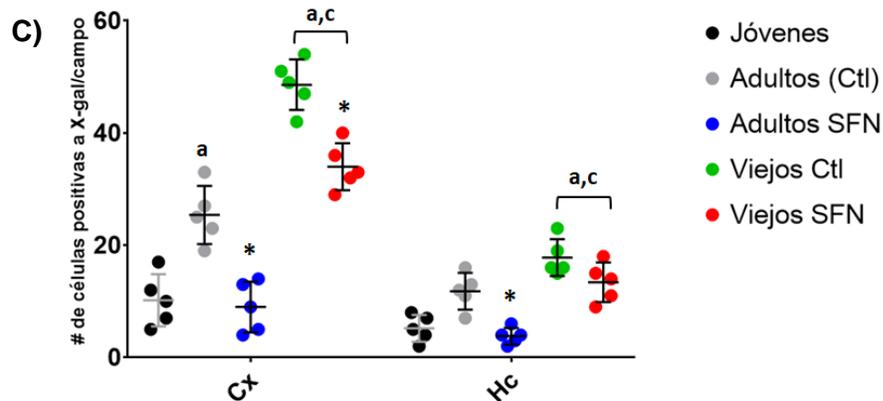
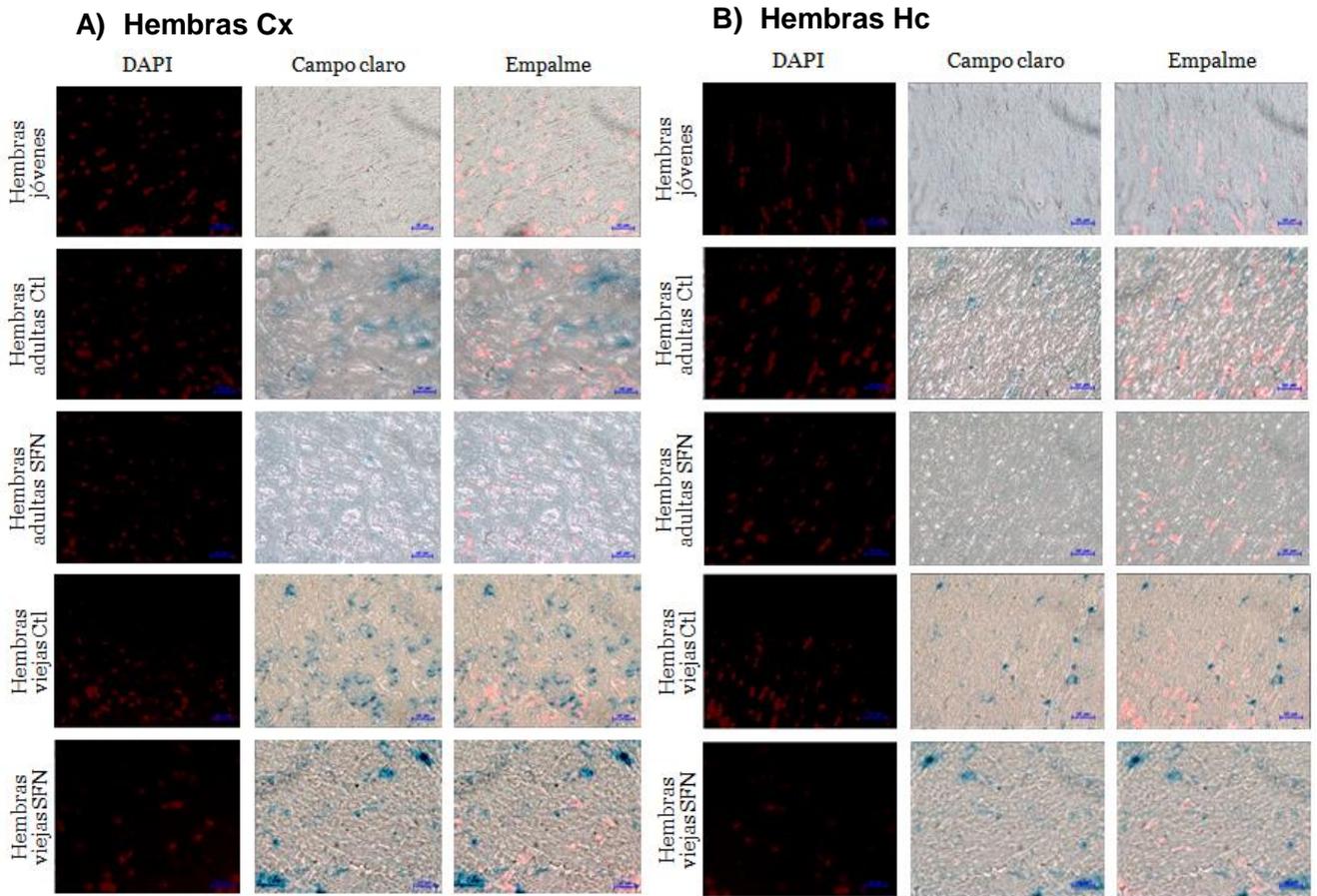


**Fig.16** Marcadores de senescencia en Cx e Hc de machos. **A)** Western blots representativos de  $\gamma$ H2AX, LaminaB1, GLB1, p38 y p21 en Cx de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **B y C)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en la Cx normalizadas contra actina. **D)** Western blots representativos de  $\gamma$ H2AX, LaminaB1, GLB1, p38 y p21 en Hc de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **E y F)** Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el Hc normalizadas contra actina. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: **(a)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven **(b)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl **(c)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN **(d)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl **(e)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

### **6.2.7.3 Presencia de células senescentes en la corteza cerebral e hipocampo de machos y hembras.**

Para verificar si el aumento de los marcadores de senescencia correspondía también con el incremento de la presencia de células senescentes en las regiones cerebrales estudiadas, se emplearon cortes histológicos a los que se realizó el ensayo de X-gal, con el cual se tiñe de azul el citoplasma de las células debido a la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, uno de los marcadores característicos del fenotipo senescente (Fig.27).

Es de resaltarse que las células positivas a X-gal en la Cx e Hc de los grupos de animales adultos, tanto de hembras como de machos, se encontraron distribuidas en el tejido de manera individual, mientras que en los grupos de animales viejos se encontraron agrupadas en “clusters” en ambas regiones cerebrales evaluadas (Figs.27 y 28).



**Fig.27** Células positivas a X-gal en Cx e Hc de hembras. Las células coloreadas de color azul se contaron como positivas a X-gal siempre que colocalizaran con un núcleo **A)** Micrografías representativas de la Cx de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **B)** Micrografías representativas del Hc de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **C)** Cuantificación de las células positivas a X-gal por campo. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: (a)  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven (b)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl (c)  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN (d)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl (e)  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and (\*)  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad.

Es importante mencionar que, en concordancia con el incremento de los marcadores de senescencia con la edad, el número de células senescentes también incrementó tanto en la Cx como el Hc en los grupos de animales adultos y viejos no tratados tanto hembras como machos.

En la Cx de las ratas hembras, (Fig.27A-C), se cuantificaron en promedio  $10.2 \pm 4.65$  células positivas a X-gal por campo en el grupo de ratas jóvenes, mientras que en el grupo de ratas adultas no tratadas hubo un incremento estadísticamente significativo ( $p \leq 0.001$ ) con un promedio de  $25.4 \pm 5.17$  células positivas por campo.

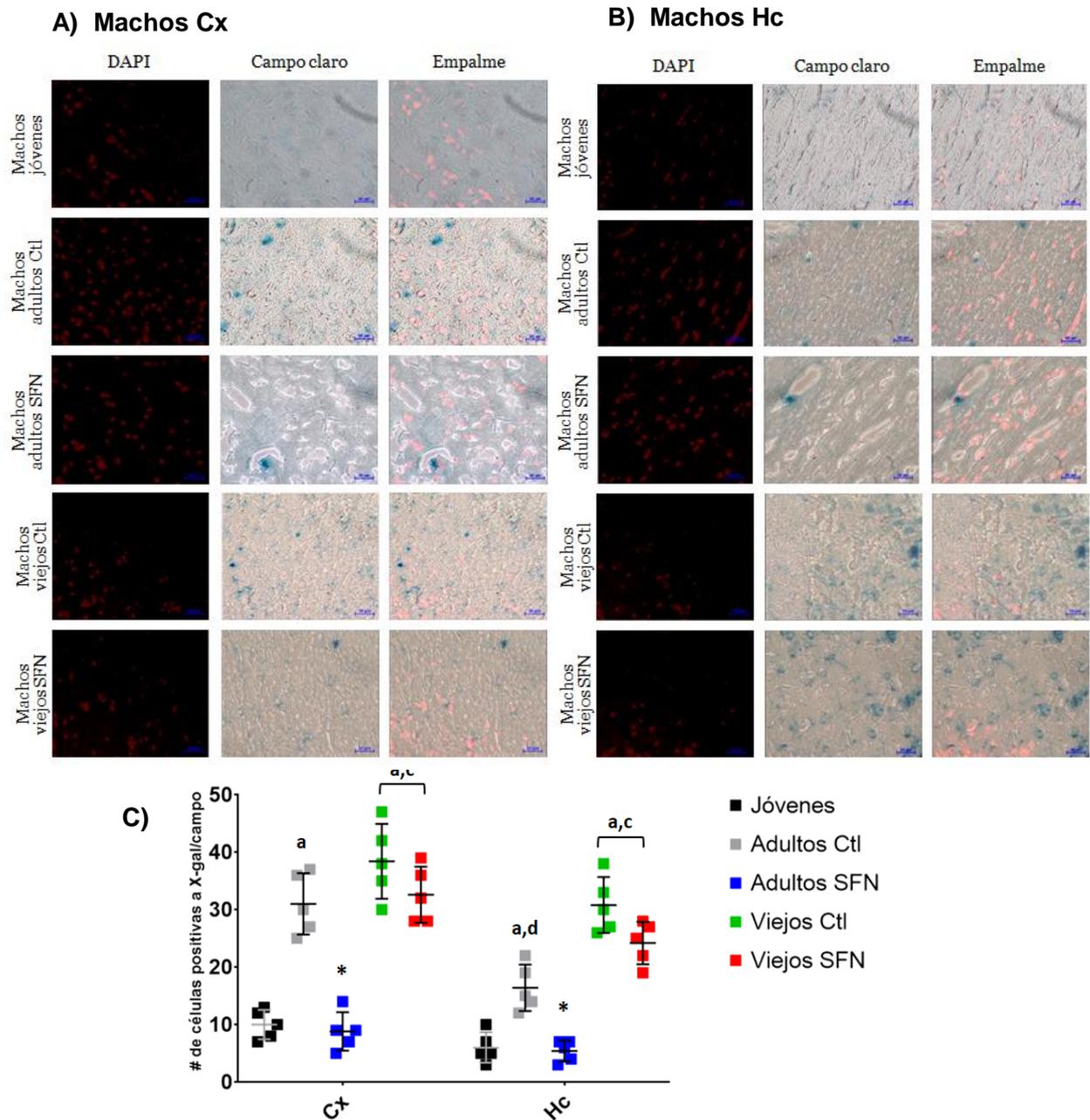
En el grupo de hembras viejas también se incrementó significativamente el número de células positivas a X-gal en comparación con el grupo de ratas jóvenes ( $p \leq 0.001$ ) y con el grupo de ratas adultas no tratadas ( $p \leq 0.001$ ), con un promedio de  $48.6 \pm 4.50$  células positivas a X-gal por campo, observándose un incremento en el número de células senescentes dependiente de la edad. Después de la administración crónica con SFN, en el grupo de hembras adultas disminuyeron las células positivas a X-gal en comparación con el grupo control de la misma edad ( $p \leq 0.001$ ), llegando a un promedio similar al encontrado en el grupo joven ( $9 \pm 4.52$  células positivas a X-gal por campo). Cabe mencionar que, también se identificó una disminución en el número de células positivas a X-gal en el grupo de hembras viejas tratadas con SFN cuando se compararon con su grupo control ( $p \leq 0.001$ ) ( $34 \pm 4.18$  células positivas a X-gal por campo). A pesar de la disminución en el número de células positivas a X-gal en el grupo de hembras viejas tratadas con SFN, siguieron siendo

significativamente mayores a las de los grupos antes mencionados (jóvenes:  $p \leq 0.001$ ; adultos SFN:  $p \leq 0.001$ ).

En el caso del Hc de las hembras (Fig. 27B-C) se observó que el número de células senescentes no fue significativamente mayor en el grupo de las ratas adultas no tratadas en comparación con el grupo de ratas jóvenes, a diferencia de lo encontrado en la Cx. A pesar de ello, el tratamiento con SFN en el grupo de hembras adultas disminuyó significativamente el número de células positivas a X-gal en comparación al grupo control de la misma edad ( $p=0.017$ ). En los grupos de hembras viejas no hubo efecto del tratamiento con SFN sobre el número de células positivas a X-gal. El número de células senescentes fue significativamente mayor en el grupo de ratas viejas no tratadas y tratadas con SFN en comparación con el grupo de jóvenes (vieja ctl:  $p \leq 0.001$ ; vieja SFN:  $p=0.013$ ) y el grupo de ratas adultas tratadas con SFN (viejas ctl:  $p \leq 0.001$ ; viejas SFN:  $p=0.028$ ). De igual manera a lo observado en la Cx de los grupos de hembras, en los machos adultos no tratados (Fig.28A-C) también incrementó el número de células positivas a X-gal con la edad en comparación con el grupo de machos jóvenes ( $p \leq 0.001$ ) encontrándose un promedio de  $31 \pm 5.33$  células senescentes por campo en los animales adultos del grupo control contra el promedio de  $10 \pm 2.54$  del grupo de animales jóvenes. Cabe resaltar que, el tratamiento con SFN disminuyó significativamente el número de células senescentes en el grupo de machos adultos en comparación al grupo control no tratado ( $p \leq 0.001$ ), llegando a niveles similares a los observados en el grupo joven, con un promedio de  $8.8 \pm 3.34$  células positivas a X-gal por campo. En cuanto a los grupos de machos viejos, no

hubo diferencia significativa respecto al promedio de las células positivas a X-gal entre ellos con el tratamiento con SFN ya que presentaron conteos similares a los encontrados en el grupo de machos adultos control con un promedio de  $38.4 \pm 6.50$  y  $32.6 \pm 4.87$  células positivas a X-gal por campo, respectivamente.

En el Hc de los machos (Fig.28B-C), también se pudo observar un aumento de las células positivas a X-gal dependiente de la edad. En el grupo de animales jóvenes se cuantificaron en promedio  $6 \pm 2.64$  células positivas a X-gal, mientras que en el grupo adulto no tratado se encontraron  $16.4 \pm 4.03$ , lo que se reflejó en un incremento estadísticamente significativo ( $p \leq 0.001$ ) con respecto al grupo de machos jóvenes. En el grupo de machos viejos no tratados, se evaluó un promedio de  $30.8 \pm 4.86$  células positivas a X-gal, con una diferencia significativa con el grupo de animales jóvenes ( $p \leq 0.001$ ) y con el grupo control de animales adultos ( $p = 0.048$ ). El tratamiento con SFN en el grupo de machos adultos previno de manera significativa ( $p \leq 0.001$ ) el incremento de células senescentes con la edad registrado en el grupo no tratado, con un promedio de  $5.4 \pm 1.81$  células positivas a X-gal por campo. En los grupos de machos viejos no hubo diferencias en cuanto a la cantidad de células positivas a X-gal por campo con el tratamiento con SFN. En el grupo control de animales viejos observamos un promedio de  $30.8 \pm 4.86$ , mientras en el grupo viejo tratado con SFN se presentó un promedio de  $24.2 \pm 3.70$  células positivas a X-gal, lo que representa una diferencia significativa en comparación con el grupo de animales jóvenes (viejos ctl:  $p \leq 0.001$ ; viejos SFN:  $p \leq 0.001$ ) y con el grupo de machos adultos tratados con SFN (viejos ctl:  $p \leq 0.001$ ; viejos SFN:  $p \leq 0.001$ ).



**Fig.28** Células positivas a X-gal en Cx e Hc de machos. Las células coloreadas de color azul se contaron como positivas a X-gal siempre que colocalizaran con un núcleo **A)** Micrografías representativas de la Cx de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **B)** Micrografías representativas del Hc de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **C)** Cuantificación de las células positivas a X-gal por campo. Cada barra representa a la media  $\pm$  D.E. Jóvenes: n=5; Adultos Ctl: n=5; Adultos SFN: n=5; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. La significancia estadística se especificó como: **(a)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo joven **(b)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto Ctl **(c)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo adulto SFN **(d)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo Ctl **(e)**  $p < 0.05$ ; contra el grupo viejo SFN and **(\*)**  $p < 0.05$  contra el grupo no tratado de la misma edad. Aumento: 20X. La barra de referencia representa 50 $\mu$ m.

### **6.2.8 Cambios en la citoarquitectura de la corteza cerebral y el hipocampo de machos y hembras.**

Para analizar la citoarquitectura de las regiones cerebrales evaluadas se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina. Los cortes histológicos de la Cx de los grupos de hembras (Fig.29A) mostraron que el tejido se encontraba más desorganizado con la edad. Se identificó que en los grupos de hembras adultas y viejas había un aumento en el número de agujeros en el tejido. Así mismo, los núcleos en el grupo de los animales jóvenes se encontraban organizados en forma de fibras, y al aumentar la edad se perdía dicha organización, tomando una formación aleatoria. Se observó que el deterioro en el tejido no se previno con el tratamiento con SFN en el grupo de hembras adultas ni viejas, ya que en ambos casos se pudo apreciar un nivel similar de desorganización en el tejido.

Por otra parte, en el Hc de los grupos de hembras (Fig.29A) se observó un efecto interesante, ya que en el grupo joven se observaron las fibras nerviosas organizadas y con poca presencia de agujeros debido al deterioro. Sin embargo, en el grupo de hembras adultas no tratadas con SFN se observaron agujeros en el tejido como consecuencia de la edad, lo que tuvo efectos positivos sobre la organización del tejido. Interesantemente, en el tejido cerebral provenientes de hembras adultas tratadas con SFN se observó una citoarquitectura similar a la encontrada en el grupo de las hembras jóvenes. De hecho, la cantidad y el tamaño de los agujeros también disminuyeron con el tratamiento crónico con SFN. En el caso de las hembras viejas no tratadas el deterioro asociado a la edad fue evidente, ya que tanto el tamaño

como el número de agujeros en el tejido fueron mayores que los encontrados en el grupo de animales jóvenes y en los dos grupos de animales adultos. La organización celular también se encontró afectada. El tratamiento con SFN en el grupo de hembras viejas pareció prevenir el daño de la citoarquitectura cerebral, sin embargo, la pérdida del tejido también fue notable en comparación con lo observado en los grupos de animales adultos y jóvenes.

En el caso de los machos se observó un efecto similar a lo observado en las hembras. En la Cx (Fig.29B) también se pudo identificar la organización esperada de los núcleos, además de la integridad estructural del tejido en el grupo de machos jóvenes, sin embargo también el deterioro característico de la edad fue evidente, ya que tanto en el grupo de machos adultos no tratados como en el grupo de viejos no tratados se observó la pérdida de la integridad del tejido por la presencia agujeros en el tejido y la pérdida de la integridad estructural. El tratamiento con SFN en el grupo de machos adultos evitó en gran medida el deterioro del tejido disminuyendo el número de agujeros y previniendo la desorganización del tejido. En el grupo de machos viejos tratados con SFN no se encontró un efecto tan notorio como el observado en el grupo de animales adultos tratados. Se observó una morfología muy similar al encontrado con su grupo control de la misma edad.

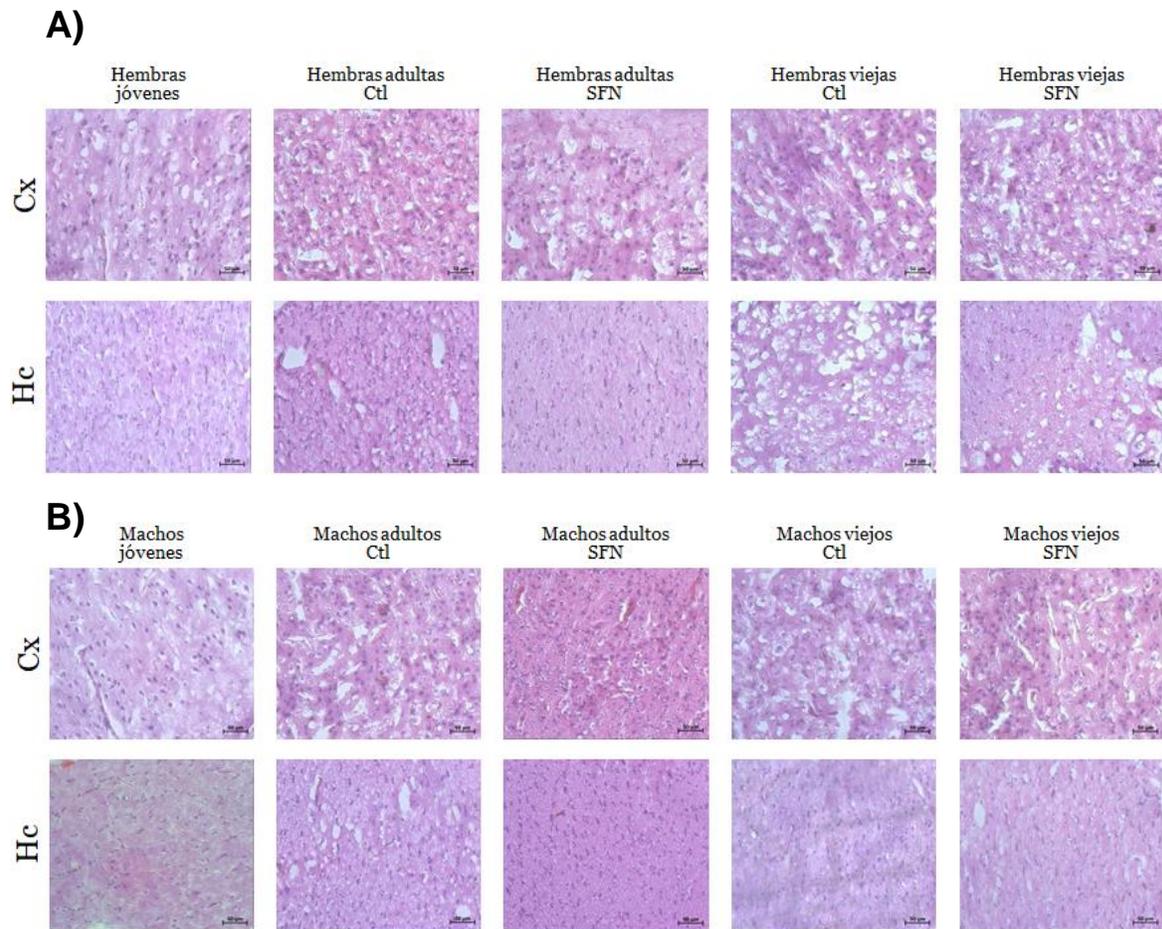
Cuando se evaluaron los cortes histológicos del Hc de los grupos de machos (Fig. 29B) se pudo observar, que la integridad del tejido del Hc se mantuvo en mejores condiciones que las encontradas en la misma región cerebral de las hembras de la misma edad. En el grupo de machos jóvenes se observó la citoarquitectura íntegra. A

pesar de que en el grupo de animales adultos no tratados se observó la pérdida de la integridad del tejido, el tratamiento con SFN en los animales logró nuevamente prevenir el deterioro conservando el tejido íntegro previniendo la pérdida de la citoarquitectura en el parénquima del Hc. Llama la atención que no se haya perdido la integridad de la citoarquitectura del Hc, contrario a lo observado en la Cx de los machos y en el Hc y la Cx de las ratas hembras. En esta ocasión el tratamiento con SFN en los animales del grupo viejo no tuvo ningún efecto sobre la preservación de la estructura del Hc. Es importante mencionar que en este grupo también se conservó la citoarquitectura y el daño asociado a la edad no fue tan evidente como el observado en la Cx.

En resumen, el tratamiento con SFN en el grupo de machos adultos pareció prevenir el daño en la Cx asociado a la edad, pero pareció no tener efecto sobre la preservación de la integridad de dicha región cerebral en el grupo de hembras adultas tratadas con SFN. En cuanto a los grupos de animales viejos no se observó efecto alguno sobre la estructura de la Cx del tratamiento crónico con SFN en comparación con el grupo control de la misma edad.

Con respecto al Hc se pudo observar que el tratamiento con SFN en los grupos de animales adultos, tanto de hembras como de machos, previene el deterioro del tejido en comparación al grupo control. En cuanto a los grupos de animales viejos se observó una prevención parcial del deterioro estructural del Hc con el tratamiento con SFN, sin embargo no fue tan evidente como el observado en los grupos de animales adultos tratados con SFN. También se pudo observar que la citoarquitectura del Hc

se conserva mejor con la edad en comparación con la Cx, sin importar si el grupo fue tratado con SFN o no.



**Fig.29** Análisis histológico de la Cx e Hc de hembras y machos. Tinción con H&E de secciones cerebrales coronales de 16µm de espesor. **A) Páneos superiores:** Micrografías de la Cx de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **Páneos inferiores:** Micrografías del Hc de hembras jóvenes, adultas Ctl y tratadas con SFN y viejas Ctl y tratadas con SFN. **B) Páneos superiores:** Micrografías de la Cx machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. **Páneos inferiores:** Micrografías del Hc de machos jóvenes, adultos Ctl y tratados con SFN y viejos Ctl y tratados con SFN. Aumento: 20X. La barra de referencia representa 50µm. Jóvenes: n=3; Adultos Ctl: n=3; Adultos SFN: n=3; Viejos Ctl: n=3; Viejos SFN: n=3.

## 7 Discusión

El SFN es un isotiocianato presente en vegetales crucíferos que es capaz de regular una gran variedad de respuestas celulares, como vías de regulación del estado redox, detoxificación celular y la respuesta inflamatoria, lo que tiene como consecuencia la activación de mecanismos de protección celular (Santín-Márquez et al. 2019). Además, se han sugerido al estado redox y a la inflamación como procesos clave que resultan afectados durante el envejecimiento y promueven el desarrollo de patologías asociadas a la edad en un proceso denominado en inglés como oxi-inflammaging (Liguori, et al., 2018). Se ha sugerido al SFN como una hormetina que puede ser obtenida de la dieta (Ratan et al., 2009). Se han estudiado los efectos del SFN en modelos *in vitro* (Liu et al., 2020; Maciel-Barón et al., 2018; Calabrese et al., 2020) e *in vivo* (Morrone et al., 2013; Zhou et al., 2016; Mao et al., 2019; Devi & Chamoli, 2020) y se ha determinado que tiene potenciales efectos neuroprotectores. Debido a ello, en este trabajo utilizamos una administración crónica de SFN en concentraciones bajas para evaluar su efecto como hormetina capaz de prevenir el deterioro del sistema nervioso a nivel funcional y estructural asociado a la edad, y evaluar las posibles diferencias asociadas al sexo entre machos y hembras de distintas edades.

A lo largo del trabajo el tratamiento crónico con SFN mejoró en los grupos adultos de hembras y machos la mayoría de los parámetros evaluados tanto del estado redox, como de la inflamación y la presencia de senescencia en el tejido en comparación con los grupos viejos. Desde la perspectiva de la regulación del estado redox esto

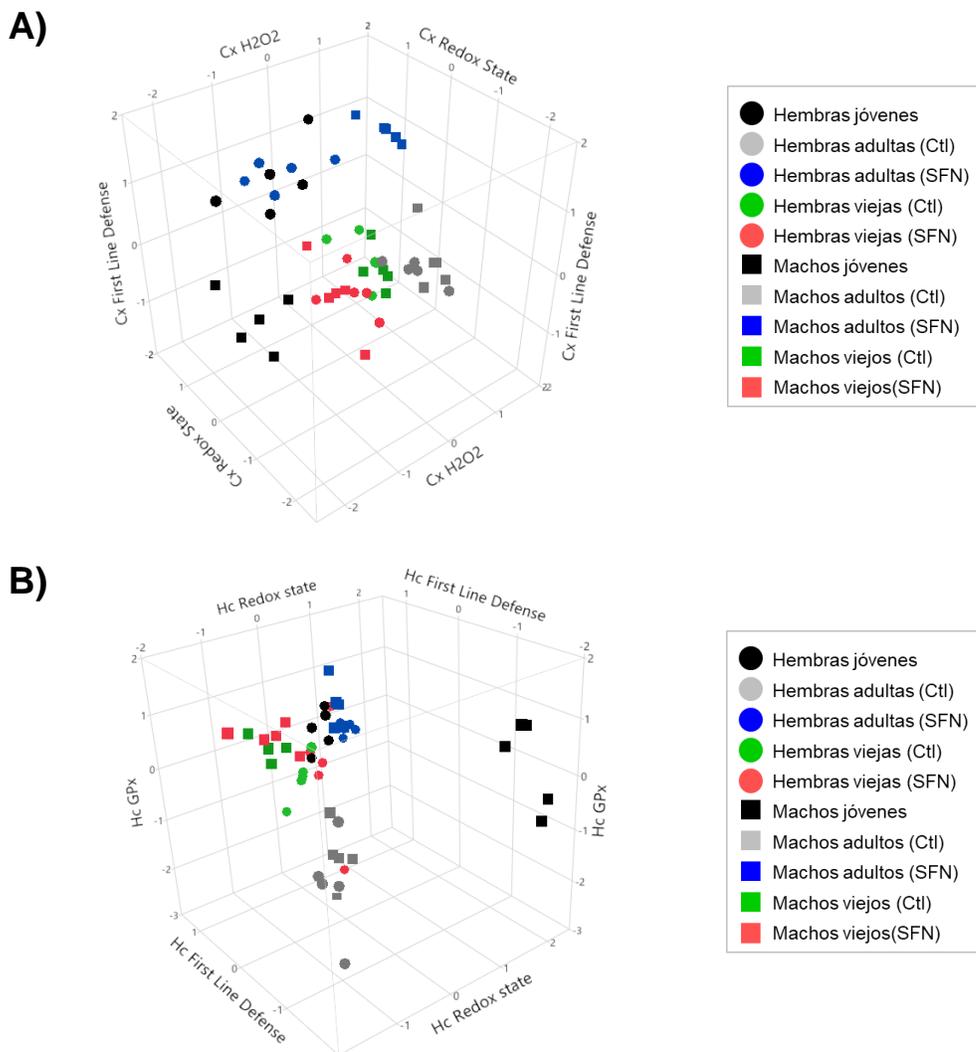
puede explicarse debido a que ha sido reportado que con la edad disminuye la capacidad de las células de activar la vía de Nrf2 (Suh et al., 2004) lo que merma su capacidad de respuesta antioxidante. De igual manera, se sabe que los heterodímeros que componen a NF- $\kappa$ B son dinámicos y varían de manera tejido-específica y también con la edad para establecer diferentes tipos de respuestas inflamatorias y otros procesos importantes para la supervivencia celular, muchos de los cuales se reconocen como marcadores del envejecimiento (Songkiatisak, et al., 2022). También se ha reportado que durante el envejecimiento hay una activación persistente de la vía de NF- $\kappa$ B en parte dada por la retención de heterodímeros activos en el núcleo de las células, lo que dificulta que los inhibidores que actúan sobre IKK, I $\kappa$ B o impidiendo la importación nuclear de NF- $\kappa$ B pierdan en gran medida su eficacia para impedir la activación de la vía (Salminen, et al., 2010). Lo anterior puede explicar por qué el tratamiento con SFN tampoco es capaz de disminuir el número de células senescentes en el tejido de los individuos viejos de ambos sexos, ya que se sabe que la presencia crónica de un medio prooxidante y proinflamatorio puede promover el desarrollo del fenotipo senescente y reforzar el de las células senescentes desarrolladas previamente (Chao, et al., 2018; Papaconstantinou, 2019).

Sin embargo, es importante mencionar que no todos los parámetros evaluados reaccionaron de esta manera, ya que se encontraron diferencias entre los sexos en algunos de ellos, particularmente en los parámetros asociados al estado redox. Observamos que los machos adultos tratados con SFN presentaron un estado redox

similare a los observados en el grupo de animales jóvenes, mientras que las hembras adultas tratadas con SFN mostraron una mejoría incluso mayor a la encontrada en las ratas jóvenes. Es importante mencionar que se ha reportado previamente que las hembras tienen una mejor capacidad de respuesta antioxidante, además de tener una menor producción de ERO (Bhatia et al., 2012; Kander et al., 2017). Sin embargo, esto depende de mecanismos asociados a la producción hormonal, por lo que la disminución en la concentración de hormonas circulantes asociadas al envejecimiento afecta en gran medida la protección antes mencionada (Viña et al., 2005; Wang et al., 2020; Agarwal et al., 2012). También se ha propuesto que las hembras son capaces de responder mejor después de algún reto prooxidante en comparación con machos expuestos al mismo estímulo (Chamniansawat and Sawatdiyaphanon, 2018).

Debido a esto, probablemente las hembras adultas tratadas con SFN obtuvieron mejores resultados en los parámetros evaluados relacionados a la regulación del estado redox en comparación con los machos de la misma edad. En cuanto a los grupos de animales viejos también se encontró que las respuestas del estado redox variaron tanto por el sexo como por la edad, por lo que se decidió realizar un análisis estadístico multivariado para poder entender mejor cómo se relacionan las variables entre sí y cuáles son las que afectan más al modelo propuesto para poder describirlo mejor. Para esto, se redujeron las dimensiones de las variables del sistema de regulación redox mediante un FA para facilitar su análisis, dando como resultado los factores RS, FLD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Gpx. Posterior al FA se realizó un análisis discriminante

para determinar la relación entre los nuevos factores obtenidos y un parámetro que involucrara la funcionalidad del sistema, como el cociente de tiempo de interacción/número de interacciones obtenido de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso.



**Fig.30** Gráficas 3D de los factores redox de cada región cerebral. Cada gráfico fue construido con los 3 factores obtenidos en el FA para: **A)** corteza cerebral e **B)** hipocampo de machos y hembras, Cada punto representa un individuo. Los círculos representan a las hembras, mientras que los cuadrados representan a los machos.

Este análisis nos permitió observar relaciones entre variables y respuestas que no fueron observables a primera vista al analizarlas de manera individual. Notamos que los individuos viejos que fueron tratados con SFN modificaron su respuesta redox de manera hormética, por lo que con la edad se adaptaron y consiguieron desplazar sus niveles basales hacia un estado aparentemente “prooxidante” sin perder la homeostasis redox, y a pesar de que la respuesta no mejoró en la misma medida que lo hicieron los grupos adultos tratados con SFN, tuvieron una mejora leve en comparación con el grupo control de la misma edad.

Para poder representar la relación entre los nuevos factores obtenidos en la Cx (capacidad de contención de  $H_2O_2$ , estado redox y primera línea de defensa) y en el Hc (Gpx, estado redox y primera línea de defensa), se realizaron gráficos 3D para cada una de las regiones cerebrales estudiadas (Fig.30A). Para la Cx se pudo observar que los grupos experimentales se distribuyeron diferencialmente por los cuadrantes del gráfico. Se observó que en el grupo de hembras jóvenes se encontraba positivamente correlacionado con el factor que involucraba al estado redox y la primera línea de defensa, y negativamente correlacionado con la capacidad de contención de  $H_2O_2$ . Esto puede deberse a que el  $H_2O_2$  no se acumuló por el correcto funcionamiento de la primera línea de defensa antioxidante, por lo que no fue necesario eliminarlo. Esto sugiere que el tratamiento crónico con SFN modula y mantiene en homeostasis al estado redox de manera que no tenga que invertir más energía en incrementar proteínas involucradas con la contención del estrés oxidante.

En cuanto a la Cx de los machos jóvenes pudimos observar una correlación negativa con la primera línea de defensa antioxidante y una correlación positiva con el factor de estado redox, lo que sugiere que la regulación de la homeostasis redox está dada por un mecanismo distinto al de las hembras (Fig.30A).

Se observó también que en los individuos adultos y viejos de ambos sexos los tres factores tuvieron puntuaciones negativas, lo que sugiere que con la edad pierden la capacidad de mantener la homeostasis redox. Sin embargo, cuando los grupos animales adultos fueron tratados con SFN, los valores de los tres factores obtenidos fueron positivos en el caso de los machos, y de dos factores en el caso de las hembras, tal como se encontraron en sus grupos jóvenes respectivamente, lo que indica que la homeostasis redox se recuperó previniendo el estrés oxidante relacionado a la edad.

De manera similar, se observó que los parámetros evaluados en el Hc también mejoraron en los grupos adultos de animales tratados con SFN en comparación a los grupos de animales adultos no tratados, al mejorar la homeostasis redox de esta región cerebral (Fig.30B).

De manera general el tratamiento crónico con SFN mejoró la FLD antioxidante de la Cx en las hembras adultas (conformado por el cociente de Nrf2/Keap1 y los niveles relativos de SOD), mientras que en las hembras viejas observamos una mejora discreta del factor de RS (conformado por la actividad y niveles relativos de CAT, el cociente de GSH/GSSG y el contenido de proteínas carboniladas), lo que dio como resultado el mejoramiento del factor primera línea de defensa antioxidante

(conformado por la actividad y niveles relativos de SOD y los niveles relativos de Gpx) en comparación con los animales adultos. Por otra parte, los resultados obtenidos apoyan a la hipótesis de que el tratamiento crónico con SFN mejora la homeostasis redox de la Cx. En los adultos, el tratamiento con SFN mejoró en gran medida la FLD, mientras que en los viejos tratados con SFN, se mejoraron la capacidad para contender con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A pesar de todo lo anterior, incluso con los análisis multivariados realizados es difícil dar una explicación certera acerca de cómo una molécula como el SFN es capaz de modular de manera diferencial la respuesta redox en machos y hembras. Por lo que es necesario recordar que el SFN no actúa solamente por medio de la activación de la vía de Nrf2/Keap1 y la regulación del estado redox, sino que se ha demostrado que el SFN es capaz de interactuar con una gran variedad de proteínas mediante la interacción de éste con los grupos tioles/sulfhidrilos presentes en las proteínas (Gan, et al., 2010; Kim, et al., 2017). Por lo que es capaz de modular una gran variedad de respuestas. Se ha estudiado que la neuroquímica del cerebro difiere entre machos y hembras (Fowler et al., 2021), por lo que los cambios en el estado redox debido al tratamiento con SFN podrían activar o inhibir distintas vías de señalización (Sun et al., 2019). Por ejemplo, algunos neuropéptidos tales como la oxitocina y la vasopresina poseen residuos de cisteínas en sus estructuras, cuyos átomos de azufre son capaces de formar puentes disulfuro, cambiando activamente su estructura tridimensional, lo que los vuelve susceptibles a ser modulados por el estado redox. A pesar de que el SFN podría cooperar para la recuperación de la

homeostasis redox en la adultez por otras vías como la protección de la función mitocondrial (Greco et al., 2011; Greco and Fiskum, 2016) y disminuyendo la actividad de algunas vías reguladoras de la respuesta inflamatoria (Liang et al., 2018; Qi et al., 2016; Ruhee and Suzuki, 2020), el SFN podría activar de manera simultánea dichas vías de señalización para proteger la homeostasis del estado redox.

En este caso, el tratamiento con SFN también disminuyó la concentración de interleucinas proinflamatorias en la Cx y el Hc en los grupos de animales adultos en comparación con los no tratados, permitiendo generar un perfil más antiinflamatorio y regulador que proinflamatorio, lo que se relaciona con el retraso en la aparición de los marcadores del envejecimiento en el sistema nervioso central, tales como el deterioro cognitivo (Fielder et al., 2020). En cuanto a los grupos de animales viejos, en general no se observaron efectos sobre las citocinas ni las quimiocinas evaluadas, lo cual puede deberse principalmente a que la actividad antiinflamatoria propuesta para el SFN se da mediante el impedimento en la fosforilación de I $\kappa$ B para su posterior degradación por medio del complejo proteosomal, o el impedimento de la importación nuclear del dímero que forma a NF- $\kappa$ B. Sin embargo, como se mencionó antes, se ha demostrado que durante el envejecimiento existen dímeros activos dentro del núcleo transcribiendo reguladores proinflamatorios (Salminen, et al., 2010), por lo que el SFN podría no ser capaz de regular la respuesta en los puntos en los que se ha propuesto que actúa. Se ha propuesto además a que la regulación de la inflamación se encuentra hiper sensibilizada en los organismos

adultos y viejos, lo que genera un ambiente proinflamatorio que no es capaz de llegar a la resolución, generando daños estructurales en las vías nerviosas, lo que conlleva al deterioro cognitivo asociado a la edad, que difícilmente puede ser reparado por moléculas antiinflamatorias administradas en la última etapa de la vida (Sparkman, & Johnson, 2008).

También es importante mencionar que la inflamación asociada al envejecimiento es denominada como “inflamación crónica de bajo grado” que implica la elevación apenas por sobre los niveles basales de las citocinas y quimiocinas reguladoras de la respuesta inflamatoria (Custodero, et al., 2018) que no llega a resolución y que comienza desde la adultez y se mantiene a lo largo de la vejez, teniendo un papel muy importante en el proceso de envejecimiento, y está asociado al deterioro propio de la edad, que además se vuelve más severo conforme el tiempo avanza (Neves & Sousa-Victor, 2020). Esto sugiere que el daño acumulado debido a la inflamación durante la segunda mitad de la vida puede tener un efecto severo en la integridad del sistema nervioso y, por ende, en sus funciones cognitivas lo que es difícilmente reversible por una molécula como el SFN.

La evolución del perfil inflamatorio fue distinta en hembras y en machos, lo que pudo afectar también el efecto del SFN sobre el estado inflamatorio general. Se pudo observar un patrón constante en la mayoría de las citocinas proinflamaorias y reguladoras en las hembras y posteriormente los niveles disminuyen significativamente. Este fenómeno ha sido reportado en humanos a edades equivalentes a las empleadas en este proyecto, en las que la reducción en la

producción de citocinas en la edad mediana está correlacionada con la disminución de hormonas como la progesterona, y disminuye en el periodo postmenopáusico (Malutan, *et al.*, 2014). Este fenómeno parece ser exclusivo de las hembras, ya que en el caso de los machos se pudo observar que los niveles de citocinas se elevan gradualmente con la edad, a niveles menores a los encontrados en las hembras. Eso ha sido reportado también en estudios con humanos en edad media, equivalente a las edades que se utilizaron para este proyecto (Milán-Matos, *et al.*, 2019)

Cabe resaltar que también se encontró un mayor efecto del tratamiento con SFN en el Hc en comparación con la Cx. Esto puede deberse a la diferencia en la cantidad de células microgliales presentes en cada una de las regiones evaluadas, quienes son las encargadas de una buena parte de las funciones inmunes en el sistema nervioso. Se ha propuesto que la densidad microglial es, en promedio, mayor en el Hc que en la mayoría de las regiones de la Cx (Tan, *et al.*, 2020). El tratamiento con SFN en los grupos adultos parece prevenir el incremento en los niveles de citocinas a nivel general en el Hc en comparación con el grupo de animales adultos no tratados, en lo que la microglia es fundamental, por lo que podría estar ejerciendo un efecto antiinflamatorio por medio de la regulación de la respuesta inmune de la microglia.

En general se observó que las hembras alcanzaron niveles mayores de algunas citocinas reguladoras de la respuesta inflamatoria en comparación con los machos, en los que no hubo una variación tan notoria del perfil inflamatorio ni con la edad ni con el tratamiento al compararlos con los grupos de hembras de la misma edad.

En resumen, el tratamiento con SFN parece disminuir la síntesis de algunas citocinas y quimiocinas proinflamatorias, particularmente en el hipocampo de machos y hembras, lo que ayuda a prevenir la pérdida de la integridad del tejido y el posterior deterioro cognitivo que esto conlleva.

Debido a que algunos de los componentes del SASP pertenecen también a la familia de las citocinas, es probable que el SFN también se encuentre involucrado en la prevención del establecimiento del fenotipo senescente a través de la regulación de su secretoma, actuando como senomórfico (Hariton, et al., 2018; Maciel-Barón, et al., 2018).

En retrospectiva, es posible proponer que el SFN sea capaz de prevenir la senescencia por medio de la regulación del estado redox y evitando la síntesis de algunas citocinas y quimiocinas proinflamatorias, que son factores clave en el establecimiento del fenotipo senescente. Es posible descartar un efecto senolítico del SFN, ya que no existe evidencia suficiente de que induzca apoptosis en células senescentes. Sin embargo su rol como senomórfico cada vez toma más importancia (Malavolta, et al., 2018; Mongelli, et al., 2020; Nehlin, 2021)

Por otra parte, se ha sugerido que el SFN suele ser conjugado con moléculas como glutatión, cisteína y N-acetilcisteína (NAC), lo que provoca que las características fisicoquímicas de la molécula sean distintas en cada uno de dichos conjugados, lo que implica que potencialmente se modifique su afinidad hacia los distintos blancos moleculares que se han reportado (Jardim et al., 2020) y ello podría explicar su actividad diferencial entre sexos y edades.

También es importante tomar en cuenta al factor hormonal, que es la fuente de una gran variedad de diferencias morfológicas, moleculares, y funcionales (como en el caso del comportamiento y varios fenómenos cognitivos) entre machos y hembras (Hamson et al., 2011; de Souza et al., 2022).

A pesar de esto, a parte de las implicaciones en la cognición, las diferencias en los mecanismos antioxidantes también han sido descritos entre sexos (Gaignard et al., 2015). Adicionalmente, la disminución en los niveles de las hormonas sexuales se ha relacionado con un incremento en el estrés oxidante durante el envejecimiento en ambos sexos, lo que tiene un efecto perjudicial, particularmente en las hembras viejas (Razmara et al., 2007; Sumien et al., 2021).

Se ha reportado ampliamente que la disminución gradual en los niveles de hormonas sexuales se correlaciona con el deterioro cognitivo y con alteraciones en los procesos de memoria tanto en ratas machos como hembras (Bimonte-Nelson et al., 2003; Gurvich et al., 2018). Algunos estudios han propuesto que la disminución asociada a la edad de los niveles de hormonas sexuales comienza en la adultez, cuando las ratas aún poseen capacidad reproductiva, es decir, en el rango entre los 8 y 10 meses de edad (Candeias et al., 2017), disminuyendo gradualmente con el paso del tiempo. Debido a esto, la adultez es una etapa fundamental en la que muchos procesos degenerativos comienzan, entre ellos el inicio del declive cognitivo, que se ha correlacionado con la reducción de la producción hormonal (Morrison and Baxter, 2012). De hecho, los niveles de hormonas sexuales son capaces de activar una gran variedad de vías de respuesta al estrés, por lo que la disminución hormonal

puede estar involucrada en el deterioro cognitivo y daño del sistema nervioso asociado a la edad (Ferreira et al., 2012; Wang et al., 2020).

También se ha reportado que el metabolismo de GSH disminuye drásticamente durante la adultez en las hembras en comparación con lo observado en los individuos jóvenes, en contraste con los machos, quienes desde la juventud muestran una respuesta relacionada con el GSH más discreta que disminuye de manera gradual con la edad (Wang, et al., 2020). Entonces, los cambios en el estado redox general tienen un papel muy importante en el proceso de envejecimiento del sistema nervioso. Por lo que esto resalta la importancia de proponer una intervención farmacológica capaz de prevenir el daño relacionado con la edad en el sistema nervioso central en la ventana de tiempo en la que el organismo aún es responsivo a la inducción de mecanismos moleculares de respuesta al estrés y comienza a contender con el estrés asociado al envejecimiento, para así prevenir el deterioro estructural y funcional del sistema nervioso central.

## **8 Conclusiones**

En conclusión, el SFN actuó como un agente preventivo y protector en lugar de como un agente reversivo para el daño en el sistema nervioso central ocasionado por el envejecimiento natural de machos y hembras.

Esto se debe a que la administración de SFN en hembras y machos en la edad adulta fue capaz de mejorar el estado redox por medio de una mejor respuesta antioxidante, lo que disminuyó el daño por oxidación a macromoléculas y la

inflamación asociada a la edad en el tejido y, por consecuencia, reduciendo la acumulación de células senescentes en el tejido nervioso. Lo cual tuvo como consecuencia la prevención del daño estructural y funcional de la Cx y el Hc.

Si bien el tratamiento con SFN mejoró la integridad del sistema nervioso en hembras y machos, no lo hizo en la misma medida, ya que se observó una mejor respuesta en las hembras gracias a que la edad a la que el tratamiento fue administrado ayudó a contener con el estrés propio del desbalance hormonal asociado a esa etapa de la vida. En los machos mejoró de manera discreta, pero aun evitando la progresión del daño asociado a la edad.

## **9 Perspectivas**

Sería interesante en un futuro realizar inmunofluorescencias en cortes histológicos de cerebro para observar la proporción de células senescentes en los tres principales tipos celulares: neuronas, astrocitos y microglia.

También sería interesante determinar si el SFN actúa únicamente como senomórfico o también puede actuar como senolítico y detallar sus posibles mecanismos de acción.

## **10 Referencias**

Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S (2012) The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 10:49. doi: 10.1186/1477-7827-10-49

Ahmad, S., Beilstein, M. A., & Pardini, R. S. (1989). Glutathione peroxidase activity in insects: a reassessment. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 12(1), 31-49.

Alimbetov, D., Davis, T., Brook, A. J., Cox, L. S., Faragher, R. G., Nurgozhin, T., ... & Kipling, D. (2016). Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. *Biogerontology*, 17(2), 305-315.

Bhat, R., Crowe, E. P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C. D., Garcia, F. U., ... & Torres, C. (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PloS one*, 7(9), e45069.

Bhatia K, Elmarakby AA, El-Remessy AB, Sullivan JC (2012) Oxidative stress contributes to sex differences in angiotensin II-mediated hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2302:R274-82. doi: 10.1152/ajpregu.00546.2011.

Bimonte-Nelson HA, Singleton RS, Nelson ME, Eckman CB, Barber J, et al (2003) Testosterone, but not nonaromatizable dihydrotestosterone, improves working memory and alters nerve growth factor levels in aged male rats. *Exp Neurol*. 181:301-12. doi: 10.1016/s0014-4886(03)00061-x

Calabrese EJ, Mattson MP, Dhawan G, Kapoor R, Calabrese V, Giordano J. (2020). Hormesis: A potential strategic approach to the treatment of neurodegenerative disease. *Int Rev Neurobiol*. 2020;155:271-301. doi: 10.1016/bs.irn.2020.03.024. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32854857.

Candeias E, Duarte AI, Sebastião I, Fernandes MA, Plácido AI, et al (2017) Middle-Aged Diabetic Females and Males Present Distinct Susceptibility to Alzheimer Disease-like Pathology. *Mol Neurobiol.* 54(8):6471-6489. doi: 10.1007/s12035-016-0155-1

Chamniansawat S, Sawatdiyaphanon C (2018) Age-Related Memory Impairment Associated With Decreased Endogenous Estradiol in the Hippocampus of Female Rats. *Int J Toxicol.* 37:207-215. doi: 10.1177/1091581818761653

Chao, J., Guo, Y., & Chao, L. (2018). Protective role of endogenous kallistatin in vascular injury and senescence by inhibiting oxidative stress and inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

Consejo Nacional de Población. Zúñiga-Herrera, M. E., Vega, D., Mendoza, M. E. (2004). *Envejecimiento de la población de México: reto del Siglo XXI*. CONAPO, México. ISBN:970-628-824-4

Custodero, C., Mankowski, R. T., Lee, S. A., Chen, Z., Wu, S., Manini, T. M., ... & Anton, S. D. (2018). Evidence-based nutritional and pharmacological interventions targeting chronic low-grade inflammation in middle-age and older adults: A systematic review and meta-analysis. *Ageing research reviews*, 46, 42-59.

de Souza GO, Wasinski F, Donato J Jr (2022) Characterization of the metabolic differences between male and female C57BL/6 mice. *Life Sci.* 301:120636. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120636

Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 257-266.

Devi SA, Chamoli A (2020) Polyphenols as an Effective Therapeutic Intervention Against Cognitive Decline During Normal and Pathological Brain Aging. *Adv Exp Med Biol*. 1260:159-174. doi: 10.1007/978-3-030-42667-5\_7

Ferreira JA, Foley AM, Brown M (2012) Sex hormones differentially influence voluntary running activity, food intake and body weight in aging female and male rats. *Eur J Appl Physiol*. 112:3007-18. doi: 10.1007/s00421-011-2271-y

Ferrucci, L., & Fabbri, E. (2018). Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology*, 15(9), 505-522.

Fielder, E., Tweedy, C., Wilson, C., Oakley, F., LeBeau, F. E., Passos, J. F., ... & Jurk, D. (2020). Anti-inflammatory treatment rescues memory deficits during aging in *nfkb1*<sup>-/-</sup> mice. *Aging Cell*, 19(10), e13188.

Fowler CF, Madularu D, Dehghani M, Devenyi GA, Near J (2021) Longitudinal quantification of metabolites and macromolecules reveals age- and sex-related changes in the healthy Fischer 344 rat brain. *Neurobiol Aging*. 101:109-122. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.12.012.

Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 908(1), 244-254.

Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C., & Santoro, A. (2018). Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(10), 576-590.

Friedman, J. (2011). Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress?. In *Oxidative stress and free radical damage in neurology* (pp. 19-27). Humana Press

Fulop, T., Larbi, A., Pawelec, G., Khalil, A., Cohen, A. A., Hirokawa, K., ... & Franceschi, C. (2021). Immunology of aging: the birth of inflammaging. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 1-14.

Gaignard P, Savouroux S, Liere P, Pianos A, Thérond P, et al (2015) Effect of Sex Differences on Brain Mitochondrial Function and Its Suppression by Ovariectomy and in Aged Mice. *Endocrinology*. 156:2893-904. doi: 10.1210/en.2014-1913

Gan, N., Wu, Y. C., Brunet, M., Garrido, C., Chung, F. L., Dai, C., & Mi, L. (2010). Sulforaphane activates heat shock response and enhances proteasome activity through up-regulation of Hsp27. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35528-35536.

Gassen, N. C., Chrousos, G. P., Binder, E. B., & Zannas, A. S. (2017). Life stress, glucocorticoid signaling, and the aging epigenome: implications for aging-related diseases. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 74, 356-365.

González-Puertos, V. Y., Maciel-Barón, L. Á., Barajas-Gómez, B. A., López-Diazguerrero, N. E., & Königsberg, M. (2015). Participación del fenotipo secretor de

las células senescentes en el desarrollo del cáncer, el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad. *Gaceta Médica Mexicana*, 151, 491-500.

Greco T, Fiskum G (2010) Brain mitochondria from rats treated with sulforaphane are resistant to redox-regulated permeability transition. *J Bioenerg Biomembr*. 42:491-7. doi: 10.1007/s10863-010-9312-9

Greco T, Shafer J, Fiskum G (2011) Sulforaphane inhibits mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 51:2164-71. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.017

Guerrero-Beltrán, C. E., Calderón-Oliver, M., Pedraza-Chaverri, J., & Chirino, Y. I. (2012). Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(5), 503-508.

Gurvich C, Le J, Thomas N, Thomas EHX, Kulkarni J (2021) Sex hormones and cognition in aging. *Vitam Horm*. 115:511-533. doi: 10.1016/bs.vh.2020.12.020

Hamson DK, Roes MM, Galea LA (2016) Sex Hormones and Cognition: Neuroendocrine Influences on Memory and Learning. *Compr Physiol*. 6:1295-337. doi: 10.1002/cphy.c150031. PMID: 27347894

Hariton, F., Xue, M., Rabbani, N., Fowler, M., & Thornalley, P. J. (2018). Sulforaphane delays fibroblast senescence by curbing cellular glucose uptake, increased glycolysis, and oxidative damage. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.

Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry, *Journal of Gerontology*, Volume 11, Issue 3, July 1956, Pages 298–300, <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>

Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25(3), 585-621.

Hernández-Álvarez D, Mena-Montes B, Toledo-Pérez R et al (2019) Long-term moderate exercise combined with metformin treatment induces an hormetic response that prevents strength and muscle mass loss in old female Wistar rats. *Oxid Med Cell Longev* 2019:3428543. <https://doi.org/10.1155/2019/3428543>

Hernández-Arciga, U., Hernández-Álvarez, D., López-Cervantes, S. P., López-Díazguerrero, N. E., Alarcón-Aguilar, A., Luna-López, A., & Königsberg, M. (2020). Effect of long-term moderate-exercise combined with metformin-treatment on antioxidant enzymes activity and expression in the gastrocnemius of old female Wistar rats. *Biogerontology*, 21(6), 787-805.

Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., ... & Felipo, V. (2016). Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 1-13.

Huang, T. T., Carlson, E. J., Gillespie, A. M., Shi, Y., & Epstein, C. J. (2000). Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span

in mice. *Journals of Gerontology-Biological Sciences and Medical Sciences*, 55(1), B5.

Hung, C. W., Chen, Y. C., Hsieh, W. L., Chiou, S. H., & Kao, C. L. (2010). Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing research reviews*, 9, S36-S46. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2017). Estadísticas a propósito del día internacional de las personas de edad 2017.

Jardim FR, Almeida FJS, Luckachaki MD, Oliveira MR (2020) Effects of sulforaphane on brain mitochondria: mechanistic view and future directions. *J Zhejiang Univ Sci B*. 21:263-279. doi: 10.1631/jzus.B1900614.

Jin, W., Wang, H., Yan, W., Xu, L., Wang, X., Zhao, X., ... & Ji, Y. (2008). Disruption of Nrf2 enhances upregulation of nuclear factor- $\kappa$ B activity, proinflammatory cytokines, and intercellular adhesion molecule-1 in the brain after traumatic brain injury. *Mediators of inflammation*, 2008.

Jones, D. P. (2015). Redox theory of aging. *Redox biology*, 5, 71-79.

Kander MC, Cui Y, Liu Z (2017) Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med*. 21:1024-1032. doi: 10.1111/jcmm.13038

Kim, S. C., Choi, B., & Kwon, Y. (2017). Thiol-reducing agents prevent sulforaphane-induced growth inhibition in ovarian cancer cells. *Food & nutrition research*, 61(1), 1368321.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & development*, 24(22), 2463-2479.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & development*, 24(22), 2463-2479.

Lavich, I. C., De Freitas, B. S., Kist, L. W., Falavigna, L., Dargél, V. A., Köbe, L. M., ... & de Lima, M. N. M. (2015). Sulforaphane rescues memory dysfunction and synaptic and mitochondrial alterations induced by brain iron accumulation. *Neuroscience*, 301, 542-552.

Liang J, Jahraus B, Balta E, Ziegler JD, Hübner K, et al (2018) Sulforaphane Inhibits Inflammatory Responses of Primary Human T-Cells by Increasing ROS and Depleting Glutathione. *Front Immunol.* 9:2584. doi: 10.3389/fimmu.2018.02584

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., ... & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757.

Liu J, Chandaka GK, Zhang R, Parfenova H (2020) Acute antioxidant and cytoprotective effects of sulforaphane in brain endothelial cells and astrocytes during inflammation and excitotoxicity. *Pharmacol Res Perspect.* 8:e00630. doi: 10.1002/prp2.630

López-Diazguerrero, N. E., Garduño, C. M. M., & Fainstein, M. K. (2005). La senescencia replicativa como una respuesta celular al estrés. *Revista de Educación Bioquímica*, 24(2), 47-53.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.

Maciel-Barón, L. A., Moreno-Blas, D., Morales-Rosales, S. L., González-Puertos V. Y., López-Díazguerrero, N. E., Torres, C., ... & Königsberg, M. (2017). Cellular senescence, neurological function and redox state. *Antioxidants and Redox Signaling*,

Maciel-Barón, L. Á., Morales-Rosales, S. L., Silva-Palacios, A., Rodríguez-Barrera, R. H., García-Álvarez, J. A., Luna-López, A., ... & Königsberg, M. (2018). The secretory phenotype of senescent astrocytes isolated from Wistar newborn rats changes with anti-inflammatory drugs, but does not have a short-term effect on neuronal mitochondrial potential. *Biogerontology*, 19(5), 415-433.

Malavolta, M., Bracci, M., Santarelli, L., Sayeed, M. A., Pierpaoli, E., Giacconi, R., ... & Provinciali, M. (2018). Inducers of senescence, toxic compounds, and senolytics: the multiple faces of Nrf2-activating phytochemicals in cancer adjuvant therapy. *Mediators of inflammation*, 2018.

Malutan, A. M., Dan, M., Nicolae, C., & Carmen, M. (2014). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine changes related to menopause. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny*, 13(3), 162-168.

Mao L, Yang T, Li X, Lei X, Sun Y, Zhao Y, Zhang W, Gao Y, Sun B, Zhang F (2019) Protective effects of sulforaphane in experimental vascular cognitive impairment:

Contribution of the Nrf2 pathway. *J Cereb Blood Flow Metab.* 39:352-366. doi: 10.1177/0271678X18764083.

Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V., & Marcos, J. C. (2014). Simplified 2, 4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical biochemistry*, 458, 69- 71.

Milan-Mattos, J. C., Anibal, F. D. F., Perseguini, N. M., Minatel, V., Rehder-Santos, P., Castro, C. A., ... & Catai, A. M. (2019). Effects of natural aging and gender on pro-inflammatory markers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52.

Mongelli, A., Atlante, S., Barbi, V., Bachetti, T., Martelli, F., Farsetti, A., & Gaetano, C. (2020). Treating senescence like cancer: novel perspectives in senotherapy of chronic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7984.

Morrison JH, Baxter MG (2012) The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci.* 13:240-50. doi: 10.1038/nrn3200

Morrone F, Tarozzi A, Sita G, Bolondi C, Zolezzi Moraga JM, Cantelli-Forti G, Hrelia P (2013) Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 36:63-71. doi: 10.1016/j.neuro.2013.03.004

Nehlin, J.O. (2021). Gerosuppressive and Senolytic Nutrients. In: Rattan, S.I.S., Kaur, G. (eds) *Nutrition, Food and Diet in Ageing and Longevity. Healthy Ageing and Longevity*, vol 14. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-83017-5\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-030-83017-5_22)

Neves, J., & Sousa-Victor, P. (2020). Regulation of inflammation as an anti-aging intervention. *The FEBS journal*, 287(1), 43-52.

O'Mealey, G. B., Berry, W. L., & Plafker, S. M. (2017). Sulforaphane is a Nrf2-independent inhibitor of mitochondrial fission. *Redox biology*, 11, 103-110.

Papaconstantinou, J. (2019). The role of signaling pathways of inflammation and oxidative stress in development of senescence and aging phenotypes in cardiovascular disease. *Cells*, 8(11), 1383.

Pérez, V. I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C. J., Vijg, J., & Richardson, A.

(2009). The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging cell*, 8(1), 73-75.

Pu, D., Zhao, Y., Chen, J., Lv, A., Zhu, S., Luo, C., ... & Xiao, Q. (2018). Protective Effects of Sulforaphane on Cognitive Impairments and AD-like Lesions in Diabetic Mice are Associated with the Upregulation of Nrf2 Transcription Activity. *Neuroscience*, 381, 35-45.

Qi T, Xu F, Yan X, Li S, Li H (2016) Sulforaphane exerts anti-inflammatory effects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through the Nrf2/ARE pathway. *Int J Mol Med*. 37:182-8. doi: 10.3892/ijmm.2015.2396

Rattan SI, Fernandes RA, Demirovic D, Dymek B, Lima CF (2009) Heat stress and hormetin-induced hormesis in human cells: effects on aging, wound healing,

angiogenesis, and differentiation. *Dose Response*. 7:90-103. doi: 10.2203/dose-response.08-014.

Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V (2007) Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res*. 1176:71-81. doi: 10.1016/j.brainres.2007.08.036

Ruhee RT, Suzuki K (2020) The Integrative Role of Sulforaphane in Preventing Inflammation, Oxidative Stress and Fatigue: A Review of a Potential Protective Phytochemical. *Antioxidants (Basel)*. 9:521. doi: 10.3390/antiox9060521

Salminen, A., & Kaarniranta, K. (2010). Genetics vs. entropy: longevity factors suppress the NF- $\kappa$ B-driven entropic aging process. *Ageing research reviews*, 9(3), 298-314.

Santín-Márquez R, Alarcón-Aguilar A, López-Diazguerrero NE, Chondrogianni N, Königsberg M (2019) Sulforaphane - role in aging and neurodegeneration. *Geroscience*.41:655-670. doi: 10.1007/s11357-019-00061-7

Songkiatisak, P., Rahman, S. M. T., Aqdas, M., & Sung, M. H. (2022). NF- $\kappa$ B, a culprit of both inflamm-ageing and declining immunity?. *Immunity & Ageing*, 19(1), 1-8.

Sparkman, N. L., & Johnson, R. W. (2008). Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation*, 15(4-6), 323-330.

Strehler, B. L. (1962) *Time, Cells and Aging*, 1st ed., Academic Press, New York.

Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM (2004) Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3381-6. doi: 10.1073/pnas.0400282101.

Sumien N, Cunningham JT, Davis DL, Engelland R, Fadeyibi O, et al (2021) Neurodegenerative Disease: Roles for Sex, Hormones, and Oxidative Stress. *Endocrinology.* 162:bqab185. doi: 10.1210/endocr/bqab185

Sun Y, Zhou S, Guo H, Zhang J, Ma T, Zheng Y, Zhang Z, Cai L (2019) Protective effects of sulforaphane on type 2 diabetes-induced cardiomyopathy via AMPK-mediated activation of lipid metabolic pathways and NRF2 function. *Metabolism.* 102:154002. doi: 10.1016/j.metabol.2019.154002.

Tan, Y. L., Yuan, Y., & Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular psychiatry*, 25(2), 351-367.

Torres C, Lewis L, Cristofalo VJ. (2006). Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescent-like phenotype of human fibroblasts. *J Cell Physiol*;207(3):845-53.

Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol.*;35(8): 927-45.

Triana-Martinez, F., Pedraza-Vazquez, G., Maciel-Baron, L. A., & Königsberg, M. (2016). Reflections on the role of senescence during development and aging. *Archives of biochemistry and biophysics*, 598, 40-49.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). *World Population Ageing 2015* (ST/ESA/SER.A/390).

van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439-446.

Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardó FV (2005) Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2005:pe17. doi: 10.1126/sageke.2005.23.pe17

Wang J, Sareddy GR, Lu Y, Pratap UP, Tang F, et al (2020) Astrocyte-Derived Estrogen Regulates Reactive Astrogliosis and is Neuroprotective following Ischemic Brain Injury. *J Neurosci*. 40:9751-9771. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0888-20.2020

Wang S, Lai X, Deng Y, Song Y (2020) Correlation between mouse age and human age in anti-tumor research: Significance and method establishment. *Life Sci*. 242:117242. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117242.

World Health Organization. (2015). *World report on ageing and health*. Geneva: World Health Organization.

Yankner, B. A., Lu, T., & Loerch, P. (2008). The aging brain. *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.*, 3, 41-66.

Zhao, F., Zhang, J., & Chang, N. (2018). Epigenetic modification of Nrf2 by sulforaphane increases the antioxidative and anti-inflammatory capacity in a cellular model of Alzheimer's disease. *European journal of pharmacology*, 824, 1-10.

Zhou Q, Chen B, Wang X, Wu L, Yang Y, (2016) Sulforaphane protects against rotenone-induced neurotoxicity in vivo: Involvement of the mTOR, Nrf2, and autophagy pathways. *Sci Rep*.6:32206. doi: 10.1038/srep32206

Zoccarato, A., Nabeebaccus, A. A., Oexner, R. R., Santos, C. X., & Shah, A. M. (2022). The nexus between redox state and intermediary metabolism. *The FEBS Journal*, 289(18), 5440-5462.

Zuo, L., Prather, E. R., Stetskiv, M., Garrison, D. E., Meade, J. R., Peace, T. I., & Zhou, T. (2019). Inflammaging and oxidative stress in human diseases: from molecular mechanisms to novel treatments. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4472.

**11 Financiamiento:** Este proyecto fue financiado por CONACyT como parte de un proyecto de FRONTERAS EN LA CIENCIA FON.INST/298/2016.

## 12 Publicaciones

GeroScience  
https://doi.org/10.1007/s11357-019-00061-7

ORIGINAL ARTICLE



# Sulforaphane - role in aging and neurodegeneration

Roberto Santín-Márquez · Adriana Alarcón-Aguilar ·  
Norma Edith López-Diazguerrero ·  
Niki Chondrogianni · Mina Königsberg

Received: 26 January 2019 / Accepted: 14 March 2019  
© American Aging Association 2019

**Abstract** In the last several years, numerous molecules derived from plants and vegetables have been tested for their antioxidant, anti-inflammatory, and anti-aging properties. One of them is sulforaphane (SFN), an isothiocyanate present in cruciferous vegetables. SFN activates the antioxidant and anti-inflammatory responses by inducing Nrf2 pathway and inhibiting NF- $\kappa$ B. It also has an epigenetic effect by inhibiting HDAC and DNA methyltransferases and modifies mitochondrial dynamics. Moreover, SFN preserves proteome homeostasis (proteostasis) by activating the proteasome, which has been shown to lead to increased cellular lifespan and prevent neurodegeneration. In this review, we describe some of the molecular and physical characteristics of SFN, its mechanisms of action, and the effects that SFN treatment induces in order to discuss its relevance as a “miraculous” drug to prevent aging and neurodegeneration.

**Keywords** Proteasome · Oxidative stress · Nrf2 · NF- $\kappa$ B · HDAC

## Sulforaphane

### Discovery and isolation

Since 1980s, it was known that the consumption of green and yellow vegetables (leafy green vegetables, cauliflower, carrots, broccoli, Brussel sprouts, etc.) was related to a reduction in the risk of developing certain types of cancer (Colditz et al. 1985). Later, studies showed that some molecules contained in those vegetables were capable to induce xenobiotic metabolism and antioxidant enzyme activation and, as a common feature, those molecules were glutathione S-transferase (GST) substrates, becoming potential protective agents against developing cancer (Talalay et al. 1988). Later, different green and yellow vegetables were tested to determine which of those molecules could activate phase II enzyme activity, with the cruciferous family being the one that enhanced these enzymatic activities the most, particularly broccoli and Brussel sprout extracts (Prochaska et al. 1992). Almost immediately, an isothiocyanate described as “a potent phase II enzymes inducer” was isolated from broccoli extracts, and was identified by spectroscopic methods as-1-isothiocyanato-(4R)-(methylsulfinyl) butane or sulforaphane (SFN); (Zhang et al. 1992). Phase II enzymes are composed of antioxidant and conjugating enzyme which are capable of enhancing xenobiotic hydrophilicity, facilitating their excretion, promoting cell detoxification and

R. Santín-Márquez · A. Alarcón-Aguilar ·  
N. E. López-Diazguerrero · M. Königsberg (✉)  
Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias  
Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma  
Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-535, 09340 Mexico City,  
Mexico  
e-mail: mkf@xanum.uam.mx

R. Santín-Márquez  
Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma  
Metropolitana-Iztapalapa, 09340 Mexico City, Mexico

N. Chondrogianni  
National Hellenic Research Foundation, Institute of Biology,  
Medicinal Chemistry and Biotechnology, Athens, Greece

Springer



## Sensory and memory processing in old female and male Wistar rat brain, and its relationship with the cortical and hippocampal redox state

Roberto Santín-Márquez · Belén Ramírez-Cordero · Rafael Toledo-Pérez · Armando Luna-López · Norma E. López-Díazguerrero · Ulalume Hernández-Arciga · Marcel Pérez-Morales · Juan José Ortiz-Retana · Martín García-Servín · Sarael Alcauter · Braulio Hernández-Godínez · Alejandra Ibañez-Contreras · Luis Concha · Beatriz Gómez-González · Mina Königsberg 

Received: 4 October 2020 / Accepted: 9 March 2021  
© American Aging Association 2021

**Abstract** The brain is one of the most sensitive organs damaged during aging due to its susceptibility to the aging-related oxidative stress. Hence, in this study, the sensory nerve pathway integrity and the memory were evaluated and related to the redox state, the antioxidant enzymes function, and the protein oxidative damage in the brain cortex (Cx) and the hippocampus (Hc) of young (4-month-old) and old (24-month-old) male and female Wistar rats. Evoked potentials (EP) were performed for the auditory, visual, and somatosensory pathways. In both males and females, the old rat groups' latencies were larger in almost all waves when compared to the young same-sex animals. The novel object test was performed to evaluate memory. The superoxide

dismutase and catalase antioxidant activity, as well as the protein oxidative damage, and the redox state were evaluated. Magnetic resonance (MR) imaging was used to obtain the diffusion tensor imaging, and the brain volume, while MR spectroscopy was used to obtain the brain metabolite concentrations (glutamine, glutamate, Myo-inositol, N-acetyl-aspartate, creatine) in the Cx and the Hc of young and old females. Our data suggest that, although there are limited variations regarding memory and nerve conduction velocity by sex, the differences concerning the redox status might be important to explain the dissimilar reactions during brain aging between males and females. Moreover, the increment in Myo-inositol levels in the Hc of old rats

R. Santín-Márquez · B. Ramírez-Cordero · R. Toledo-Pérez · N. E. López-Díazguerrero · U. Hernández-Arciga · M. Königsberg   
Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, CDMX 09340, México  
e-mail: mkf@xanum.uam.mx

A. Luna-López  
Instituto Nacional de Geriátrica, SSA, CDMX 10200, México

M. Pérez-Morales · B. Gómez-González  
Departamento de Biología de la Reproducción, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, CDMX 09340, México

J. J. Ortiz-Retana · S. Alcauter · L. Concha  
Laboratorio Nacional Enfocado en Imagenología por Resonancia Magnética, Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Mexico

M. García-Servín  
Bioterio, Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Mexico

B. Hernández-Godínez · A. Ibañez-Contreras  
APREXBIO S.A.S de C.V., Laboratorio de Primatología, CDMX, México

R. Santín-Márquez · R. Toledo-Pérez  
Posgrado en Biología Experimental, UAMI, México, México



## Long-term sulforaphane-treatment restores redox homeostasis and prevents cognitive decline in middleaged female and male rats, but cannot revert previous damage in old animals

Roberto Santín-Márquez · Ulalume Hernández-Arciga · Verónica Salas-Venegas · Rafael Toledo-Pérez · Stefanie Paola López-Cervantes · Raúl Librado-Osorio · Armando Luna-López · Norma E. López-Diazguerrero · Beatriz Gómez-González · Mina Königsberg

Received: 22 May 2022 / Accepted: 2 August 2022  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

**Abstract** Aging is a complex and detrimental process, which disrupts most organs and systems within the organisms. The nervous system is morphologically and functionally affected during normal aging, and oxidative stress has been involved in age-related damage, leading to cognitive decline and neurodegenerative processes. Sulforaphane (SFN) is a hormetin that activates the antioxidant and anti-inflammatory responses. So, we aimed to evaluate if SFN long-term treatment was able to prevent age-associated cognitive decline in adult and old female and male rats. Memory was evaluated in adult (15-month-old), and

old (21-month-old) female and male Wistar rats after three months of SFN treatment. Young rats (4-month-old) were used as age controls. The antioxidant response induction, the redox state (GSH/GSSG), and oxidative damage were determined in the brain cortex (Cx) and hippocampus (Hc). Our results showed that SFN restored redox homeostasis in the Cx and Hc of adult rats, thus preventing cognitive decline in both sexes; however, the redox responses were not the same in males and females. Old rats were not able to recover their redox state as adults did, but they had a mild improvement. These results suggest that SFN mainly prevents rather than reverts neural damage; though, there might also be a range of opportunities to use hormetins like SFN, to improve redox modulation in old animals.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10522-022-09984-9>.

R. Santín-Márquez · U. Hernández-Arciga · V. Salas-Venegas · R. Toledo-Pérez · S. P. López-Cervantes · N. E. López-Diazguerrero · M. Königsberg (✉)  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,  
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad  
Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-535, C.P.  
09340 Mexico City, Mexico  
e-mail: mkf@xanum.uam.mx

R. Librado-Osorio · A. Luna-López  
Instituto Nacional de Geriátría, SSA, 10200 Mexico City,  
Mexico

B. Gómez-González  
Departamento de Biología de la Reproducción, DCBS,  
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa,  
09340 Mexico City, Mexico

**Keywords** Aging · Memory · GSH · Antioxidant enzymes · Brain · Cognition

### Introduction

Aging is a complex multifactorial biological process that is triggered by several intrinsic and extrinsic factors, contributing to the cellular and organismal physiological decline and impairment of stress-containing molecular pathways, which lead to frailty and increased risk of developing age-related diseases (Mc Auley et al. 2017; Titorenko 2018; Zhang et al. 2020).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00146

Matrícula: 2163802553

Efectos del sulforafano sobre el estado redox y la inflamación en el sistema nervioso central de ratas Wistar viejas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 23 del mes de enero del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO  
DR. ARMANDO LUNA LOPEZ  
DRA. ADRIANA ALARCON AGUILAR  
DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ROBERTO SANTIN MARQUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ROBERTO SANTIN MARQUEZ  
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

VOCAL

DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

VOCAL

DRA. ADRIANA ALARCON AGUILAR

SECRETARIA

DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS