

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

Efectos del sulforafano sobre la velocidad de conducción nerviosa y su relación con el estado redox en la corteza cerebral e hipocampo de ratas viejas

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A

Roberto Santín Márquez

Comité de tutores:

Directora: Dra. Mina Königsberg Fainstein

Asesora interna: Dra. Beatriz Gómez González

Asesora externa: Dra. Hermelinda Salgado Ceballos

06/2018

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; en el Laboratorio de neurofisiología de APREXBIO; en el Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla; en la Unidad de Bioquímica del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; y en el Laboratorio de Biofísica y Simulación, Departamento de Ingeniería Eléctrica, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 616066

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 la velocidad de conducción nerviosa y su relación con el estado redox en la corteza cerebral e hipocampo de ratas viejas", que presentó **Roberto Santín Márquez** el día 03 de septiembre del año 2018.

Presidente: Dra. Beatriz Gómez González
Departamento de Biología de la Reproducción
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: Dra. Anahí Chavarría Krauser
Laboratorio de Neuroinmunología
Departamento de Medicina Experimental
Hospital General de México



Vocal: Dra. María Cristina González Torres
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa



Comité Tutorial:

Directora de Tesis: Dra. Mina Königsberg Fainstein

Profesora titular C, Dpto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

mkf@xanum.uam.mx

+(5255) 5804 4732

Asesora Interna: Dra. Beatriz Gómez González

Profesora titular C, Dpto. 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, Hospital de especialidades CMN
Siglo XXI, IMSS

melisalce@yahoo.com

+(5255) 1051 2512

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, que me ha acompañado siempre, guiándome y apoyándome cuando más los necesito. Especialmente quiero agradecer a mi mamá y mi hermano, que han estado conmigo en los buenos y malos momentos ofreciéndome su apoyo incondicional, sus valiosos consejos y en especial su cariño. Ustedes son quienes me motivan cada día a seguir adelante. Gracias por impulsarme siempre a tratar de mejorar y dar lo mejor de mí cada día. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

De igual manera quiero agradecer a mi pareja, Itzel, quien me ha acompañado durante casi 6 años en todo momento, brindándome su cariño, consejos, confianza y apoyo en lo que decido. Muchas gracias por seguir conmigo durante todo este tiempo y compartir tantas experiencias juntos. Definitivamente eres la mejor novia y compañera que existe.

Quiero agradecer también a la familia Morales-Hernández, que ha sido un gran apoyo para mí durante esta etapa de mi vida. Gracias por aceptarme como uno más de su familia, por sus consejos y la ayuda que desinteresadamente me han ofrecido desde el momento en que nos conocimos.

Agradezco también a la Dra. Mina Königsberg, que en todo momento me ofreció su guía y consejos para desarrollar este trabajo. Gracias por confiar en mí y por todo el tiempo que le dedicó a este proyecto. Y gracias por estar siempre pendiente de todas los aspectos del proyecto.

Muchas gracias a la Dra. Beatriz Gómez, que aportó mucho durante el desarrollo de este trabajo y quien siempre estuvo pendiente de lo que se necesitaba para su realización. Le agradezco el apoyo que nos brindó cuando más lo necesitamos y que siempre tuviera tiempo para comentar los avances del proyecto.

También agradezco a la Dra. Hermelinda Salgado, que nos brindó muchos comentarios y sugerencias muy valiosas en todo momento. Agradezco sus enseñanzas y aportaciones al trabajo y las de su equipo de trabajo que en todo momento fueron muy amables y pacientes.

Agradezco al Dr. Martín García Servín por proporcionar los animales necesarios para los estudios de resonancia magnética y por siempre ofrecer su apoyo incondicional en el cuidado de los animales durante su estadía en el campus.

Quiero agradecer también al Mto. Juan José Ortiz Retana por todo su apoyo en el manejo del equipo de resonancia magnética, además de quedarse hasta tarde para poder terminar los ensayos a pesar de todos los contratiempos.

Agradezco al Dr. Alejandro Zentella Dehesa y al Dr. José Rafael Godínez Fernández por permitirme trabajar en sus laboratorios durante algunas etapas del proyecto.

También quiero agradecer a Alejandra Ibañez, quien me ayudó y enseñó durante la realización de los potenciales evocados. Gracias por tu tiempo y tu paciencia durante la que para mí fue la etapa más difícil del proyecto, pero sobre todo por tus valiosos consejos.

Agradezco también a mis compañeros del laboratorio, por sus sugerencias y aportaciones, además de su buen humor, incluso en los momentos más difíciles. Especialmente quiero agradecer a Rafael Toledo, quien sin importar la hora o el lugar me brindó siempre su apoyo y guía para la realización de muchos experimentos de este trabajo.

Agradezco a mi compañera Blanquita que ha sido un gran apoyo en el cuidado de los animales en el bioterio, además de siempre aportar nuevas ideas para mejorar las condiciones de nuestros animales.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos de mi generación de maestría, Vero, Angüi y Nayarit (Ulises) que me acompañaron siempre con muy buen humor y me brindaron su amistad desde el inicio.

Resumen

El envejecimiento es un proceso multifactorial, universal, progresivo y deletéreo que se da con el paso del tiempo en los seres vivos y que tiene como consecuencia el declive en las funciones fisiológicas de los organismos, aumentando su vulnerabilidad y que, finalmente, los conduce a la muerte. Uno de los órganos más sensibles a sufrir daños durante el envejecimiento es el cerebro, debido a que es muy susceptible al daño por estrés oxidante característico del envejecimiento. Por lo tanto en este estudio se evaluó la relación entre la velocidad de conducción nerviosa, dada por la mielinización y la integridad de las vías nerviosas sensoriales. Esta relación está tiene que ver con el estado redox de la corteza y el hipocampo, la función de las enzimas antioxidantes y el daño oxidante de las proteínas ratas machos y hembras jóvenes (4 meses) y viejas (21 y 24 meses). A los 21 meses de edad los animales fueron tratados con sulforafano (SFN) por 3 meses. Se realizaron potenciales evocados de las vías sensoriales auditiva, visual, somatosensorial medial y tibial en machos y hembras. Las latencias fueron más largas en la mayoría de las ondas en las ratas viejas, sin embargo, el tratamiento con SFN parece tener un efecto protector sobre la velocidad de conducción en todas las vías sensoriales sólo en los machos, sin embargo, el número de animales que alcanzaron los 24 meses de edad fue muy reducido. En los análisis estructurales por resonancia magnética (MRI) se encontró una disminución en el volumen de la corteza, pero no del hipocampo. No se encontró ningún efecto aparente del SFN sobre el volumen de la corteza o el hipocampo. En cuanto al estado redox, la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Cat) no se notó algún efecto con el tratamiento con SFN, lo que puede ser un indicativo de que el SFN brinde protección por una vía alterna a la de Nrf2 y el estado redox

Abstract

Aging is a multifactorial, universal, progressive and deleterious process, which is time-dependent in the living beings. Its main feature is a physiological function decline and increased vulnerability that finally, trigger the organism death. Brain is one of the more sensible organs that are damaged during aging, because of its susceptibility to the aging-related oxidative stress. Thus in this study, the relation between the nerve conduction velocity, given by myelination and sensory nerve pathways integrity, was evaluated. Furthermore, this relation was linked with the brain cortex and hippocampus redox state, antioxidant enzymes function, and protein oxidative damage in young (4 months) and old (21 and 24 months) male and female rats. At 21 months of age, animals were treated with sulforaphane (SFN) for 3 months. Evoked potentials were performed for the auditory, visual, median and tibial somatosensory pathways. In both, males and females, the latencies were larger in the old rats groups in almost all waves; nevertheless, the SFN appears to have a protector effect on the nerve conduction velocity of all sensory pathways only in males, however the number of animals that achieved the 24 months of age was very reduced. In the morphometric magnetic resonance images assays (MRI) a decrease in the total volume of the brain cortex was detected in the old rats groups, but no difference was found in the hippocampus volume. There was not apparent effect of SFN in the total volume of neither brain cortex nor hippocampus.

Regarding to the redox state, the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity were not different between the young rats and the old rats groups, even with the SFN treatment. This could suggest that the protection effect given by SFN on the nerve conduction velocity might be related to an alternative pathway, different of the classical Nrf2 pathway, which improves the brain redox state.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Envejecimiento y su relación con el estado redox.....	1
1.2 El sistema nervioso durante el envejecimiento	3
1.3 Daño oxidante en el sistema nervioso durante el envejecimiento	6
1.4 El sulforafano como un posible modulador del estado redox y protector del daño cerebral.....	8
2. Antecedentes.....	10
3. Planteamiento del problema.....	13
3.1 Justificación.....	13
3.2 Pregunta de investigación.....	15
3.3 Objetivo general	15
3.4 Objetivos particulares	15
4. Hipótesis	15
5. Material y métodos	16
5.1 Animales.....	16
5.2 Administración de sulforafano	17
5.3 Pruebas <i>in vivo</i>	17
5.3.1 Manejo anestésico.....	17
5.3.2 Potenciales evocados.....	18
5.3.2.1 Potenciales evocados de tallo cerebral.....	18
5.3.2.2 Potenciales evocados visuales.....	18
5.3.2.3 Potenciales evocados somatosensoriales mediales y tibiales.....	19
5.3.3 Medición de volumen por resonancia magnética.....	20
5.4 Pruebas bioquímicas	20
5.4.1 Determinación del cociente GSH/GSSG.....	20
5.4.2 Determinación de actividad antioxidante	21

5.4.2.1	Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa.....	22
5.4.2.2	Determinación de la actividad de la catalasa.....	22
5.4.3	Determinación de daño a proteínas por carbonilación	23
5.4.4	Análisis estadísticos	23
6.	Resultados.....	24
6.1	Porcentaje de supervivencia.....	24
6.2	Potenciales evocados.....	25
6.2.1	Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral.....	26
6.2.2	Potenciales evocados visuales	29
6.2.3	Potenciales evocados somatosensoriales mediales	31
6.2.4	Potenciales evocados somatosensoriales tibiales.....	33
6.3	Medición de volumen de estructuras cerebrales por resonancia magnética.....	36
6.4	Pruebas bioquímicas	38
6.4.1	Determinación del estado redox.....	39
6.4.2	Daño a proteínas por carbonilación	40
6.4.3	Actividad enzimática antioxidante de la superóxido dismutasa	42
6.4.4	Actividad enzimática antioxidante de la catalasa	43
7.	Discusión	44
8.	Conclusión	49
9.	Perspectivas	50
10.	Referencias.....	50

1. Introducción

1.1 Envejecimiento y su relación con el estado redox

Actualmente se considera al envejecimiento como un proceso multifactorial, universal, progresivo y deletéreo que se da con el paso del tiempo en los seres vivos, que tiene como consecuencia el declive en las funciones fisiológicas de los organismos, aumentando su vulnerabilidad y que, finalmente, los conduce a la muerte (Strehler, 1962; López-Otín *et al.*, 2012; *World Health Organization*, 2015).

Se han formulado distintas teorías para tratar de entender los factores que desencadenan dicho proceso. Una de las hipótesis que tuvo más impacto fue la formulada por Denham Harman (1956), quien propuso que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de biomoléculas dañadas a lo largo del tiempo como consecuencia de reacciones endógenas que involucran la participación de los radicales libres, es decir, moléculas con un electrón desapareado en su último orbital, originados principalmente en el proceso de la reducción del oxígeno hasta agua en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Harman propuso que la acumulación de las moléculas oxidadas tendría una relación directa con el deterioro asociado al envejecimiento, y que su disminución tendría implicaciones en la longevidad de los organismos (Harman, 1992). Años más tarde se realizaron experimentos con animales transgénicos en los que se aumentó la expresión de enzimas antioxidantes o bien se inhibió su expresión para determinar su efecto sobre la longevidad, y sorprendentemente no se encontraron cambios significativos entre el tiempo de vida de los animales con enzimas antioxidantes sobreexpresadas o inhibidas, y los control (Huan, *et al.*, 2000; Pérez, *et al.*, 2009).

Por tal motivo se replanteó la teoría del envejecimiento de Harman y se propuso que la disminución de los efectos adversos productos de las reacciones con radicales libres no eran suficientes para poder retrasar el proceso de envejecimiento, pero si podían tener un papel en el incremento de la susceptibilidad a enfermedades.

Posteriormente se propuso al envejecimiento como un proceso multifactorial, provocado tanto por causas intrínsecas como causas extrínsecas, que generan problemas en la capacidad de adaptación del organismo, aumentando su vulnerabilidad (World Health Organization, 2015). Además, se propusieron nueve marcadores celulares y moleculares que contribuyen al proceso de envejecimiento, y que en conjunto determinan el fenotipo de los organismos viejos. Estos son: inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, desregulación en la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, desgaste de células madre, y comunicación celular alterada (López-Otín *et al.*, 2012).

Es interesante mencionar que la teoría de Harman no fue descartada por completo, ya que años más tarde Dean P. Jones (2015) propuso que todos estos marcadores mencionados anteriormente, están orquestados por el estado redox, que se vuelve más oxidado a medida que los organismos envejecen, mermando su capacidad adaptativa para responder ante el *exposoma*, que definió como las condiciones a las que un organismo está expuesto a lo largo de la vida. Esta disminución de la capacidad de respuesta la adjudica a la falla de los componentes moleculares que forman parte de las vías de regulación redox que

permiten la interacción entre el genoma y el exposoma, dando al estado redox el papel de modulador de los marcadores del envejecimiento en lugar del causante del mismo.

1.2 El sistema nervioso durante el envejecimiento

Se sabe que el sistema nervioso es uno de los sistemas más afectados durante el envejecimiento, y muchas de las enfermedades asociadas al envejecimiento son patologías provocadas por la neurodegeneración en los circuitos neurales, así como la disfunción de las células gliales (Yanker, *et al.*, 2008). Esto podría deberse a la alta sensibilidad del sistema nervioso para caer en un estado de estrés oxidante por diversas características intrínsecas que lo vuelven especialmente susceptible a cambios en el estado redox. Por ejemplo: su alto consumo de oxígeno que podría traducirse en concentraciones considerables de especies reactivas de oxígeno, su alto contenido de lípidos que pueden ser oxidados, al igual que la auto oxidación de moléculas precursoras de neurotransmisores, una baja capacidad antioxidante en comparación con otros órganos, y su alto contenido de hierro (Friedman, 2011). Siendo el sistema nervioso fundamental para la movilidad de los organismos, y para interactuar con el medio ambiente, es importante estudiar y entender los procesos de envejecimiento que ocurren en éste y, así, proponer posibles estrategias para disminuir o retrasar su degeneración con el paso del tiempo.

El sistema nervioso se divide en dos partes principales: sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. El sistema nervioso central está formado por el encéfalo y por la médula espinal (Carlson, 2007). Mientras que el sistema nervioso periférico está compuesto por los nervios periféricos (que pueden ser sensoriales, autonómicos, motores o mixtos), sus ganglios asociados, los plexos dorsales, y los receptores sensoriales, por lo que sirve como un sensor de lo que ocurre, tanto dentro, como fuera del organismo (Walsh *et al.*, 2015). Este último puede definirse como un intermediario entre el cerebro y los tejidos periféricos que, al contrario del sistema nervioso central, no se encuentra protegido en su totalidad por hueso (Marieb & Hoehn, 1998; Walsh *et al.*, 2015)

El sistema nervioso periférico se divide a su vez en sistema nervioso autónomo y sistema nervioso somático. El sistema nervioso somático está compuesto por 31 pares de nervios espinales y por 12 pares de nervios craneales, que se encargan de recopilar la información de los órganos sensoriales, músculos, vísceras, y articulaciones (Longstaff, 2002). A esta recopilación de información sensorial llevada por los nervios periféricos mixtos hasta la médula espinal se le conoce como vía aferente, mientras que a las respuestas que viajan de estos nervios hasta los músculos por neuronas motoras se le conoce como vía eferente (Aminoff, 2012).

Una vez que el estímulo llega a los órganos sensoriales, necesita ser traducido y codificado a señales eléctricas por medio de las neuronas sensoriales. El impulso viaja por los axones y se transmite de una neurona a otra por medio de la sinapsis. La velocidad a la que viaje el impulso está determinada por el diámetro del nervio

y por la presencia de vainas de mielina (Gardner & Johnson, 2013). La vaina de mielina está formada por capas apiladas de la membrana celular de los oligodendrocitos en el sistema nervioso central; o por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico enrolladas alrededor del axón y unidas entre cada capa por uniones celulares estrechas mediante proteínas como la claudina (Simons & Nave, 2016). Además, en las membranas celulares de los oligodendrocitos y las células de Schwann se encuentran incluidas proteínas específicas de la vaina de mielina, particularmente la proteína básica de mielina (MBP por sus siglas en inglés) y la proteína proteolípidos (PLP por sus siglas en inglés) que constituyen del 60-80% del total de las proteínas en la vaina de mielina (Morell & Quarles (1999). La mielina favorece la propagación saltatoria del potencial de acción y, por ende, aumenta la velocidad de conducción nerviosa (Ibañez-Contreras, *et al.*, 2014), que es de 150 m/s en fibras mielinizadas, mientras que en las fibras no mielinizadas el impulso nervioso va desde 0.5 m/s hasta una velocidad máxima de 10 m/s (Purves, *et al.*, 2014). La mielina actúa como una capa aislante en el nervio que previene la disipación de la señal eléctrica en el medio que lo rodea (Garbay, *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que la mielina ocupa cerca del 50-60% del peso seco de la materia blanca del sistema nervioso, y que las fibras mielinizadas utilizan hasta 5000 veces menos energía que las fibras no mielinizadas para transmitir el impulso nervioso (Snaidero & Simons, 2014). Debido a esto, es de gran importancia que las capas de mielina se mantengan íntegras para que la velocidad de conducción nerviosa no resulte afectada (Ibañez-Contreras, *et al.*, 2014). Sin

embargo, se sabe que durante el envejecimiento se sufre un proceso de desmielinización en varias regiones del sistema nervioso, lo que ocasiona que no haya una correcta conducción de los impulsos nerviosos (Peters, 2006). Esto podría deberse al aumento del estrés oxidante (el aumento de moléculas pro oxidantes con respecto a las moléculas antioxidantes) característico de la edad, que se relaciona con la pérdida progresiva de las áreas mielinizadas de los axones (Sims-Robinsons, *et al.*, 2013) así como la funcionalidad (Xie, *et al.*, 2013).

1.3. Daño oxidante en el sistema nervioso durante el envejecimiento

Las especies reactivas de oxígeno tienen un papel muy importante en la señalización de procesos celulares normales en el sistema nervioso (Oswald, *et al.*, 2018), principalmente como segundos mensajeros (Shadel & Horvath, 2015). Estos procesos benéficos que pueden tener los incrementos controlados de moléculas pro oxidantes, como las especies reactivas de oxígeno, generalmente se reportan en organismos jóvenes o células derivadas de estos (Bórquez, *et al.*, 2016). Se ha observado que cuando se incrementan levemente las concentraciones intracelulares o extracelulares de especies reactivas de oxígeno en células progenitoras neurales promueven su regeneración y la neurogénesis en embriones de ratones y cultivos celulares (Le Belle, *et al.*, 2011). El aumento de especies reactivas de oxígeno, particularmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en neuronas cultivadas de organismos jóvenes también se relaciona con la prolongación de las dendritas (Chandrasekaran *et al.* 2015), y con el crecimiento axónico (Wilson *et al.* 2015).

Durante el envejecimiento se han observado efectos distintos de las especies reactivas de oxígeno sobre las células del sistema nervioso, ya que son muchos los trabajos en donde se reporta la acumulación de proteínas (Di Domenico, *et al.*, 2010), lípidos (Montine, *et al.*, 2002) y moléculas de ADN (Murali & Panneerselvam, 2007) que han sido dañados por oxidación como consecuencia del aumento en el estado pro oxidante de la célula y de la insuficiencia de las moléculas antioxidantes para contrarrestarlo (Dröge, & Schipper, 2007). El aumento en el estrés oxidante se ve reflejado en la disfunción de estructuras celulares o incluso de células completas, lo que lleva a la desestabilización del correcto funcionamiento de los tejidos durante el envejecimiento (López-Otín *et al.*, 2012). En el sistema nervioso central y periférico una de las principales estructuras dañadas por el estrés oxidante relacionado al envejecimiento es la vaina de mielina de los axones neuronales, alterando la correcta conducción de los impulsos nerviosos (Hamilton, *et al.*, 2016). En el caso de las vías sensoriales, que se componen de largos tractos de fibras mielinizadas, se han realizado varios estudios que relacionan la disminución de la integridad de las vías nerviosas con el aumento en el estrés oxidante y el daño a las macromoléculas. Tal es el caso de la vía visual, en la que se demostró que había una correlación positiva entre el aumento en algunos marcadores de daño a macromoléculas como carbonilación de proteínas, aumento en la lipoperoxidación, así como el aumento en células positivas a marcadores de apoptosis, y la disminución en la cantidad de mielina en los axones del nervio óptico de ratas viejas (El-Sayyad, *et al.*, 2014). En la vía auditiva también se ha reportado la pérdida progresiva de la mielinización en el nervio auditivo, así como la disminución de la cantidad de fibras mielinizadas tanto

en humanos, como en ratones, promoviendo la pérdida de la audición con el paso del tiempo (Xing, *et al.*, 2012). Este mismo patrón se ha observado en nervios periféricos, en los que la velocidad de conducción nerviosa disminuye con la edad, gracias a la pérdida de la mielinización, tanto de los nervios periféricos, como los del sistema nervioso central (Walsh, *et al.*, 2015). También se han encontrado depósitos de proteínas poliubiquitinadas en lisosomas disfuncionales que se relacionan con el estrés oxidante, además de lipoperoxidación, inflamación e infiltración de células inmunes en nervios de ratas viejas (Opalach, *et al.*, 2010).

1.4. El sulforafano como un posible modulador del estado redox y protector del daño cerebral

El sulforafano (SFN; 1-isotiocianato-(4R)-(metilsulfinil) butano) es un compuesto organosulfurado que se obtiene de los vegetales crucíferos, como el brócoli, la coliflor, col, calabaza y coles de bruselas (Lavich, *et al.*, 2015). Su precursor, la glucorafanina (4-metilsulfinilbutil glucosinolato), se encuentra en mayor concentración en el brócoli comparado con otros crucíferos (0.8-21.7 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco), y es hidrolizado por la enzima mirosinasa cuando el vegetal es dañado mecánicamente o atacado por algún patógeno, formando al sulforafano como producto principal (Guerrero-Beltrán, *et al.*, 2012).

La administración de SFN en ratones (Bai, *et al.*, 2013; Pu, *et al.*, 2018) y ratas (Zhao, *et al.*, 2016) promueve la activación de Nrf2 (factor 2 relacionado al factor eritroide 2), que es un regulador maestro de la respuesta de detoxificación celular

y respuesta ante el estrés oxidante, además de promover señales de protección celular. Durante condiciones basales del estado redox, Nrf2 se mantiene reprimido por la proteína Keap1 (proteína 1 asociada a ECH parecida a Kelch) que se encarga de reclutar a la ubiquitín ligasa tipo E3 Cul3, provocando la degradación de Nrf2 por vía proteosomal, manteniendo su vida media alrededor de los 15 minutos (Li, *et al.*, 2004; Silva-Palacios, *et al.*, 2018) Sin embargo, el SFN es capaz de interactuar con la cisteína 151 (Cys151) de Keap1, que es uno de los sensores principales ante estrés oxidante, y que al ser oxidada por el SFN provoca un cambio conformacional en Keap1, liberando a Nrf2 y extendiendo su vida media hasta 3 horas, lo que permite que cumpla su función como factor de transcripción (Li, *et al.*, 2004; Hu, *et al.*, 2011; Dinkova-Kostova, *et al.*, 2017). Posteriormente a la liberación de Keap1, Nrf2 requiere de modificaciones postraduccionales, tales como fosforilaciones, para poder favorecer su translocación al núcleo. Éstas están dadas por cinasas como MAPK o PKC, quienes lo fosforilan en la tirosina 568, lo que se asocia con su localización nuclear; por otra parte la cinasa GSK-3 β también es capaz de fosforilar directamente a Nrf2 en la serina 40, lo que también favorece su importación nuclear (Bhakkiyalakshmi, *et al.*, 2015). Una vez que Nrf2 está en el núcleo se heterodimeriza con proteínas Maf pequeñas (MafG, MafK, MafF) quienes permiten la unión con su secuencia consenso en el ADN, el elemento de respuesta antioxidante (ARE; Silva-Palacios, *et al.*, 2018). Como resultado se transcriben genes blanco como NAD(P)H quinona oxidoreductasa (NQO1), hemoxigenasa 1 (HO-1) y γ -glutamilcisteín ligasa (γ GCL), que proveen protección antioxidante (Guerrero-Beltrán, *et al.*, 2012).

También se han propuesto algunos mecanismos de protección por SFN independientes a la vía de Nrf2, tal como la disminución en la fisión mitocondrial, en donde el SFN actúa directamente sobre las cisteínas de la proteína de fisión Drp1, impidiéndole oligomerizarse para poder llevar a cabo su función (Mealey, *et al.*, 2017). Además inhibe la actividad transcripcional del factor nuclear κ B (NF κ B), así como la translocación nuclear de su subunidad p65, ésta también es una respuesta de protección, ya que NF κ B es responsable de la regulación de diversos genes proinflamatorios (Xu, *et al.*, 2005).

2. Antecedentes

Los potenciales evocados (PE) son una técnica no invasiva que ha sido utilizada en diversos modelos animales para evaluar el funcionamiento de las diferentes vías del sistema nervioso periférico, desde receptores específicos hasta la corteza cerebral, y consisten en la obtención del promedio de una serie de ondas eléctricas en respuesta de la activación secuencial de las estructuras nerviosas por la estimulación de los nervios periféricos (Hernández-Godínez^a, *et al.*, 2011). Gracias a esta técnica se sabe que la velocidad de conducción nerviosa disminuye a medida que los organismos envejecen y que esta disminución en la velocidad se da principalmente en la vía auditiva (Ibañez-Contreras, *et al.*, 2011), en la vía visual (Solís-Chávez, *et al.*, 2012), y en las vías somatosensoriales mediales y tibiales (Hernández-Godínez^a, *et al.*, 2011) y que estos efectos pueden ser causados por la desmielinización de las fibras nerviosas (Ibañez-Contreras, *et al.*, 2016). Los potenciales evocados tienen morfologías expresadas en forma de

ondas que se relacionan con estructuras anatómicas a lo largo de la vía sensorial. En el caso de la vía auditiva hay 5 ondas principales que se generan durante los potenciales evocados (Onda I, II, III, IV y V). La onda I refleja la actividad del nervio auditivo; la onda II representa al núcleo coclear, involucrado en la detección del lado en el que se originó el sonido. La onda III representa al complejo olivar superior, que está relacionado con la determinación del ángulo de llegada del sonido. La onda IV está relacionada con el lemnisco lateral, encargado de detectar la duración de los sonidos y está relacionado con el reflejo de alerta y huida, sin embargo, esta onda también se encuentra relacionada con el colículo inferior, encargado de reconocer sonidos nuevos o familiares. Las ondas IV y V se ven afectadas si cualquiera de las estructuras antes mencionadas se alteran (Chen & Chen, 1991).

La vía visual presenta 3 ondas principales, la onda negativa 1 (N1), la positiva 1 (P1) y la negativa 2 (N2), que corresponden al cuerpo geniculado lateral, corteza visual primaria y corteza visual de asociación, respectivamente (Ibañez-Contreras, *et al.*, 2011).

Marnier, *et al.*, (2003) proponían que aproximadamente se pierde el 45% de fibras mielinizadas de los 20 a los 80 años, y que esta desmielinización es consecuencia directa de la edad. Además, Ibañez-Contreras *et al.* (2018) encontraron un aumento en la lipoperoxidación y en la actividad de enzimas antioxidantes en sangre de monos *Rhesus (Macaca mulata)* viejos, en comparación con los jóvenes, relacionándolo con la desmielinización y con el aumento característico de la latencia en la conducción nerviosa de las vías sensoriales antes mencionadas,

lo cual a su vez se asoció a la edad. Esto sugiere que el aumento del estrés oxidante durante la tercera edad, puede promover el daño en las vías nerviosas, por lo que la administración de moléculas que sean capaces de modular el estado redox, como el SFN, puede promover la disminución del daño por estrés oxidante y así mejorar el estado de las vías nerviosas, mejorando la capacidad en la conducción nerviosa.

Existen una gran cantidad de estudios que demuestran que la activación de Nrf2 por distintos inductores protegen a las células y diversos tejidos. Sin embargo, existe una controversia en cuanto a la posible activación de Nrf2 durante el envejecimiento (Silva-Palacios et al., 2018). En nuestro laboratorio se logró encontrar protección en astrocitos aislados de ratas viejas cuando se inducía la activación de Nrf2 con tert-butilhidroquinona (tBHQ), que induce la liberación de Nrf2 de su represor Keap1 mediante la oxidación de sus cisteínas. En ese trabajo se observó que existe un efecto protector, pero solo en una estrecha ventana de concentración y tiempo (Alarcón- Aguilar et al., 2014). Posteriormente, Silva-Palacios *et al.* (2017), administró tBHQ a ratas hembra viejas (24 meses) a las que se les indujo estrés oxidante en el estriado mediante ácido 3- nitropropiónico (3NP) que inhibe a la succinato deshidrogenasa (complejo II de la cadena de transporte de electrones) y al ciclo de Krebs promoviendo la formación de ROS. El pretratamiento con tBHQ protegió al cerebro frente a los déficits de movimiento, así como de la astrogliosis reactiva producida por el daño con 3-NP. Curiosamente, el tratamiento con tBHQ no aumentó la translocación de Nrf2 al núcleo en los tiempos evaluados previamente, y las respuestas relacionadas con

el estado redox fueron duales, por lo que aún queda la duda de cuál sería el mecanismo de acción que otorgó la protección observada y cuál sería la participación de Nrf2, en la protección contra el daño durante el envejecimiento.

3. Planteamiento del problema

3.1 Justificación

En las últimas décadas, el número de adultos mayores ha aumentado a nivel mundial. En el año 2015, una de cada ocho personas eran mayores de 60 años, es decir, aproximadamente 901 millones de personas a nivel mundial. Sin embargo, se espera que para el año 2030 el número de personas mayores a 60 años supere al número de niños de 0 a 9 años, llegando a 1,400 millones de adultos mayores a nivel mundial (*United Nations*, 2015).

En México durante el año 2017, aproximadamente el 10.5% de la población era mayor de 60 años, es decir, 13 millones de personas, de las cuales el 53.9% eran mujeres y el 46.1% eran hombres (INEGI, 2017) y se estima que para el año 2050 esta cifra alcance el 28% del total de la población (CONAPO, 2004). El número cada vez mayor de adultos mayores ha dado como resultado una mayor incidencia a nivel mundial de una serie de enfermedades conocidas como *enfermedades asociadas a la edad*, dentro de las que se encuentran las enfermedades cardiovasculares, diversos tipos de cáncer, y un número creciente de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (*World Health Organization*, 2015; Gassen, *et al.*, 2017).

Durante el envejecimiento existe deterioro en los tejidos, incluido el tejido nervioso, además decrece la capacidad antioxidante, y puesto que el cerebro es altamente energético, se promueve un ambiente oxidante que reforzará aún más la pérdida de las funciones de las células nerviosas. Una de las funciones que puede verse alterada es la velocidad de conducción nerviosa, que tiende a disminuir durante el envejecimiento (Palve, *et al.*, 2018) y en algunas enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad (Kakrani, *et al.*, 2014; Yardimci, *et al.*, 2016). De manera que si se pudiera modular el estado redox celular para que sus efectos fueran menos dañinos, se podrían prevenir alteraciones funcionales como el decremento en la velocidad de los impulsos nerviosos.

El sulforafano (SFN) es una molécula que activa la respuesta de protección antioxidante y de supervivencia celular a través de factores de transcripción como Nrf2, promoviendo la transcripción de distintas proteínas antioxidantes que le permiten a las células del sistema nervioso competir con el estrés oxidante, y así reducir el daño a biomoléculas que les impide su correcto funcionamiento. En el caso de los oligodendrocitos y células de Schwann es importante dicha protección para poder reducir la desmielinización característica del envejecimiento y así mejorar la conducción nerviosa. Por lo que resulta importante evaluar su efecto en modelos *in vivo* para determinar si el SFN tiene algún efecto sobre la velocidad de conducción nerviosa durante el envejecimiento.

3.2 Pregunta de investigación

¿La administración de sulforafano mejorará la velocidad de conducción nerviosa en ratas viejas mediante la modulación del estado redox?

3.3 Objetivo general

Determinar el efecto del sulforafano en la velocidad de conducción nerviosa de las vías somatosensoriales (tibial y medial), auditivas y visuales; así como su efecto en el estado redox del cerebro de ratas viejas.

3.4 Objetivos particulares

- Evaluar los cambios en el estado redox de la corteza cerebral e hipocampo de las ratas viejas machos y hembras tratadas por tres meses con SFN.
- Determinar mediante resonancia magnética el volumen total de la corteza y el hipocampo de ratas viejas machos y hembras tratadas por tres meses con SFN.
- Determinar la actividad antioxidante de la corteza y el hipocampo de ratas viejas machos y hembras tratadas por tres meses con SFN.
- Determinar el daño por estrés oxidante en corteza e hipocampo de ratas viejas machos y hembras tratadas por tres meses con SFN

4. Hipótesis

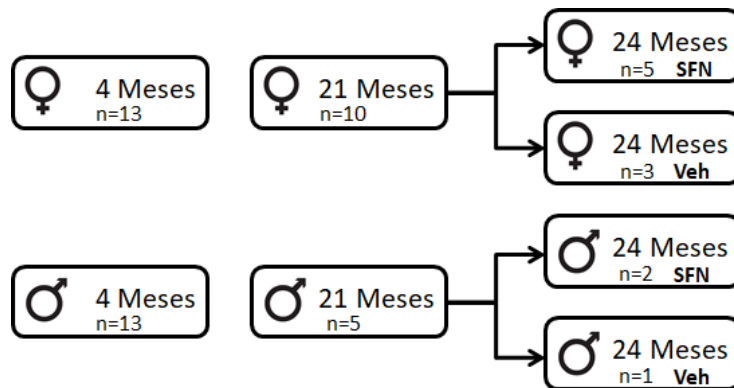
El sulforafano al ser un inductor de la respuesta antioxidante promoverá la defensa contra el daño oxidante durante el envejecimiento proporcionando protección a las vías sensoriales ante el deterioro provocado con la edad.

5. Material y métodos

5.1 Animales

Los animales fueron proporcionados por el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, así como por el Bioterio del Área de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla. La investigación se realizó de acuerdo a lo estipulado en la NOM-062-ZOO-1999 en el apartado para roedores.

Se utilizaron grupos de ratas de 4 meses (machos: n=13; hembras: n=13) como controles jóvenes del funcionamiento normal del sistema nervioso, así como grupos de 21 (machos: n=5; hembras: n=10) y 24 (machos: n=3; hembras: n=8) meses de edad de la cepa Wistar. Se agruparon por género y edad en cajas de 5 individuos con agua y alimento *ad libitum*, en condiciones de 12 horas de luz/oscuridad. Se separaron los animales en 8 grupos para este estudio (Diag. 1).



Diag.1 Se muestran los grupos de animales para el estudio. Se utilizaron machos y hembras 4, 21 y 24 meses. A partir de los 21 meses se administró SFN a 5 hembras y 3 machos; y se administró el vehículo a 5 hembras y 2 machos. En los recuadros se muestra el número de animales que sobrevivieron por grupo.

5.2 Administración de sulforafano

Se administró sulforafano (LKT Laboratories, No. de Cat. 4478-93-7) de acuerdo a la dosis establecida por Miao, *et al.* (2012) de 0.5 mg/kg empleando solución salina (NaCl 0.9%) con DMSO al 1% como vehículo, por vía subcutánea durante 5 días a la semana durante 3 meses a un grupo inicial de 10 ratas hembra y 5 ratas macho de 21 meses de edad. A otro grupo inicial de 10 ratas hembras y 5 machos de 21 meses se les administró solamente el vehículo. El tratamiento terminó a los 24 meses de edad. Se mantuvo un grupo de ratas macho y hembra de 4 meses como control.

5.3 Pruebas *in vivo*

5.3.1 Manejo anestésico

Para los registros electrofisiológicos se sedaron las ratas con un coctel de ketamina (100 mg/kg; Anesket® Pisa Farmacéutica Mexicana) y xilacina (5 mg/kg; Procin® Pisa Farmacéutica Mexicana) por vía intramuscular. Se realizaron potenciales evocados visuales, auditivos, y somatosensoriales tibiales y mediales a los grupos de 4, 21 y 24 meses de edad a los que se les administró el vehículo y al grupo de 24 meses tratado con SFN.

Para la adquisición de imágenes por resonancia magnética, las ratas fueron anestesiadas mediante isoflurano por vía inhalatoria (Sofloran® Pisa Farmacéutica Mexicana) al 4% como dosis de inducción, y de 1.5-2% como dosis de mantenimiento. Los animales se mantuvieron bajo anestesia por un tiempo de 45 minutos a 1 hora.

5.3.2 Potenciales evocados

Los registros se llevaron a cabo en el laboratorio de neurofisiología de APREXBIO mediante un equipo NEURONICA 5® (Neuronic®, La Habana, Cuba) y usando electrodos de aguja (Ambu®, España) colocados de acuerdo al sistema internacional 10/20. Los potenciales evocados fueron registrados utilizando impedancias $<5 \text{ k}\Omega$.

5.3.2.1 Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral (PEATC)

Se realizaron siguiendo el protocolo de Ibañez-Contreras, *et al.* (2016): Se estimularon las vías auditivas de las ratas con chasquidos emitidos a 50 dB de intensidad, con una duración de 0.1 ms, dando un total de 2000 promediaciones de estímulos. Se estimuló sólo un oído a la vez, mientras que el otro fue enmascarado con un ruido blanco de fondo 20dB más bajo que la intensidad explorada. Los filtros de banda se programaron entre 100 y 3000 Hz con una sensibilidad de 10 μV . El electrodo negativo fue colocado en la derivación cerebral A1 o A2 ipsilateralmente al oído estimulado, el electrodo positivo fue colocado en la zona frontal (Fz), finalmente, la corriente se aterrizó en la base de la cola del animal mediante otro electrodo.

5.3.2.2 Potenciales evocados visuales (PEV)

De acuerdo al protocolo de Ibañez-Contreras, *et al.* (2011). Se estimularon ambos ojos mediante una luz estroboscópica que emite 150 flashes por minuto con 200

ms de duración, realizando un total de 250 promediaciones. Los filtros de banda se programaron entre 1 y 100 Hz con una sensibilidad de 50 μ V. El electrodo negativo fue colocado en la zona occipital (Oz), el electrodo positivo fue colocado en la zona frontal (Fz), la corriente se aterrizó en la base de la cola del animal mediante otro electrodo.

5.3.2.3 Potenciales evocados somatosensoriales mediales y tibiales

Se realizaron de acuerdo al protocolo de Hernández-Godínez *et al.* (2011): Para el registro de los PESSM. Los electrodos negativos fueron colocados en el séptimo disco cervical (C7) y en la corteza somatosensorial contralateral a la extremidad estimulada (C3' ó C4'). Para los PESST los electrodos negativos fueron colocados en el cuarto disco lumbar (L4) y en la corteza somatosensorial contralateral a la extremidad estimulada (C3' ó C4'). En ambos casos el electrodo positivo fue colocado en Fz y la corriente fue aterrizada en la base de la cola mediante otro electrodo.

La estimulación de los nervios mediales o tibiales se realizó mediante pulsos eléctricos cuadrados monofásicos con una intensidad de 2 mA y frecuencia de 1.1 estímulos por segundo hasta llegar a 250 promediaciones. Los filtros de banda se programaron entre 3 a 3000 Hz.

5.3.4 Medición de volumen por resonancia magnética

Se tomaron imágenes por resonancia magnética de cerebros de ratas hembra jóvenes de 4 meses, viejas de 21 meses y 24 meses tratadas con SFN y controles utilizando un resonador de 7 Teslas (Bruker PharmaScan 70/16US) mediante una secuencia *T2-weighted* con 23 adquisiciones de imágenes del cerebro completo de un grosor de 500 μm y una separación de 100 μm por cada imagen. Las adquisiciones se realizaron mediante el software Paravision 5.1. Cada imagen adquirida fue analizada individualmente y se tomó el volumen de la corteza cerebral tanto en jóvenes como en viejos de 21 meses y 24 meses (tratados y no tratados).

5.4 Pruebas bioquímicas

Una vez cumplidos los tres meses de tratamiento con el SFN, y después de realizar los experimentos *in vivo* antes mencionados, se anestesió a los animales con una sola dosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal y posteriormente fueron sacrificados por decapitación. Por último, se realizó la disección del cerebro para obtener la corteza cerebral, el hipocampo, y el hígado (éste último como control interno).

5.4.1 Determinación del cociente GSH/GSSG

El cociente de glutatión oxidado/ glutatión reducido (GSH/GSSG) se midió mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC; Farris & Reed, 1987; Gómez-Quiroz, 2008). Se pesaron 100 mg de corteza e hígado y 50 mg de

hipocampo para ser homogenizados en 1ml de ácido perclórico/ BPDS (1mM; Sigma, St. Louis, USA) y fueron centrifugados a 10,000 xg a 4°C por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se diluyó en una proporción de 1:10 en PBS. Se inyectaron 50 µl de cada muestra en el sistema de HPLC por medio de una bomba binaria (Waters 1525) acoplada a un detector UV/visible (Waters 2489) a 210 nm. La fase estacionaria se realizó en una columna Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 250 mm y un tamaño de partícula de 5 µm, usando como fase móvil buffer de fosfato de potasio (KH₂PO₄) 20 Mm y acetonitrilo al 1% con un pH de 2.7 y con un flujo de 1ml/min. El área bajo la curva fue determinada mediante una curva patrón con estándares comerciales de GSH y GSSG (10, 25, 50, 100, 200 y 400 µM).

5.4.2 Determinación de actividad antioxidante

Se midió la actividad antioxidante en la corteza cerebral, hipocampo, hígado de todos los grupos mediante la determinación de la actividad de dos enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Cat). Para ambos casos se homogenizaron 100 mg de corteza cerebral, 100 mg de hígado o 100 mg de hipocampo, o con solución de extracción de proteínas compuesta por 100 µL de DTT 1M, 100 µL de PSMF 0.1M y 1 pastilla de mini complete (Roche) en 10 ml de buffer T-Per (Sigma) y se centrifugaron a 5000 xg a 4°C durante 15 minutos y se recuperaron los sobrenadantes para las pruebas que se describen a continuación.

5.4.2.1 Determinación de la actividad de la Superóxido Dismutasa

La actividad de la SOD se evaluó a través del sistema xantina/xantina oxidasa descrito en los protocolos de Stirpe & Della Corte (1969) y Paoletti, *et al.*, (1989), en el cual se genera constantemente radical superóxido, que al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce para formar una sal de formazán que puede ser detectada por medio de espectrofotometría. Se colocaron 25 µl de cada muestra, 25 µl 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™ GENESYS 10S UV-Vis (Madison, WI USA) durante 5 minutos, tomando una lectura cada 30 segundos. Los resultados fueron expresados 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.

5.4.2.2 Determinación de la actividad de la Catalasa

La actividad de la Cat se evaluó mediante la disminución en la concentración de peróxido de hidrógeno en la celda de acuerdo al protocolo de Aebi (1984), tomando 10 µl de cada muestra más 1ml de solución de H₂O₂ y PBS 0.1M. Y finalmente leyéndolo a una longitud de onda de 240 nm durante 3 minutos, tomando una lectura cada 10 segundos.

5.4.3 Determinación de daño a proteínas por carbonilación

Se empleó el método descrito por Mesquita (2014). Las muestras de proteínas fueron centrifugadas a 5000 x g durante 15 minutos a 4° C. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes en tubos de 1.5 ml. En una placa de 96 pozos se agregaron 20 µL de muestra y se adicionaron 20 µL de Dinitrofenilhidrazina (DNPH; 10 mM disuelto en H₃PO₄ 0.5 M), y se dejó incubar la placa en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo se añadieron 10 µL de hidróxido de sodio 6 M y se incubaron durante 10 minutos 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.

5.4.4 Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados mediante el software estadístico NCSS 2007. Las muestras que cumplían con los supuestos de distribución normal y homocedasticidad se realizaron pruebas de análisis de varianza de una vía (ANOVA), mientras que para las que no cumplieron con alguno de estos dos supuestos se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis. Para ambos casos se empleó una $p < 0.05$ para tomar la diferencia como significativa. Posteriormente se realizó la prueba *post hoc* de Tukey para conocer los grupos que fueron

significativamente diferentes entre sí. Para evaluar las diferencias por género se empleó una prueba de T para dos muestras. Una $p < 0.05$ se consideró como diferencia significativa. Las gráficas resultantes del análisis de datos fueron realizadas con el software GraphPad Prism versión 7.0.

6. Resultados

6.1 Porcentaje de supervivencia

Se realizó una curva de supervivencia mediante las curvas de Kaplan-Mayer para determinar el porcentaje de ratas que llegaron a la edad de 24 meses y evaluar el porcentaje de mortalidad de nuestra población de estudio. La curva se inició desde los 12 meses de edad, momento en el que aún se conservaba el 100% de la muestra de ambos sexos (Fig.1) Se inició con una muestra de 22 machos y 30 hembras de 12 meses, de los cuales sólo alcanzaron la edad de 24 meses 3 machos y 10 hembras, es decir, hubo un porcentaje de supervivencia del 13.63% y 33.33% respectivamente (Fig.1). El porcentaje de supervivencia de los machos fue menor que el de las hembras, con una diferencia de alrededor de 20%, por lo que la muestra de machos para poder realizar los estudios siguientes se vio gravemente disminuida, ya que sólo sobrevivieron 2 de los 5 machos que se empezaron a tratar con SFN y 1 de los 5 que se contemplaban como control.

Es importante mencionar que el mayor porcentaje de muerte se registró entre los 16 a los 20 meses en ambos sexos. El tratamiento con SFN no afectó la longevidad de las ratas, ya que tanto en hembras como en machos se registraron entre 2 y 3 muertes en los grupos control y tratados de los 21 a los 24 meses.

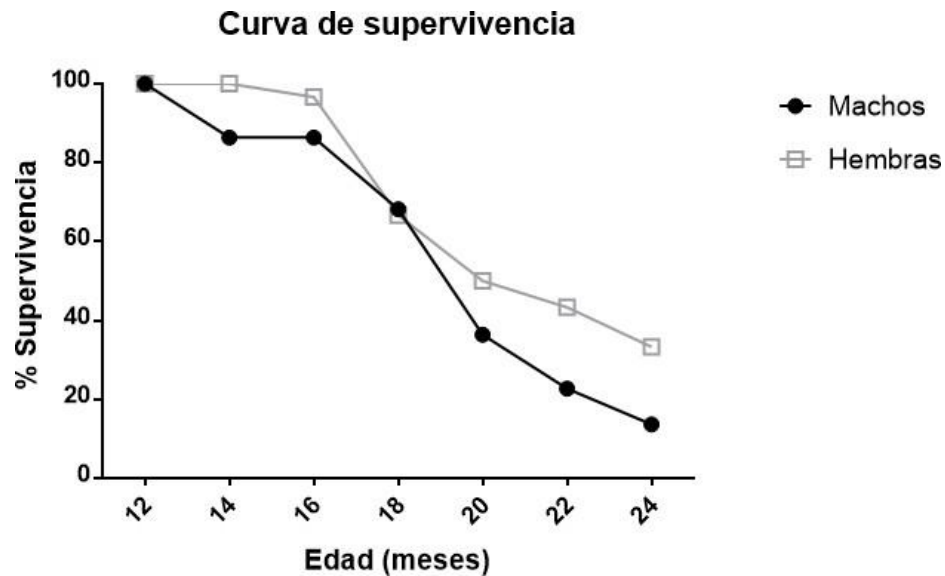


Fig.1 Se muestra el porcentaje de supervivencia de machos y hembras posterior a los 2 meses de edad. Sólo el 13.63% de los machos y el 33.33% de hembras alcanzaron los 24 meses de edad. Entre los 16 y 20 meses de edad se dio la disminución más drástica en la supervivencia.

6.2 Potenciales evocados

Para conocer la velocidad de conducción nerviosa en distintas vías sensoriales, se realizaron los potenciales evocados visuales, auditivos, y somatosensoriales superiores (mediales) e inferiores (tibiales) en ratas machos y hembras de 4, 21 y 24 meses de edad a las que se les administró el vehículo y de 24 meses a las que se dio tratamiento con SFN, sin embargo, en el caso de los machos sólo se evaluaron los datos de los grupos de 4, 21 y 24 meses con tratamiento, debido a

que sólo sobrevivió un macho de 24 meses al que se le administró el vehículo y se empleó para la realización de las pruebas bioquímicas. Esta técnica nos permitió saber el tiempo en milisegundos (ms) en que el estímulo pasa por los distintos núcleos de la vía sensorial, hasta integrarse en el área correspondiente del cerebro. En ninguna de las ondas de la vía auditiva, somatosensorial tibial, o somatosensorial medial se registraron diferencias significativas entre el lado izquierdo y el derecho, por lo que se unificaron los datos de ambos lados para realizar los análisis estadísticos.

6.2.1 Potenciales evocados auditivos de tallo cerebral

Se evaluaron las ondas I, II, III, IV y V de la vía auditiva izquierda y derecha. En el caso de los machos (Fig 2) se observa un aumento significativo en las latencias de las ondas II, III y V de la vía con un aumento del 17%, 22% y 17% respectivamente, de las ratas de 21 meses, es decir, previo al tratamiento. En el caso de las ratas tratadas con SFN no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las ondas con los grupos de 4 o 21 meses. Esto sugiere que el SFN protegió del daño y por ende se obtuvieron valores parecidos a las ratas de 4 meses de edad. Es importante señalar que en las ondas I y IV no hubo diferencias significativas entre de los grupos de 4 y 21 o 24 meses ya que ha sido reportado que en otras especies las latencias de todas las ondas aumentan durante el envejecimiento (Ibañez-Contreras, *et al.*, 2011).

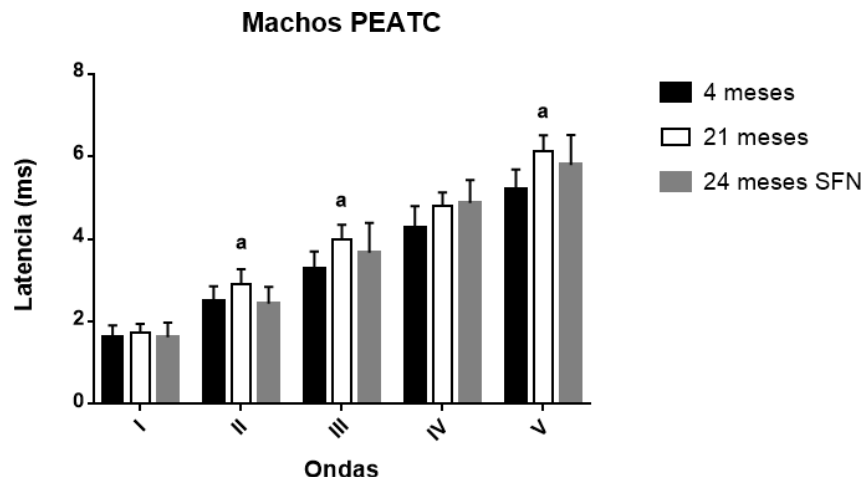


Fig.2 Se muestran las latencias de las ondas de la vía sensorial auditiva de las ratas macho de 4, 21 y 24 meses tratadas con SFN. En las ondas II, III y V las latencias son significativamente más altas en las ratas de 21 meses de edad en comparación con las de 4, sin embargo, el grupo de 24 meses de edad tratado con SFN no mostró diferencia significativa con ninguno de los otros dos grupos. **a:** diferencia significativa con el grupo de 4m. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

En el caso de las hembras se observa un aumento de las latencias en las 5 ondas de la vía en los grupos de ratas viejas (21 y 24 meses tratadas y no tratadas) en comparación con las ratas jóvenes (Fig.3). El aumento fue del 32.6%, 27.9%, 34.4%, 34% y 26.8% en las ondas I, II, III, IV y V respectivamente, en comparación con las latencias de las ondas de ratas de 4 meses. Lo que involucra un aumento de 0.38 ms en el caso de la onda I, 0.57 ms en la onda II, 0.97 ms en la onda III, 1.24 ms en la onda IV, y 1.24 ms en el caso de la onda V.

No se encontraron diferencias significativas entre las latencias de los grupos de 21 y 24 meses (tanto administradas con el vehículo, como en las tratadas con SFN).

El aumento en las latencias relacionado a la edad fue mayor en hembras que en machos, ya que mientras los machos tuvieron menos del 22% de aumento en las latencias, en las hembras se registraron aumentos de más del 30% en las latencias de todas las ondas. Es necesario mencionar también que los machos tratados con SFN tuvieron una mayor dispersión de datos, teniendo valores intermedios entre ambas poblaciones.

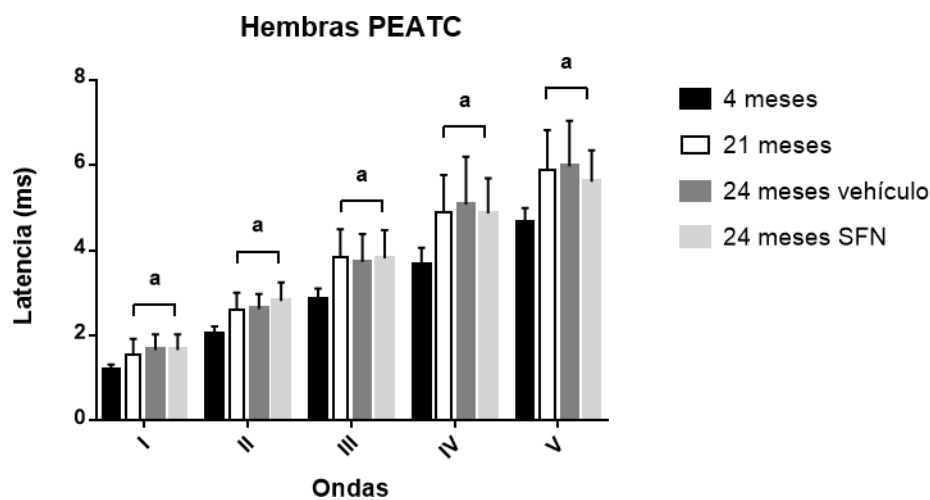


Fig.3 Se muestran las latencias de las ondas de la vía sensorial auditiva de las ratas hembra de 4, 21 y 24 meses de edad a las que se les administró el vehículo y 24 meses de edad con tratamiento con SFN. En todas las ondas las latencias son significativamente más altas en las ratas viejas en comparación con las de 4 meses. a: diferencia significativa con el grupo de 4m. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

A pesar de esto, al comparar las latencias de los machos contra las de las hembras se obtuvieron diferencias significativas entre las hembras de 4 meses en comparación con los machos de la misma edad, mientras que en los grupos de ratas viejas no se obtuvieron diferencias. Lo que indica que las hembras tienen mayor daño en las vías sensoriales con el paso del tiempo en comparación con los machos, y puede ser observado en los porcentajes de disminución de la velocidad de conducción nerviosa.

6.2.1 Potenciales evocados visuales

Se evaluaron las ondas N1, P1 y N2 de la vía visual. En el caso de los machos se presentó el mismo comportamiento de los datos que en las ondas de los PEATC, por lo que se encontró diferencia significativa entre las latencias de todas las ondas del grupo de 21 meses en comparación con el de 4 meses, teniendo un aumento del 18.3% en la onda N1, del 36.6% en la onda P1, y del 30.1% en la onda N2, que se traduce en aumentos de 4.37 ms, 12.01 ms y 13.42 ms, respectivamente. Sin embargo, el grupo tratado con SFN no fue significativamente diferente de los grupos de 4 o 21 meses.

A pesar de esto, cabe resaltar que los datos del grupo de 24 meses tratado con SFN se comportan de manera diferente, presentando valores intermedios con respecto a los otros dos grupos (Fig 4) al igual que en los PEATC.

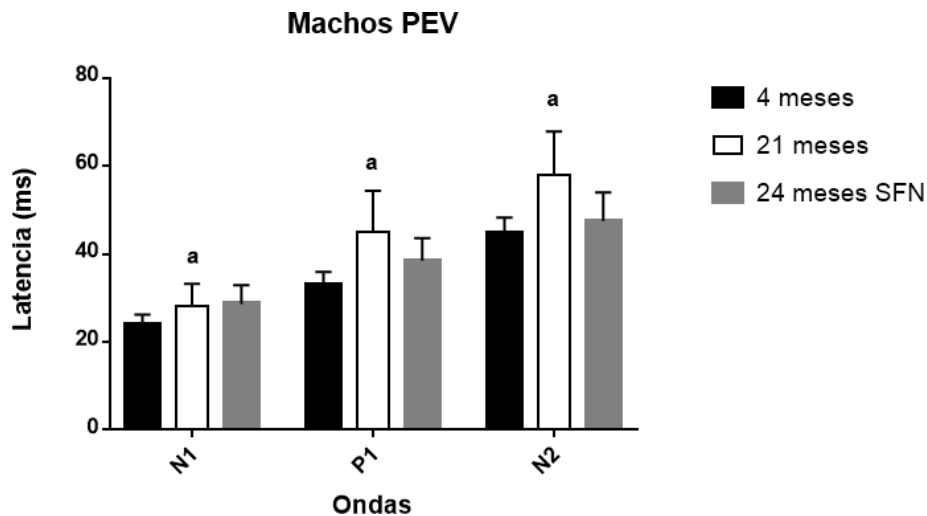


Fig.4 Se muestran las latencias de las ondas de la vía sensorial visual de las ratas macho de 4, 21 y 24 meses con tratamiento con SFN. En todas las ondas las latencias son significativamente más altas en las ratas de 21 meses de edad en comparación con las de 4 meses. **a:** diferencia significativa con el grupo de 4m. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

En el caso de las hembras se observó un aumento significativo en las latencias de todas las ondas del grupo de 24 meses en comparación con el de 4 meses teniendo un aumento del 21.5%, 13.4% y del 8.2% respectivamente. En las ondas N1 y P1 del grupo de 21 meses también se registró un aumento significativo del 19.1%, es decir, de 8.32 ms. Sin embargo las latencias de las ratas de 24 meses tratadas con SFN no tuvieron diferencias significativas con ningún grupo, ni siquiera con las ratas de 4 meses de edad (Fig 5), lo que puede ser un indicativo del efecto protector del SFN.

En esta vía sensorial los machos fueron los que tuvieron porcentajes de aumento de latencias más grandes que las hembras, teniendo latencias hasta un 36.6% mayores en comparación con las jóvenes, mientras que las hembras tuvieron un aumento máximo del 21.5%.

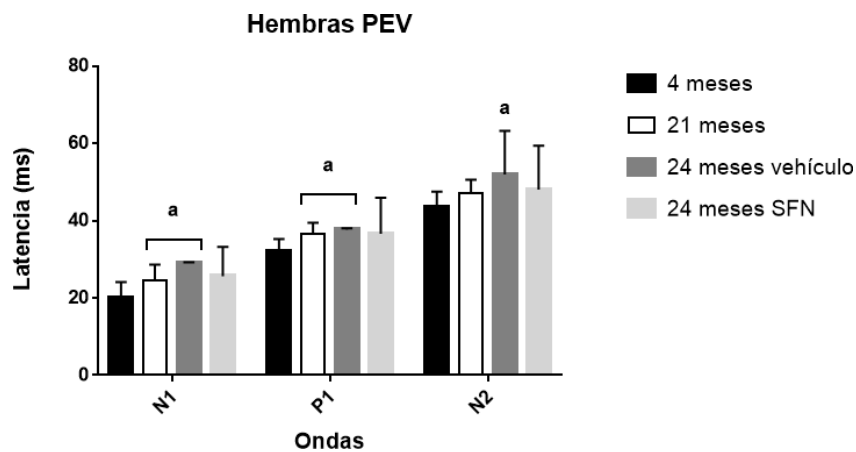


Fig.5 Se muestran las latencias de las ondas de la vía sensorial visual de las ratas hembras de 4, 21 y 24 meses con vehículo y 24 meses con tratamiento con SFN. En todas las ondas las latencias son significativamente más altas en las ratas de 24 meses en comparación con las de 4 meses y en las ondas N1 y P1 del grupo de 21 meses. El grupo de 24 meses tratado con SFN no presentó diferencias significativas con ningún grupo. a: diferencia significativa con el grupo de 4m. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

Sin embargo, al comparar las latencias de las ondas de las ratas hembras contra las de los machos se encontró que en las ratas hembra de 4 meses las latencias de la onda N1 es menor que en los machos. En el caso de las hembras de 21 meses las latencias de las ondas P1 y N2 son menores que en las de los machos, pero en los grupos de 24 meses de edad no hubo diferencias significativas entre machos y hembras.

6.2.1 Potenciales evocados somatosensoriales mediales

Se evaluaron las ondas P1 y N1 de la corteza somatosensorial y de la derivación C7 de la médula espinal. En los machos se observaron aumentos significativos en

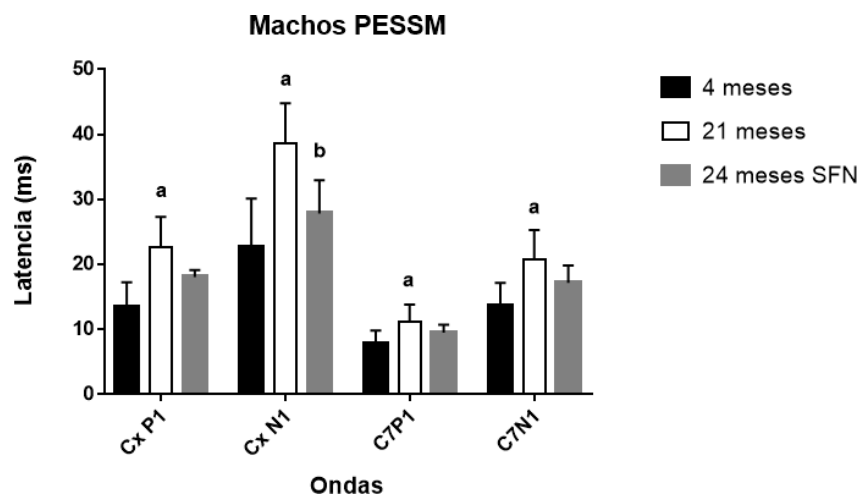


Fig.6 Se muestran las latencias de las ondas de la vía somatosensorial medial de las ratas macho de 4, 21 y 24 meses con tratamiento con SFN. En todas las ondas las latencias son significativamente más altas en las ratas de 24 meses en comparación con las de 4 meses. El grupo de 24 meses tratado con SFN fue significativamente menor en la onda Cx N1 en comparación con el grupo de 21 meses. **a:** diferencia significativa con el grupo de 4m. **b:** diferencia significativa con el grupo de 21 meses. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

las latencias de todas las ondas entre los grupos de 4 y 21 meses de edad con

aumentos del 69.5% y 38.68% respectivamente en las ondas P1 y N1 de Cx, y de un 44.9% y un 51.9% respectivamente en la onda P1 y N1 de C7. Sin embargo, con el tratamiento con SFN no se encontraron diferencias significativas con ninguno de los grupos, con excepción de la onda P1 de corteza, en la que la latencia fue significativamente menor que en el grupo de 21 meses (Fig 6).

En el caso de las hembras, se registró un aumento significativo en las latencias de todas las ondas en los grupos de 21 y 24 meses de edad a los que se les administró el vehículo y 24 meses de edad con tratamiento aumentando en 111.6% y 118.8% en las ondas P1 y N1 de Cx, y en 81.6% y 103.7% en P1 y N1 de C7, que se traduce en un aumento de 10.72 ms, 17.91 ms, 4.77 ms, y 10.52 ms, respectivamente. El tratamiento con SFN aparentemente no tuvo efecto sobre

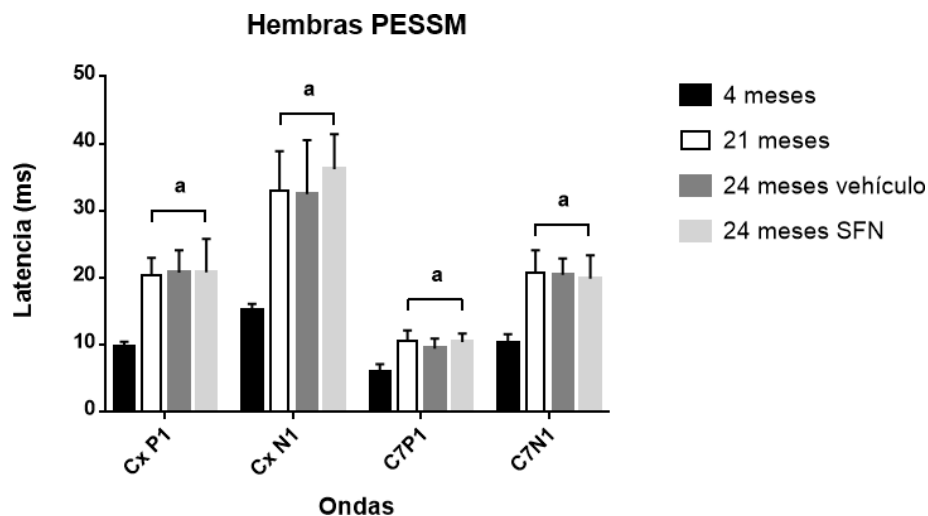


Fig.7 Se muestran las latencias de las ondas de la vía somatosensorial medial de las ratas hembra de 4, 21 y 24 meses vehículo y con tratamiento con SFN. En todas las ondas las latencias son significativamente más altas en las ratas de 21, 24 meses vehículo y tratados con SFN en comparación con las de 4 meses. **a**: diferencia significativa con el grupo de 4m. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

las latencias del grupo de 24 meses (Fig 7). En esta vía sensorial las hembras se vieron mayormente afectadas por la edad, ya que el aumento en las latencias fue de más del 100% en 3 de las 4 ondas evaluadas, mientras que los machos tuvieron un aumento máximo del 69.5%.

Cuando se comparan las latencias de los machos contra las de las hembras puede observarse que en las ratas hembras de 4 meses de edad son menores con comparación con los machos de la misma edad, pero con el paso del tiempo se pierde esta diferencia, nuevamente debido a que las hembras tienen un mayor daño en la vía en comparación con los machos.

6.2.1 Potenciales evocados somatosensoriales tibiales

Se evaluaron las ondas P1 y N1 de la corteza somatosensorial y de la derivación L4 de la médula espinal. En el caso de los machos se notó un aumento significativo en las latencias de todas las ondas en las ratas de 21 meses con respecto a las de 4 y 24 meses tratadas con SFN con aumentos del 64.4% y 77% en las ondas P1 y N1 de Cx, y 69.7% y 74.5% en las ondas P1 y N1 de L4, que se traducen en 10.3 ms, 18.36 ms, 6.05 ms y 11.19 ms respectivamente. De manera interesante, en esta vía el tratamiento con SFN redujo las latencias en las ondas CxP1, CxN1 y L4N1 en comparación con el grupo de 24 meses de edad. Aunque en la L4P1 no hubo diferencia significativa entre el grupo de 21 meses (Fig. 8). En el caso de las hembras se observó un aumento significativo en las latencias de los grupos de ratas viejas de 21 y 24 meses a los que se les administró el vehículo y en las de 24 meses de edad tratadas con SFN en comparación con las ratas de 4

meses del 80.3% y 89.1% en las ondas P1 y N1 de Cx, y 56.3% y 52.6% en las ondas P1 y N1 de L4, que sugieren un aumento de 22.84 ms, 37.81 ms, 12.13 ms y 20.66 ms, respectivamente. El tratamiento con SFN durante tres meses parece no tener efecto sobre la velocidad de conducción nerviosa de las ratas hembra de 24 meses.

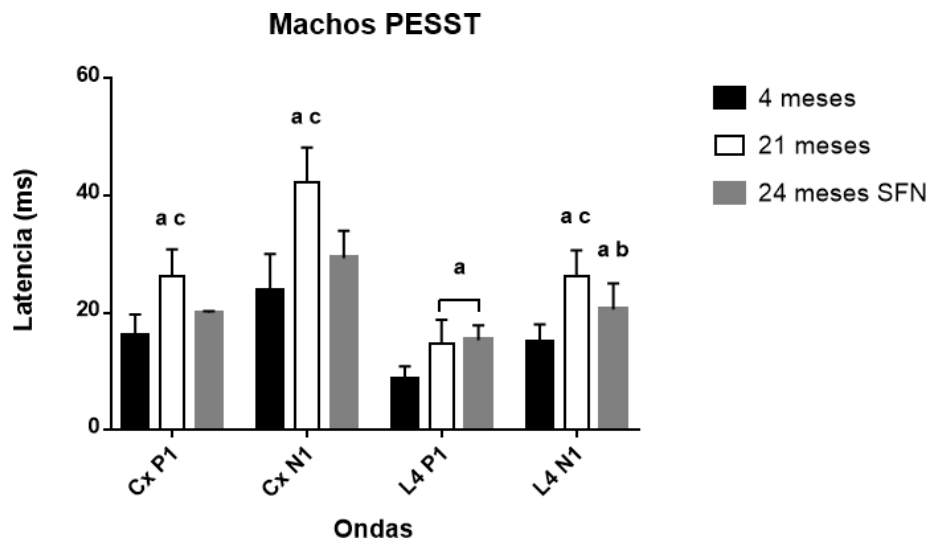


Fig.8 Se muestran las latencias de las ondas de la vía somatosensorial medial de las ratas macho de 4, 21 y 24 meses de edad con tratamiento con SFN. En todas las ondas las latencias son significativamente más altas en las ratas de 21 meses de edad en comparación con las de 4 meses. Sin embargo, en las ondas P1 y N1 de Cx el tratamiento con SFN disminuyó significativamente las latencias. **a**: diferencia significativa con el grupo de 4m. **b**: diferencia significativa con el grupo de 21 meses. **c**: diferencia significativa con el grupo de 24 meses tratados con SFN. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

En este caso las hembras también tuvieron un mayor aumento de las latencias en todas sus ondas en comparación con los machos, ya que tuvieron aumentos de hasta un 89.1%, mientras que en los machos el máximo fue del 77% que en ms se traducen en 37.81 y 18.36 respectivamente, siendo prácticamente del doble de tiempo (Fig.9).

De los potenciales evocados realizados en las distintas vías sensoriales se puede notar que mientras más larga sea la vía, mejor se pueden apreciar los efectos tanto de la desmielinización, que se relaciona directamente con la disminución de la velocidad de conducción nerviosa, como de los efectos del SFN, por lo que en las vías somatosensoriales que son de varios centímetros de distancia se ven los cambios más drásticos en cuanto al aumento en las latencias, ya que las áreas mielinizadas que pueden ser potencialmente dañadas durante el envejecimiento

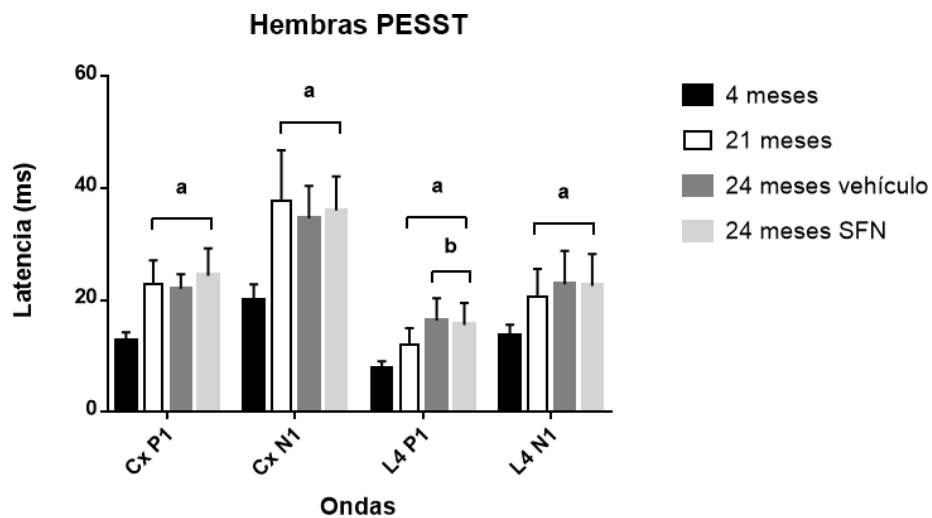


Fig.9 Se muestran las latencias de las ondas de la vía somatosensorial tibial de las ratas macho de 4, 21 y 24 meses vehículo y con tratamiento con SFN. En todas las ondas las latencias son significativamente más altas en las ratas de 21 y 24 meses tratados con SFN en comparación con las de 4 meses. **a:** diferencia significativa con el grupo de 4m. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

son mayores. Por otro lado, es curioso observar que en 3 de las 4 vías evaluadas (auditiva, somatosensorial medial y somatosensorial tibial), las hembras resultaron tener un mayor aumento en las latencias de la mayoría de las ondas, además que el tratamiento con SFN prácticamente no tuvo efecto sobre las latencias de las ondas evaluadas, mientras que en los machos, que tuvieron porcentajes de

aumento de latencias menores en comparación con las hembras el SFN tuvo efecto sobre algunas de las ondas, especialmente sobre las de la vías somatosensoriales.

En este caso, al comparar las latencias de machos contra hembras se pudo observar el mismo comportamiento reportado en los PESSM, en el que las hembras de 4 meses presentaron latencias más cortas que los machos de la misma edad, pero con la edad se perdieron las diferencias, lo que indica que las hembras también tienen mayor daño en esta vía a comparación de los machos.

6.3 Medición de volumen de estructuras cerebrales por resonancia magnética

Se determinó el volumen de la corteza cerebral y del hipocampo, ya que son dos de las estructuras que más se dañan durante el envejecimiento y que se ha reportado pérdida tanto de su función, como de la integridad en su estructura (Salat, *et al.*, 2004; Driscoll, *et al.*, 2003).

Para este ensayo sólo se tomaron en cuenta a las hembras de 4, 21 y 24 meses de edad sin tratamiento y a las de 24 meses de edad con tratamiento con SFN (Fig. 10 A-D, respectivamente) debido a que las ratas macho son más grandes que las hembras, por lo que no cabían en la bobina del resonador para su escaneo.

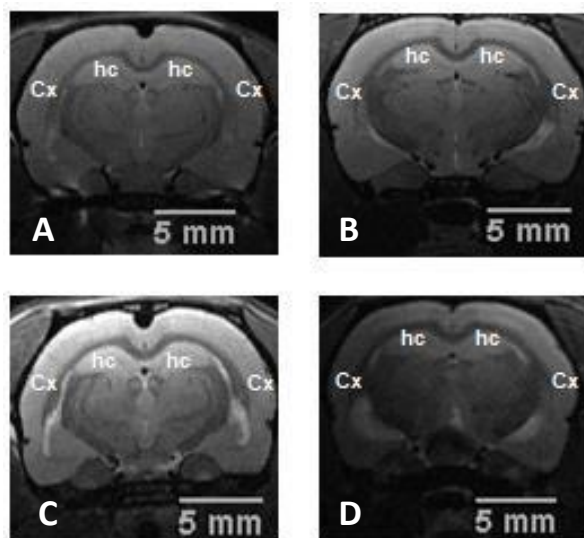


Fig.10 Imágenes representativas de imágenes por resonancia magnética de cerebros de ratas hembra a la altura del hipocampo (hc) y en donde se aprecia la corteza cerebral (Cx). **A:** Cerebro de rata de 4 meses de edad; **B:** Cerebro de rata de 21 meses de edad; **C:** Cerebro de rata de 24 meses de edad a la que se le administró el vehículo; **D:** Cerebro de rata de 24 meses de edad a la que se le administró SFN.

No se encontraron diferencias significativas en el volumen del hipocampo en ninguno de los grupos (Fig. 11B). Por otra parte, en la corteza se encontró una disminución del 14.62% del volumen total en los grupos de ratas viejas en comparación con el grupo de 4 meses (Fig. 11A), lo que concuerda con lo reportado en otros estudios con resonancia magnética (Salat, *et al.*, 2004) en otros estudios con resonancia magnética. Es importante mencionar que el tratamiento con SFN no provocó cambios significativos en el volumen cortical en comparación con el grupo de 21 meses de edad ni con el de 24 meses al que se le administró el vehículo.

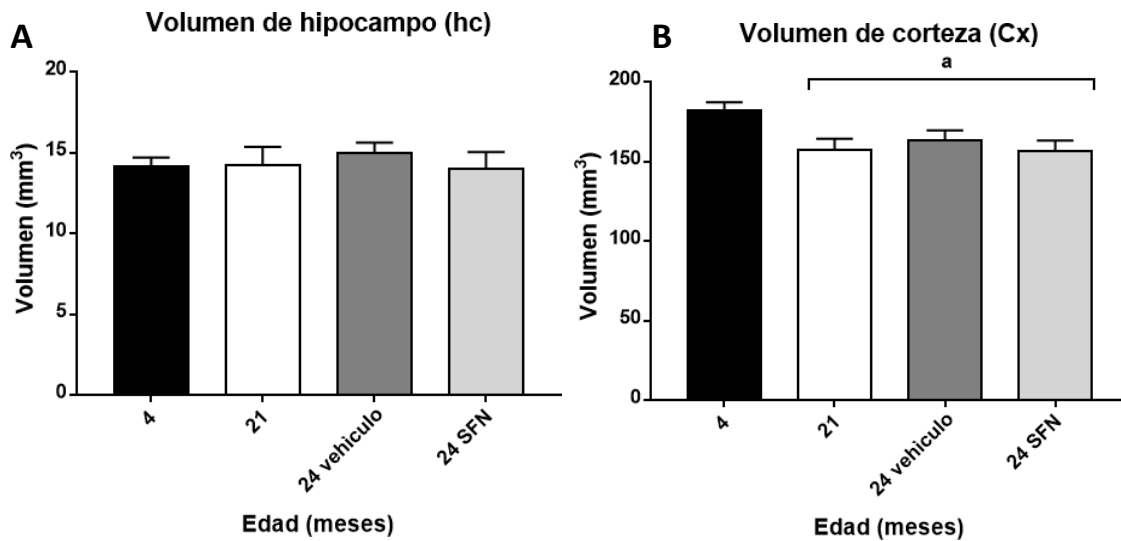


Fig. 11 Volumen (mm³) de hipocampo y corteza cerebral de ratas de 4, 21 y 24 meses de edad (a las que se les administró el vehículo o SFN). **A)** No se encontraron diferencias significativas en el volumen del hipocampo de ninguno de los grupos. **B)** En la corteza cerebral se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos de ratas viejas en comparación con el de 4 meses. **a:** diferencia significativa con el grupo de 4m. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

6.4 Pruebas Bioquímicas

Para las pruebas bioquímicas que se presentarán a continuación, no se pueden realizar comparaciones viables para los machos, debido a que en el grupo de 24 meses al que se le administró el vehículo sólo sobrevivió un individuo, por lo que las gráficas presentadas no cuentan con barras de desviación estándar, y al no ser un dato representativo, no se agregaron marcas para diferencias significativas entre grupos.

6.4.1 Determinación del estado redox

Se evaluó el estado redox del cerebro en la corteza, el hipocampo. Usando al hígado como un órgano de referencia, ya que se sabe que tiene defensas muy eficientes ante el estrés oxidante (Casas-Grajales & Muriel, 2015). Se evaluó el cociente de GSH/GSSG como indicador del estado redox. En el caso de los machos se evaluó en ratas de 4 y 24 meses de edad a las que se administró el vehículo y de 24 meses a quienes se les administró SFN. No se tienen los datos de las ratas de 21 meses, puesto que esas ratas no se sacrificaron, sino que fueron a las que se les dio tratamiento desde los 21 a los 24 meses.

En los machos no se encontraron diferencias significativas en la corteza, hipocampo o hígado de los grupos de ratas de 4 meses de edad y de 24 meses tratadas con SFN, (Fig.11). En las hembras no se encontraron diferencias significativas entre grupos en la corteza, hipocampo ni el hígado. De hecho, la dispersión en los datos fue mayor que la encontrada en los machos, lo que hace a la muestra muy heterogénea, Sin embargo, es interesante observar que en el hipocampo, el estado redox se encuentra menos oxidado que el hígado o la corteza (Fig.11).

Cabe mencionar que la dispersión de datos fue mayor en las hembras que en los machos, y la variabilidad de los datos dentro de cada grupo fue mayor que la que se presentó en los machos, pero al comparar entre géneros no se encontró diferencia alguna en corteza, hipocampo o hígado.

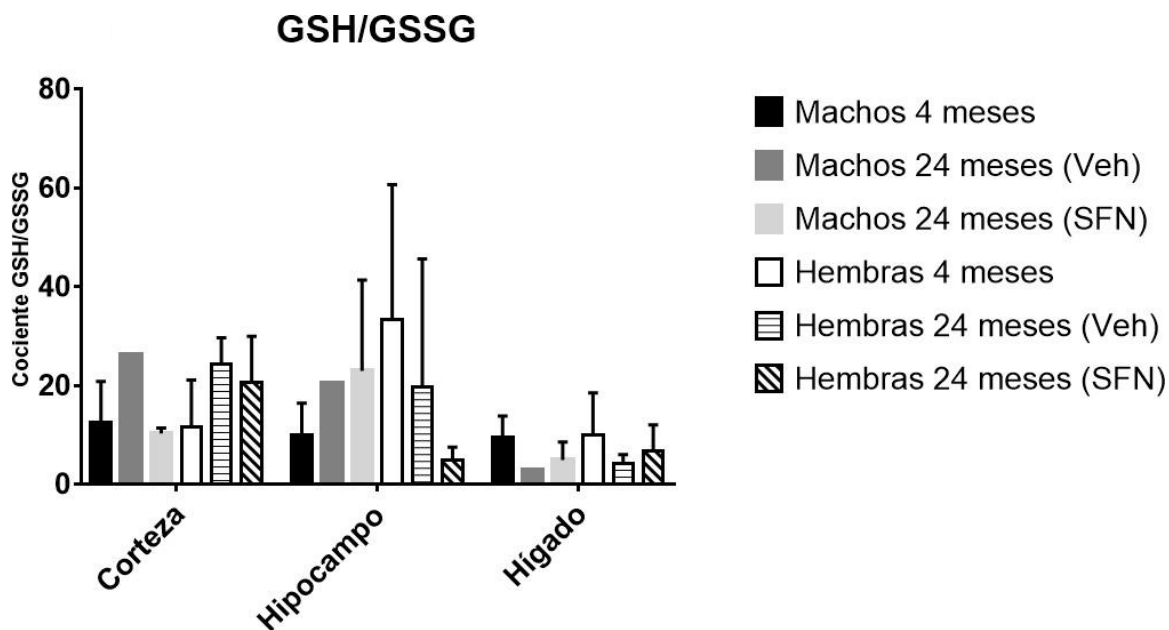


Fig.11 Se muestran los cocientes de GSH/GSSG en corteza, hipocampo, hígado y plasma de ratas hembras y machos de 4 meses, 24 meses de edad a quienes se les administró el vehículo y 24 meses de edad administrados con SFN. No se encontraron diferencias significativas entre grupos en el hipocampo, la corteza o el hígado. Se encontró una mayor dispersión de datos en hembras en comparación con los machos. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

6.4.2 Daño a proteínas por carbonilación

Se evaluó la concentración de proteínas carboniladas tanto en corteza como en hipocampo de ratas de 24 meses de edad tratadas y no tratadas para evaluar el daño por estrés oxidante. Cabe mencionar que el valor del macho control de 24 meses de edad es similar a los obtenidos en los tratados con SFN (Fig.12). Se deberán hacer estudios con una n más grande para poder determinar si existen o no diferencias significativas entre estos grupos. No parece existir diferencia en el daño provocado por el estrés oxidante, lo cual coincide con lo obtenido en el cociente de GSH/GSSG. De cualquier forma se necesita aumentar la n de machos de 24 meses de edad sin tratamiento para tener resultados fiables.

En el caso de las hembras tampoco se encontraron diferencias significativas en la corteza entre las tratadas con SFN y las no tratadas, pero en el hipocampo se puede observar una menor concentración de proteínas carboniladas en las hembras con tratamiento en comparación con las control, lo que puede ser traducido como un menor daño a proteínas debido al estrés oxidante (Fig.12).

En este caso no se encontraron diferencias entre la carbonilación de proteínas de hembras y machos tratados con SFN.

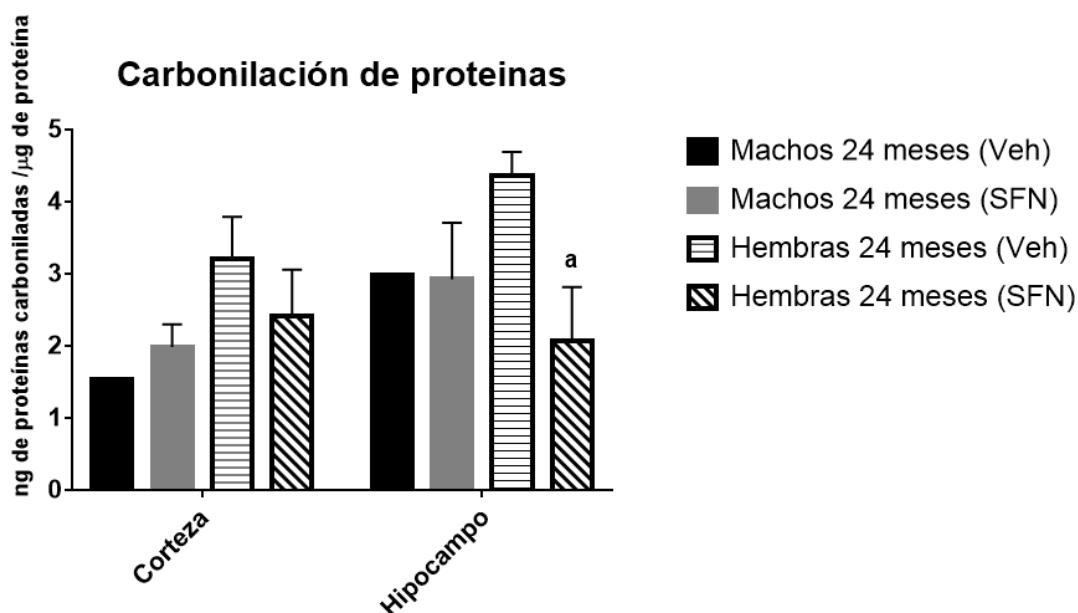


Fig.12 Se muestran los ng de proteínas carboniladas/μg de proteína de machos y hembras de 24 meses de edad tratadas y no tratadas con SFN. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas carboniladas en corteza, sin embargo sí hubo disminución de éstas en el hipocampo de las ratas tratadas con SFN. **a:** Diferencia significativa con el grupo de 24 meses (vehículo). Prueba de T para dos muestras; $p < 0.05$.

6.4.3 Actividad enzimática antioxidante de la superóxido dismutasa

Se evaluó la actividad enzimática antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD). Los machos tratados con SFN presentaron una mayor actividad de SOD en corteza e hígado en comparación con el grupo de 4 meses. Sin embargo, en el hipocampo se tuvo una menor actividad de SOD de los machos tratados con SFN comparada con la de los machos de 4 meses (Fig.13).

Las hembras no presentaron diferencias significativas entre grupos en corteza, hipocampo, ni hígado (Fig. 13). La dispersión de los datos fue mayor en el hipocampo en los 3 grupos evaluados. También puede observarse que en este caso la actividad de SOD fue mayor en el hipocampo en comparación con los demás órganos.

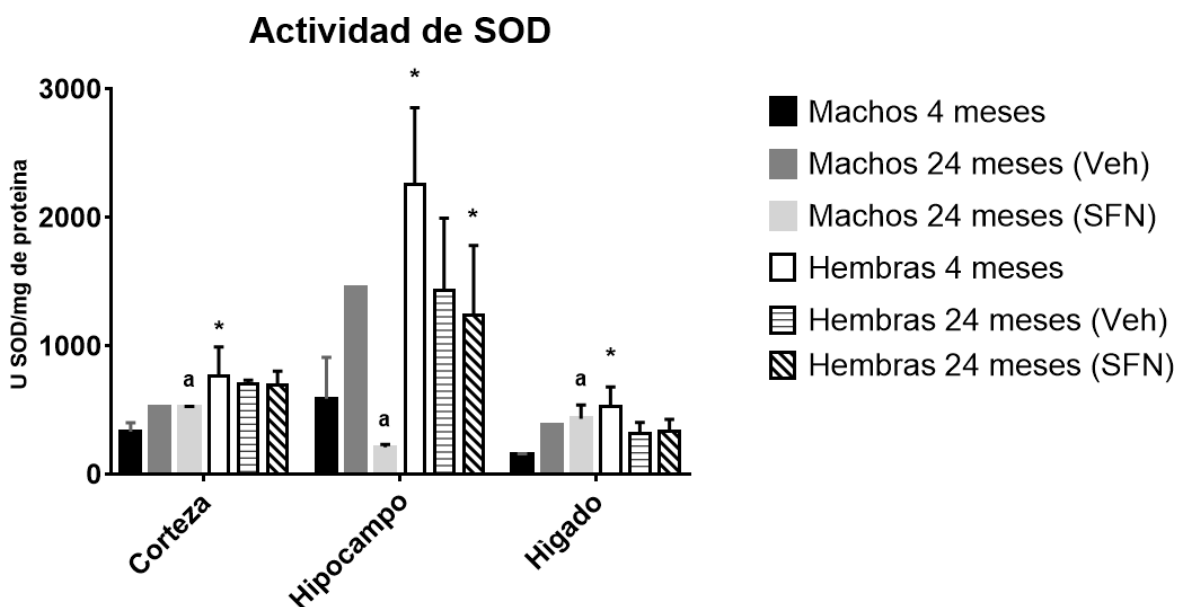


Fig.13 Se muestra la actividad de SOD en ratas machos y hembras de 4 meses, 24 meses tratadas y no tratadas con SFN. En la corteza, el hipocampo y el hígado de los machos se encontraron diferencias significativas en la actividad de SOD, pero no en las hembras. **a**: diferencia significativa con el grupo de 4m. *****: diferencia significativa con el otro género. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

Además, al comparar la actividad de SOD de machos y hembras se observó que es mayor en hembras de 4 meses con respecto a machos de la misma edad, y se mantiene constante durante el envejecimiento, mientras que en los machos parece aumentar con la edad.

6.4.4 Actividad enzimática antioxidante de la catalasa

Se evaluó la actividad enzimática antioxidante de la catalasa. Los machos no tuvieron diferencias significativas en la actividad de esta enzima en la corteza o el hipocampo, sin embargo, se observó un aumento en el hígado de los machos de 24 meses de edad tratados durante tres meses con SFN (Fig.13). En el hipocampo e hígado el macho de 24 meses a quien se le administró el vehículo fueron menores que en los tratados, mientras que en la corteza se obtuvo un valor mayor. Las hembras de 24 meses de edad tratadas con SFN no presentaron diferencias significativas en la corteza, hipocampo o hígado, con respecto al grupo de 4 o de 24 meses. En cambio, en el plasma se notó un aumento significativo de la actividad de Cat en los grupos de ratas de 24 meses de edad tratadas y no tratadas con SFN en comparación con el grupo de 4 meses (Fig.13).

En este caso no se encontraron diferencias significativas en la actividad de Cat en el cerebro de machos y hembras, pero sí en el hígado, en donde la actividad de Cat de las hembras parece mantenerse constante con la edad, mientras que la de los machos parece incrementar durante el envejecimiento, al igual que en la actividad de SOD.

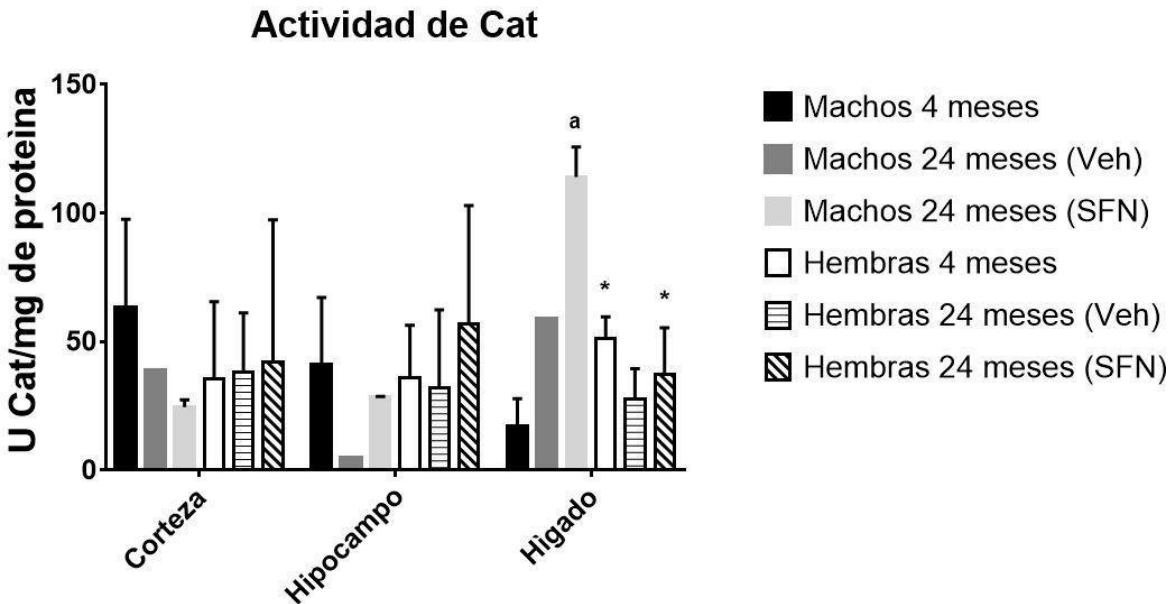


Fig.11 Se muestra la actividad de la catalasa en ratas machos y hembras de 4 meses, 24 meses tratadas y no tratadas con SFN. En la corteza y el hipocampo no se encontraron diferencias significativas en la actividad de Cat en ninguno de los dos géneros. Pero en el hígado de los machos se encontró mayor actividad de Cat en comparación con el grupo de 4 meses. También se encontraron diferencias entre la actividad de Cat en el hígado de machos y hembras a: diferencia significativa con el grupo de 4m. *: diferencia significativa con el otro género. ANOVA con prueba *post hoc* de Tukey; $p < 0.05$.

7. Discusión

La diferencia en la esperanza de vida entre machos y hembras ha sido evaluada desde hace varias décadas. Suter *et al.* (1979) en un extenso estudio concluyó que las ratas mantenidas en condiciones de laboratorio tienen una esperanza de vida promedio de 2 años, en donde los machos viven 711 ± 5.8 días (23.3 meses aproximadamente) y las hembras 765 ± 8 días (25.15 meses aproximadamente) siendo más longevas con una diferencia de aproximadamente 50 días y con un porcentaje de supervivencia 10% mayor que los machos. Durante este estudio la

diferencia entre el porcentaje de supervivencia fue de alrededor del 20% más a favor de las hembras. Este patrón está conservado en diversas especies de mamíferos, en los que las hembras parecen vivir más que los machos, esto en parte puede deberse a la presencia de hormonas como el estrógeno, al que se le han adjudicado características antioxidantes (Stice, *et al.*, 2009) e incluso antiinflamatorias a nivel de sistema nervioso central (Benedusi, *et al.*, 2012) confiriendo una ventaja a las hembras con respecto a los machos en cuanto a la disminución del daño producido por el aumento en el estrés oxidante y de la inflamación crónica de bajo grado, que son dos de las características principales durante el envejecimiento.

Aparentemente, el SFN no ejerce ningún efecto sobre la longevidad de los animales tratados, ya sean machos o hembras. Esto podría explicarse debido a la edad en la que comenzaron a tratarse, ya que la administración de SFN comenzó a los 21 meses de edad, y se mantuvo durante los últimos tres meses de vida de los animales, por lo que el daño acumulado a lo largo de la vida probablemente ya estuviera en un grado avanzado, por lo que el posible efecto protector del SFN podría verse abolido por esta razón. El objetivo de administrar el SFN en animales viejos era determinar si existía alguna mejora en la velocidad de conducción nerviosa de los animales mediante la inducción de respuestas de protección, pero los resultados sugieren que la administración debería de comenzar antes, cuando el daño aún pueda ser reparable mediante las vías activadas del SFN.

Esta misma consideración podría ser válida para los resultados obtenidos en la medición del volumen de la corteza cerebral y del hipocampo, ya que la

disminución del volumen cerebral comienza aproximadamente a los 12 meses de edad (Driscoll, *et al.*, 2006), lo que sugiere que el tratamiento con algún inductor de respuestas de protección, como lo es el SFN, no podría actuar a edades tan avanzadas debido a que el daño por estrés oxidante acumulado durante la vejez no puede ser reparado en etapas tan tardías por medio de la activación de vías de protección celular como las que activa el SFN.

Para el hipocampo no se encontraron diferencias significativas entre jóvenes y viejos aunque existen otros estudios en donde se utilizan imágenes por resonancia magnética en esta misma estructura y reportan una reducción significativa del volumen total del hipocampo (Driscoll, *et al.*, 2006), sin embargo emplean un resonador de 9.4T, que les permite tener mayor resolución en las imágenes, ya que las diferencias que encontraron entre los jóvenes y los viejos fueron mínimas.

A pesar de esto, se esperaba que el tratamiento con SFN pudiese activar respuestas intracelulares de protección, especialmente mediante la vía de Nrf2 y así promover cambios en el estado redox celular que pudieran revertir el estado preferentemente oxidado característico del envejecimiento. De manera interesante, no se registró ningún cambio en el estado redox en machos ni en hembras, ni siquiera entre los grupos de ratas jóvenes en comparación con viejas. Esto podría deberse a la dispersión de los datos, ya que se presentaron desviaciones estándar altas en la mayoría de los grupos, sin embargo, en los machos tratados (n=2) y no tratados (n=1) los grupos eran muy pequeños, por lo que se necesita un estudio más extenso con más sujetos por grupo para poder confirmar esto.

Al comparar el daño por carbonilación de proteínas pudo observarse que el tratamiento con SFN reduce la cantidad de proteínas carboniladas en el hipocampo de las hembras de 24 meses de edad tratadas con SFN durante tres meses en comparación con las de 24 meses a quienes se les administró solamente el vehículo, lo cual no ocurrió en la corteza. Muchos isotiocianatos han demostrado suprimir tanto la carbonilación de proteínas, como la lipoperoxidación, producto del estrés oxidante por vía de Nrf2 (Shimoda, *et al.*, 2018) Sin embargo, existen reportes en los que se ha estudiado la disminución en la transcripción de genes regulados por Nrf2 debido a la disminución en la concentración de Nrf2 nuclear (Suh, *et al.*, 2004). Además, se ha evaluado una marcada reducción en la expresión de Nrf2 nuclear y total durante el envejecimiento (Duan, *et al.*, 2009). Lo que sugiere una respuesta de por qué el SFN no tuvo efecto en los animales de 24 meses de edad, ya que como se explicó anteriormente, el SFN actúa mediante la vía de Nrf2.

En cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y Cat, ambas presentaron un patrón similar, en el que la actividad de éstas parecía incrementar con la edad en los machos, pero en las hembras se mantuvo constante, lo que corresponde con estudios realizados en células de la sangre (Saraymen, *et al.*, 2003), en donde se demuestra que la actividad de estas enzimas es dependiente tanto de la edad, como del género, lo que corresponde con lo reportado por Sobočanec *et al.* (2003), quien sugiere que esto podría deberse a la diferencia en la concentración de hormonas esteroideas, así como la diferencia en la respuesta ante el estrés dada por la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. Los

datos obtenidos sugieren una mayor activación de SOD en la corteza cerebral de los machos tratados con SFN, lo que corresponde con un menor porcentaje de disminución de la velocidad de conducción nerviosa, sin embargo no es suficiente para explicar la protección otorgada sobre la velocidad de conducción nerviosa mostrada. En las hembras no se identificaron cambios significativos en la actividad de ninguna de las dos enzimas antioxidantes evaluadas en las ratas viejas con o sin tratamiento, lo que también puede relacionarse con un aumento más notorio sobre las latencias de los potenciales evocados.

Es importante mencionar que la administración de SFN sí produjo un efecto sobre la velocidad de conducción nerviosa en los potenciales evocados de los machos, siendo más notorio en las vías somatosensoriales, tanto mediales como tibiales, ya que al ser vías más largas pueden identificarse cambios más drásticos sobre la velocidad de conducción debido a la longitud de las vías mielinizadas que pueden ser potencialmente dañadas durante el envejecimiento, aunque es necesario aumentar los grupos para confirmar esta hipótesis ya que en los machos sólo se contó con una $n=2$ en caso de los tratados y $n=1$ en el de los no tratados. Interesantemente, el SFN no incrementó la actividad de las enzimas antioxidantes, ni el cociente GSH/GSSG, lo que indica que la protección brindada por el SFN no fue por medio de la modulación del estrés oxidante. Esto es similar a lo obtenido con el tBHQ en el estudio de Silva-Palacios, *et al.* (2017), en donde se demostró que la administración de un inductor de la respuesta antioxidante por medio de la vía de Nrf2 brindó protección ante la muerte neuronal ante la agresión con un neurotóxico, pero no indujo la transcripción de enzimas antioxidantes en animales

viejos, ni aumentó la concentración de Nrf2 o su importación al núcleo, por lo que se sugirió que la protección brindada por el inductor de las respuestas de protección celular no era por medio de la vía de Nrf2. Debido a esto es importante realizar estudios a edades más tempranas en las que el organismo aún tenga la capacidad de reaccionar a la inducción de las respuestas de protección celular, además de estudiar vías alternas activadas por el SFN para poder dilucidar el efecto protector que se encontró en la velocidad de conducción nerviosa de los machos de 24 meses de edad tratados, y en la disminución de la concentración de proteínas carboniladas en las hembras de 24 meses de edad tratadas, ya que parece tener efectos diferenciales dependientes del sexo.

8. Conclusión

El tratamiento con SFN por tres meses a ratas viejas machos provee protección a los machos en la velocidad de conducción nerviosa en las vías auditiva y somatosensoriales. En las hembras el tratamiento con SFN redujo la concentración de proteínas carboniladas en el hipocampo. Esto sugiere que el efecto del SFN es dependiente del sexo. Sin embargo, tanto en machos como en hembras el tratamiento con SFN no tuvo efecto sobre el estado redox o la actividad de las enzimas antioxidantes, sugiriendo que la protección brindada no se da por la modulación del estado redox.

9. Perspectivas

- 1) Administrar SFN a edades más tempranas para eliminar la variable del daño previamente producido por la edad avanzada.
- 2) Realizar un estudio longitudinal, siguiendo a los animales a lo largo del tiempo para identificar cambios a nivel individual para obtener datos más robustos.
- 3) Determinar la vía por la cual el SFN protege a las vías sensoriales durante el envejecimiento.
- 4) Realizar histología de animales envejecidos para medir los cambios efectuados durante el envejecimiento y el tratamiento con SFN.
- 5) Determinar el efecto del SFN sobre estado inflamatorio del cerebro.

10 Referencias:

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 105, 121-126.

Alarcón-Aguilar, A., Luna-López, A., Ventura-Gallegos, J.L., Lazzarini, R., Galván-Arzate, S., González-Puertos, V.Y., Morán, J., Santamaría, A., Königsberg, M. 2014. Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP+ toxicity after TBHQ pre-treatment. *Neurobiology of Aging*. 35(8):1901-1912.

Aminoff, M. J. (2012). *Aminoff's electrodiagnosis in clinical neurology*. McGraw Hill Professional. The peripheral nervous system and introduction to Electronmyography / Nerve conduction studies. 129-136.

Aunan, J. R., Watson, M. M., Hagland, H. R., & Søreide, K. (2016). Molecular and biological hallmarks of ageing. *British Journal of Surgery*, 103(2).

Austad, S. N., & Fischer, K. E. (2016). Sex differences in lifespan. *Cell metabolism*, 23(6), 1022-1033.

Bai, Y., Cui, W., Xin, Y., Miao, X., Barati, M. T., Zhang, C., ... & Cai, L. (2013). Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 57, 82-95.

Barja, G. (2004). Free radicals and aging. *TRENDS in Neurosciences*, 27(10), 595-600.

Benedusi, V., Meda, C., Della Torre, S., Monteleone, G., Vegeto, E., and Maggi, A. (2012). A lack of ovarian function increases neuroinflammation in aged mice. *Endocrinology* 153, 2777–2788.

Bhakkiyalakshmi, E., Sireesh, D., Rajaguru, P., Paulmurugan, R., & Ramkumar, K. M. (2015). The emerging role of redox-sensitive Nrf2–Keap1 pathway in diabetes. *Pharmacological research*, 91, 104-114.

Bórquez, D. A., Urrutia, P. J., Wilson, C., Van Zundert, B., Núñez, M. T., & González-Billault, C. (2016). Dissecting the role of redox signaling in neuronal development. *Journal of neurochemistry*, 137(4), 506-517.

Carlson, N. R. (2010). *Physiology of behavior*. Boston: Allyn & Bacon. 75-106

Casas-Grajales, S., & Muriel, P. (2015). Antioxidants in liver health. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, 6(3), 59.

Chandrasekaran, V., Lea, C., Sosa, J. C., Higgins, D., & Lein, P. J. (2015). Reactive oxygen species are involved in BMP-induced dendritic growth in cultured rat sympathetic neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 67, 116-125.

Chen, T. J., & Chen, S. S. (1991). Generator study of brainstem auditory evoked potentials by a radiofrequency lesion method in rats. *Experimental brain research*, 85(3), 537-542.

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

Csiszar, A., Sosnowska, D., Wang, M., Lakatta, E. G., Sonntag, W. E., & Ungvari, Z. (2012). Age-associated proinflammatory secretory phenotype in vascular smooth muscle cells from the non-human primate *Macaca mulatta*: reversal by resveratrol treatment. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 67(8), 811-820.

Cui, W., W. Cui, Y. Bai, X. Miao, P. Luo, Q. Chen, Y. Tan, M. J. Rane, L. Miao, & L. Cai. (2012). Prevention of Diabetic Nephropathy by Sulforaphane: Possible Role of Nrf2 Upregulation and Activation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012.

Dinkova-Kostova, A. T., Fahey, J. W., Kostov, R. V., & Kensler, T. W. (2017). KEAP1 and done? Targeting the NRF2 pathway with sulforaphane. *Trends in food science & technology*.

Driscoll, I., Hamilton, D. A., Petropoulos, H., Yeo, R. A., Brooks, W. M., Baumgartner, R. N., & Sutherland, R. J. (2003). The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cerebral cortex*, 13(12), 1344-1351.

Driscoll, I., Howard, S. R., Stone, J. C., Monfils, M. H., Tomanek, B., Brooks, W. M., & Sutherland, R. J. (2006). The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*, 139(4), 1173-1185.

Dröge, W., & Schipper, H. M. (2007). Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging cell*, 6(3), 361-370.

Duan, W., Zhang, R., Guo, Y., Jiang, Y., Huang, Y., Jiang, H., & Li, C. (2009). Nrf2 activity is lost in the spinal cord and its astrocytes of aged mice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 45(7), 388-397.

Farris, T.K. & Reed, D.J. (1987). High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods of Enzymology*, 143: 101-109.

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.

Garbay, B., Heape, A. M., Sargueil, F., & Cassagne, C. (2000). Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progress in neurobiology*, 61(3), 267-304.

Gardner, E. P., & Johnson, K. O. (2013). The somatosensory system: Receptors and central pathways. *Principles of neural science*, 475-497.

Gómez-Quiroz, L. E., Factor, V. M., Kaposki-Novak, P., Coulouam, C., Conner, E.A., & Thorgeirsson, S. S. (2008). Hepatocyte-specific c-Met deletions disrupts

redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14581-14589.

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.

El-Sayyad, H. I., Khalifa, S. A., El-Sayyad, F. I., AL-Gebaly, A. S., El-Mansy, A. A., & Mohammed, E. A. (2014). Aging-related changes of optic nerve of Wistar albino rats. *Age*, 36(2), 519-532.

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.

Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontology*, 11, 298-300.

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

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

Hernández-Godínez a, B., Ibáñez-Contreras, A., Durand-Rivera, A., Reyes-Pantoja, S. A., Ramírez-Hernández, R., Rodríguez-Guzmán, P., & Tena-Betancourt, E. (2011). Somatosensory evoked potentials of median and tibial

nerves in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) under captivity: influence of ontogenic status in neonatal, infant, young, adult, and senile stages. *Journal of medical primatology*, 40(2), 79-87.

Hamilton, R., Walsh, M., Singh, R., Rodriguez, K., Gao, X., Rahman, M. M., ... & Bhattacharya, A. (2016). Oxidative damage to myelin proteins accompanies peripheral nerve motor dysfunction in aging C57BL/6 male mice. *Journal of the neurological sciences*, 370, 47-52.

Hernández-Godínez b, B., Ibáñez-Contreras, A., Durand-Rivera, A., Galván-Montaño, A., Reyes-Pantoja, S. A., & Cárdenas-Lailson, E. (2011). Latencies using somatosensory evoked potentials of the median and tibial nerve in rhesus monkey undergoing intrauterine laminectomy to simulate myelomeningocele. *Cir Cir*, 79, 237-41.

Hu, C., Egger, A. L., Mesecar, A. D., & Van Breemen, R. B. (2011). Modification of keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chemical research in toxicology*, 24(4), 515-521.

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.

Hurtado-Alvarado, G., Domínguez-Salazar, E., Velázquez-Moctezuma, J., Gómez-González, B. (2016). A2A Adenosine receptor antagonism reverts the blood-brain barrier dysfunction induced by sleep restriction. *Plos One*, 11(11).

Ibanez-Contreras, A., Durand-Rivera, A., Hernandez-Godinez, B., & Reyes-Pantoja, S. (2011). Brainstem's auditory evoked potentials in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) in different physiologic stages under captivity. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 43(3), 223-232.

Ibáñez-Contreras, A., Poblano, A., Hernández-Godínez, B., Alarcón-Aguilar, A., Arteaga-Silva, M., Tena-Betancourt, E., Königsberg, M., (2014). The Use of Non-Human Primates As Bio-Models for Aging Brain Studies: Interventional Role of Oxidative Stress in Demyelization Processes. Nova Science Publishers, Inc. *Monkeys: Brain development, Social & hormonal mechanisms and Zoonotic diseases*. USA, pp 35-50.

Ibáñez-Contreras, A., Poblano, A., Arteaga-Silva, M., Hernández-Godínez, B., Hernández-Arciga, U., Toledo, R., & Königsberg, M. (2016). Visual, auditive and somatosensory pathways alterations in geriatric rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Journal of medical primatology*, 45(2), 92-102.

Ibáñez-Contreras, A., Hernández-Arciga, U., Poblano, A., Arteaga-Silva, M., Hernández-Godínez, B., Mendoza-Cuevas, G. I., ... & Konigsberg, M. (2018). Electrical activity of sensory pathways in female and male geriatric Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), and its relation to oxidative stress. *Experimental gerontology*, 101, 80-94.

Iliescu, D. A., Ciubotaru, A., Ghiță, M. A., Păun, A. M., Ion, T., & Zăgrean, L. (2018). Electrophysiologic evaluation of the visual pathway at different depths of

sevoflurane anesthesia in diabetic rats. *Romanian journal of ophthalmology*, 62(1), 34.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2017). Estadísticas a propósito del día internacional de las personas de edad 2017.

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

Kakrani, A. L., Gokhale, V. S., Vohra, K. V., & Chaudhary, N. (2014). Clinical and nerve conduction study correlation in patients of diabetic neuropathy. *J Assoc Physicians India*, 62(1), 24-27.

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.

Le Belle, J. E., Orozco, N. M., Paucar, A. A., Saxe, J. P., Mottahedeh, J., Pyle, A. D., ... & Kornblum, H. I. (2011). Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell stem cell*, 8(1), 59-71.

Li, J., Johnson, D., Calkins, M., Wright, L., Svendsen, C., & Johnson, J. (2004). Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. *Toxicological Sciences*, 83(2), 313-328.

Longstaff, A. (2002). *Neuroscience*. 3rd ed. New York: Garland Science, 1-23

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.

Mansour, H., Chamberlain, C. G., Weible, I. I., Michael, W., Hughes, S., Chu, Y., & Chan-Ling, T. (2008). Aging-related changes in astrocytes in the rat retina: imbalance between cell proliferation and cell death reduces astrocyte availability. *Aging Cell*, 7(4), 526-540.

Marieb, E. N., & Hoehn, K. (1998). The peripheral nervous system and reflex activity. *Human Anatomy and Physiology*, 4th edn. New York: Addison-Wesley Longman, 464-465.

Marnier, L., Nyengaard, J. R., Tang, Y., & Pakkenberg, B. (2003). Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. *Journal of comparative neurology*, 462(2), 144-152.

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.

Miao, X., Bai, Y., Sun, W., Cui, W., Xin, Y., Wang, Y., ... & Cai, L. (2012). Sulforaphane prevention of diabetes-induced aortic damage was associated with

the up-regulation of Nrf2 and its down-stream antioxidants. *Nutrition & metabolism*, 9(1), 84.

Montine, T. J., Neely, M. D., Quinn, J. F., Beal, M. F., Markesbery, W. R., Roberts II, L. J., & Morrow, J. D. (2002). Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease¹, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 620-626.

Morell, P., & Quarles, R. H. (1999). Characteristic composition of myelin. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, 6.

Murali, G., & Panneerselvam, C. (2007). Age-associated oxidative macromolecular damages in rat brain regions: role of glutathione monoester. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(8), 824-830.

Opalach, K., Rangaraju, S., Madorsky, I., Leeuwenburgh, C., & Notterpek, L. (2010). Lifelong calorie restriction alleviates age-related oxidative damage in peripheral nerves. *Rejuvenation research*, 13(1), 65-74.

Oswald, M. C., Garnham, N., Sweeney, S. T., & Landgraf, M. (2018). Regulation of neuronal development and function by ROS. *FEBS letters*, 592(5), 679-691.

Palve, S. S., & Palve, S. B. (2018). Impact of aging on nerve conduction velocities and late responses in healthy individuals. *Journal of neurosciences in rural practice*, 9(1), 112.

Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., & Caparrini, A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 154(2), 536-541.

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.

Peters, R. (2006). Ageing and the brain. *Postgraduate medical journal*, 82(964), 84-88.

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.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., & White, L. E. (2014). *Neuroscience, 2008. De Boeck, Sinauer, Sunderland, Mass.*

Salat, D. H., Buckner, R. L., Snyder, A. Z., Greve, D. N., Desikan, R. S., Busa, E., ... & Fischl, B. (2004). Thinning of the cerebral cortex in aging. *Cerebral cortex*, 14(7), 721-730.

Saraymen, R., Kilic, E., & Cetin, M. (2003). Influence of sex and age on the activity of antioxidant enzymes of polymorphonuclear leukocytes in healthy subjects. *Yonsei medical journal*, 44(1), 9-14.

Shadel, G. S., & Horvath, T. L. (2015). Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*, 163(3), 560-569.

Shimoda, H., Hirano, M., Takeda, S., & Hitoie, S. (2018). Glucosinolates and isothiocyanates from broccoli seed extract suppress protein glycation and carbonylation. *Functional Foods in Health and Disease*, 8(1), 35-48.

Sims-Robinson, C. Hur, H., Hayes, J.M., Dauch1, J. R., Keller, P. J. Brooks, S. V., Feldman E. L. (2013). The role of oxidative stress in nervous system aging. *Plos One*, 8(7)

Silva-Palacios, A., Colín-González, A. L., López-Cervantes, S. P., Zazueta, C., Luna-López, A., Santamaría, A., & Königsberg, M. (2017). Tert-butylhydroquinone pre-conditioning exerts dual effects in old female rats exposed to 3-nitropropionic acid. *Redox biology*, 12, 610-624.

Silva-Palacios, A., Ostolga-Chavarría, M., Zazueta, C., & Königsberg, M. (2018). Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging. *Ageing research reviews*, 47, 31-40.

Simons, M., & Nave, K. A. (2016). Oligodendrocytes: myelination and axonal support. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(1), a020479.

Snaidero, N., & Simons, M. (2014). Myelination at a glance. *Journal of Cell Science*, 127, 2999-3004.

Sobočanec, S., Balog, T., Šverko, V., & Marotti, T. (2003). Sex-dependent antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in ageing mouse brain. *Free radical research*, 37(7), 743-748.

Solís-Chávez, S. A., Durand-Rivera, A., Ibáñez-Contreras, A., Reyes-Pantoja, S. A., Valderrama, K., Heras-Romero, Y., ... & Hernández-Godínez, B. (2012). Visual

evoked potentials to light flashes in captive rhesus monkeys: A study reflecting cerebral cortical activity and brain maturation. *Pakistan Veterinary Journal*, 12.

Stice, J.P., Lee, J.S., Pechenino, A.S., and Knowlton, A.A. (2009). Estrogen, aging and the cardiovascular system. *Future Cardiol.* 5, 93–103.

Stirpe, F. & Della-Corte, E. (1969). The regulation of rat liver xanthine oxidase conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *Journal of Biological Chemistry*, 244(14), 3855-3863.

Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R. M., & Hagen, T. M. (2004). Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), 3381-3386.

Suter, P., Luetkemeier, H., Zakova, N., Christen, P., Sachsse, K., & Hess, R. (1979). Lifespan studies on male and female mice and rats under SPF-laboratory conditions. In *Mechanism of Toxic Action on Some Target Organs* (pp. 403-407). Springer, Berlin, Heidelberg.

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

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.

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.

Walsh, M. E., Sloane, L. B., Fischer, K. E., Austad, S. N., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2015). Use of nerve conduction velocity to assess peripheral nerve health in aging mice. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(11), 1312-1319.

Wilson, C., Núñez, M. T., & González-Billault, C. (2015). Contribution of NADPH oxidase to the establishment of hippocampal neuronal polarity in culture. *J Cell Sci*, 128(16), 2989-2995.

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

Xing, Y., Samuvel, D. J., Stevens, S. M., Dubno, J. R., Schulte, B. A., & Lang, H. (2012). Age-related changes of myelin basic protein in mouse and human auditory nerve. *PLoS One*, 7(4), e34500.

Xu, C., Shen, G., Chen, C.Y., Gélinas, C., & Kong, A. (2005). Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through IkappaBalpha, IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncogene*, 24 28, 4486-95.

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

Yardimci, N., Cemeroglu, O., Ozturk, E., Gürlü, G., Şahin, E., Bozkurt, S., ... & İlhan, A. (2016). Median and Ulnar Neuropathy Assessment in Parkinson's Disease regarding Symptom Severity and Asymmetry. *Parkinson's Disease*, 2016.

Zhao, Z., Liao, G., Zhou, Q., Lv, D., Holthfer, H., & Zou, H. (2016). Sulforaphane attenuates contrast-induced nephropathy in rats via Nrf2/HO-1 pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00191

Matrícula: 2163802553

EFFECTOS DEL SULFORAFANO
SOBRE LA VELOCIDAD DE
CONDUCCIÓN NERVIOSA Y SU
RELACIÓN CON EL ESTADO REDOX
EN LA CORTEZA CEREBRAL DE
RATAS VIEJAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 3 del mes de septiembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ
DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES
DRA. ANAHI CHAVARRIA KRAUSER
DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ROBERTO SANTIN MARQUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III 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

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. BEATRIZ GOMEZ GONZALEZ

VOCAL

DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES

VOCAL

DRA. ANAHI CHAVARRIA KRAUSER

SECRETARIA

DRA. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS