

# La suplementación con Resveratrol y $\alpha$ -Tocoferol pueden reducir el riesgo de sarcopenia en perros por contrarrestar el stress oxidativo.

Raúl Francisco Pastor<sup>a,\*</sup>, Patrizia Restani<sup>b</sup>, Juan E. Romero<sup>c</sup>, Enzo B. Ferro<sup>d</sup>, Diego R. Serantes<sup>e</sup>, Juan Ugalde<sup>e</sup>, Elena Pastor<sup>a</sup> and Roberto H. Iermoli<sup>f</sup>

<sup>a</sup>*Polyphenols, Wine and Health Unit, Fourth Chair of Medicine Universidad de Buenos Aires, Córdoba Avenue 2351 11th Floor, CABA, C1120AAF Argentina*

<sup>b</sup>*Departments of Pharmacological and Biomolecular Sciences Scienze, Università degli Studi di Milano via Balzaretti 9 - 20133 Milano, Italia*

<sup>c</sup>*Faculty of Veterinary Sciences of the University of The Pampa, Calle 5 esq. 116, 6360 Gral. Pico, La Pampa, Argentina*

<sup>d</sup>*High School of Veterinary Sciences, National University of the Center of Buenos Aires Province, University Campus, Paraje Arroyo Seco S/N Tandil (CP 7000), Buenos Aires, Argentina*

<sup>e</sup>*Institute of Biotechnology Research, National University of San Martín, 25 de Mayo y Francia, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina*

<sup>f</sup>*Fourth Chair of Medicine, Clinics Hospital University of Buenos Aires, Córdoba Avenue 2351 11th Floor, CABA, Argentina*

**RESUMEN.** Diversas evidencias científicas muestran que el estrés oxidativo está asociado con el origen, progresión y la gravedad de las enfermedades crónicas no transmisibles. Debido a la duración más prologada de la vida, la sarcopenia, osteopenia, osteoporosis y caquexia están considerados síndromes emergentes para perros y gatos. El objetivo fue investigar el impacto de la complementación con resveratrol y  $\alpha$ -tocoferol (JUVENIA®) en los efectos dañinos del estrés oxidativo en perros adultos. El estudio fue capaz de demostrar que esta complementación pudo modular positivamente la creatin fosfoquinasa y la fosfatasa alcalina, que son considerados marcadores biológicos útiles para sarcopenia, formación de huesos y velocidad de remodelación ósea. Como resultado de la vida más prolongada en animales domésticos y en particular de perros, el uso de complementos alimenticios con actividad antioxidante podría jugar un rol crítico en reducir/retrasar la aparición de enfermedades crónicas degenerativas. Sobre la base de este estudio, el uso de productos que contengan resveratrol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol pareciera ser un enfoque prometedor para mejorar la salud de los perros.

**KEYWORDS:** *Oxidative stress, resveratrol, sarcopenia, bone remodeling, 8(OH)dG, dietary supplement.*

## 1. INTRODUCCIÓN

La incidencia de enfermedades cardiovasculares, metabólicas, neurodegenerativas y cáncer se ha incrementado significativamente en los últimos diez años [1] y ha mostrado que el estrés oxidativo es uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de estas patologías [2, 3]. Los procesos metabólicos dependen de la contribución permanente de energía a través de la síntesis de ATP por la fosforilación oxidativa mitocondrial.

El ATP obtenido es la fuente de energía para todos los sistemas celulares, pero las mitocondrias en la misma actividad biológica producen más de 95% de las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres presentes en el organismo [4].

La inestabilidad química de los radicales libres, que tienen uno o dos electrones en la órbita atómica externa sin aparearse, es responsable por sus fuertes propiedades oxidativas en comparación con todas las moléculas biológicas, como ADN, ARN, proteínas, carbohidratos, lípidos estructurales, representando el punto de partida para la mayoría de las enfermedades crónicas [5]. Durante la evolución de las especies, los sistemas biológicos desarrollaron una batería de herramientas antioxidativas enzimáticas y no enzimáticas a fin de contrarrestar los peligro-

sos efectos de los radicales libres. Esta evolución adaptativa no es siempre suficiente para proteger las moléculas biológicas, ya que el balance redox puede cambiar hacia el estrés oxidativo [6].

Se sabe que la masa ósea y la habilidad para reparar fracturas en humanos disminuye después de los 30 años de edad [7]. Estos parámetros están inversamente asociados con el estrés oxidativo tanto en humanos como animales [8,9].

La incidencia de enfermedades no infecciosas está aumentando también en pequeños animales; entre ellos, sarcopenia, osteopenia y caquexia son considerados importantes síndromes emergentes para perros y gatos [10, 11, 12]. Varios autores sugirieron biomarcadores para sarcopenia en perros; entre otros, creatina fosfoquinasa y aspartato aminotransferasa fueron sugeridas por Tvarijonavičiute [13]. Sarcopenia es la disminución de la función muscular, que es frecuentemente observada en animales y humanos adultos [8, 9]. Sarcopenia es el resultado de la interacción de diferentes mecanismos biológicos.

La International European Working Group on Sarcopenia definió Sarcopenia como un desorden progresivo y expansivo del músculo esquelético, que está asociado con una alta probabilidad de morbilidad tales como caídas, fracturas, discapaci-

\* Corresponding author: Raúl Francisco Pastor Tel.: +54 9 11 4411 4806. E-mail: rpastor@fmed.uba.ar

dad física y mortalidad [14]. En humanos luego de los 30 años de edad, la fuerza y masa muscular esquelética se reduce gradualmente cada año aproximadamente de 1% a 2% [15].

Algunos autores [16, 17] describieron con claridad cómo el estrés oxidativo y la inflamación crónica pueden contribuir a la sarcopenia. De hecho, algunos caminos pueden ser activados o desactivados durante el estrés oxidativo y la inflamación. Uno de los pasos críticos del camino sugerido es el incremento de la producción de moléculas dañadas (oxidadas), como ADN, proteínas y lípidos oxidados. Los procesos oxidativos que contribuyen a la sarcopenia, reducen el número y función de células satélite (células madre miogénicas). La función de las células satélite es afectada por el estrés oxidativo, que es elevado en músculos envejecidos.

La intervención nutricional podría ser una nueva estrategia para mejorar el ambiente y los factores sistémicos de las células satélite, con el objetivo de optimizar la función de las células satélite en el envejecimiento muscular [18]. Varias moléculas se han propuesto como biomarcadores para el estrés oxidativo. Para la fácil cuantificación, algunos de estos parecen particularmente interesantes para evaluar este estado en los perros:

Fosfatasa Alcalina para la velocidad de remodelación de hueso [19] y 8-hidroxi-deoxi-guanosina (8(OH)dG) como un marcador del daño del ADN [20,21].

Sobre estas bases, el objetivo de este estudio fue la evaluación de los posibles efectos protectores de una intervención nutricional en el estrés oxidativo y consecuentemente, en la incidencia de la sarcopenia. Entre las posibles soluciones dietarias, un producto conteniendo resveratrol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol fueron seleccionados para la complementación, gracias a su conocida e importante actividad como antioxidantes [22], [30].

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Animales

Los perros incluidos en este estudio fueron 22, adultos de tamaño medio ( $5.4 \pm 1.4$  años), incluyendo 10 machos y 12 hembras, castrados y desparasitados; su peso era de  $19.4 \pm 4.4$  kg (promedio  $\pm$  desvío estándar). Los animales estaban libres de enfermedades como se estableció en el examen clínico y en los análisis bioquímicos. Los perros de este estudio fueron identificados con tarjetas descriptivas y fotografías también soportados con microchips compatibles con todos los estándares ISO de la marca DATAMARS. Los microchips se insertaron de manera subcutánea en la zona de la cruz del animal.

Los perros se mantuvieron con las mismas condiciones higiénicas y de dieta sin y con la adición del complemento dietario que es el objetivo del estudio. Ninguna otra medicación ni suplemento dietario fueron permitidos. En el día 0 del estudio (D0) se realizó un examen clínico basal y se tomó una muestra de sangre individual para realizar pruebas bioquímicas. Durante los siguientes 45 días, los perros recibieron dos veces al día el suplemento cuya composición se muestra en la Tabla 1. Los perros recibieron una dosis de 5 gramos por comida de JUVENIA DOGS (laboratorio Microsules Argentina; patente de USA requerida: 62659885, que contenía 30 miligramos de resveratrol y 20 UI de acetato de  $\alpha$ -tocoferol; el último caso corresponde al 4% de la dosis diaria recomendada de Vitamina E para perros adultos de tamaño mediano. Al final del tratamiento (día 45, D45) se realizaron nuevos exámenes clínicos y análisis de sangre. Desde el día 45 al día 90 (D45 – D90), todos los perros mantuvieron las condiciones generales del principio, pero la dieta no incluía el suplemento. En el D90, se realizaron nuevos exámenes clínicos y análisis de sangre.

**Tabla 1**  
Composición del Complemento Dietario JUVENIA® DOGS

| Componentes                                       | Composición % | Cantidad (mg) sobre 5g |
|---|---------------|------------------------|
| Hidrolizado de hígado de ave                      | 54,15         | 2706                   |
| Resveratrol                                       | 0,60          | 30                     |
| Vitamina E como acetato DL $\alpha$ tocoferol 50% | 0,80          | 40 equivalent to 20 UI |
| Grasa de gallina                                  | 38,36         | 1920                   |
| Agua  | 5,4           | 270                    |
| Tween 80  | 0,56          | 28                     |
| Nipagin sodium                                    | 0,108         | 5,4                    |
| Nipazol sodium                                    | 0,028         | 1,24                   |

Composición del Complemento Dietario JUVENIA® DOGS. En la primera columna se muestra la composición de principios activos; en la segunda columna se muestra sus porcentajes. La tercera, muestra las cantidades por dosis/ración administrada a cada perro.

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Medición del daño oxidativo del ADN/ARN

Tanto el ADN como el ARN se dañan por la oxidación durante el envejecimiento y en una variedad de estados de enfermedad. Los procesos de reparación que se inician para corregir este daño liberan múltiples especies de guaninas oxidadas en la sangre y la orina. Un ensayo inmunológico (kit del daño oxidativo del ADN/ARN) de Cayman Chemical (Cayman Chemil ítem No. 589320) fue usado para cuantificar los biomarcadores del daño oxidativo del ADN/ARN: las tres especies de guaninas oxidadas; 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina del ADN, 8-hidroxiguanosina de ARN y 8-hidroxiguanina proveniente de ADN y ARN. El suero de los perros se mantuvo a  $-80^{\circ}\text{C}$  y fue analizado acorde a las instrucciones del kit.

Creatina fosfoquinasa (CPK) fue cuantificada por el método de Creatina Quinasa en el sistema ARCHITECT c y en el sistema AEROSSET (Abbot Clinical Chemistry).

Fosfatasa Alcalina Total (FAS) y las sub-fracciones de hueso (FASO) fueron cuantificadas por espectrofotometría (Kit ALP – AMP Biosystems).

Estadísticas: El análisis estadístico fue realizado utilizando el Student t-test para muestras pareadas (Prim 7.0, GraphPad, San Diego, CA, USA). El student t-test fue seleccionado para evaluar de a un único biomarcador a la vez, en 3 series de datos pareados (D0 vs D45, D45 vs D90 y D0 vs D90) de cada perro antes y después de la intervención nutricional.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este ensayo, los animales fueron observados por dos periodos consecutivos de 45 días, donde a la dieta básica se le agregó o no, un complemento dietario que contenía antioxidantes (30 mg de resveratrol y 20UI de acetato de  $\alpha$ -tocoferol). La inclusión de los mismos perros en el control y el grupo tratado minimiza la posibilidad sesgos, como variabilidad intraespecies o entre individuos.

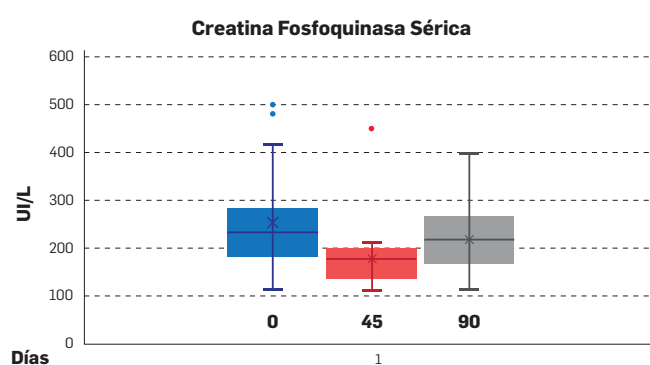
Como se menciona anteriormente, la Creatina Fosfoquinasa (CPK) es considerada un buen biomarcador para sarcopenia en perros.

En relación a los efectos observados en la Fosfatasa Alcalina, nuestra hipótesis es que la intervención nutricional puede modificar la velocidad de remodelación del hueso, modulando el balance entre la formación de hueso y la reabsorción de este tejido. En ausencia de enfermedad hepática o embarazo, la Fosfatasa

**Tabla 2**  
Resultados. Los valores expresados son promedios + desvío estándar

| Biomarcador   | Día 0       | Día 45      | Día 90        | P<br>Día 45 vs Día 0 | P<br>Día 90 vs Día 45 | P<br>Día 90 vs Día 0 |
|---|-------------|-------------|---------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Creatina Fosfoquinasa (CPK) UI/L  | 252±107.1   | 176.5±69.4  | 218.4±67.9    | <0.01                | <0.05                 | NS                   |
| Fosfatasa Alcalina Sérica (FAS). Subfracción ósea (FASO), promedio 82% de FAS. UI/L | 99.3±43.0   | 76.3±27.3   | 140.7±93.7    | <0.05                | <0.01                 | NS                   |
| Fosfatasa Alcalina Sérica Total (FAS) macho   | 87,9±40.9   | 85,8±36.5   | 132±52.5      | NS                   | <0.05                 | <0.05                |
| Fosfatasa Alcalina Sérica Total (FAS) hembra  | 103,5±46,67 | 74,41±24,77 | 144,90±116.87 | <0.05                | <0.05                 | NS                   |

Se muestra la concentración de los biomarcadores séricos de sarcopenia (Creatina Fosfoquinasa), de remodelación ósea (Fosfatasa Alcalina), y daño de ADN (8(OH)dG) evaluada en el final de cada período. Basal en día 0, final al día 45 (con Resveratrol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol). Fue significativo en la comparación de los resultados del día 45 vs día 0. Igual que los resultados del día 90 vs día 45. La evidencia es que el suplemento conteniendo Resveratrol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol produjo una modulación positiva de la sarcopenia, de remodelación ósea y de daño oxidativo del ADN.



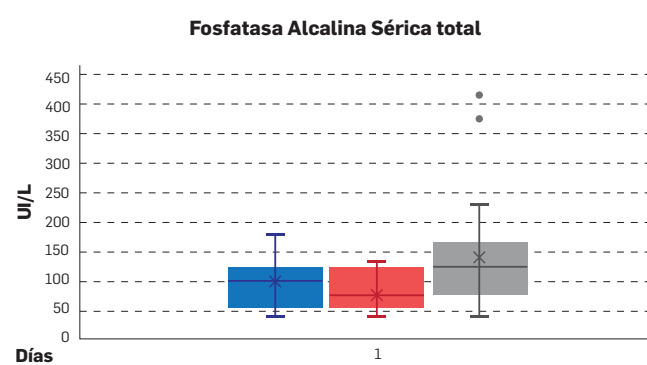
**Fig. 1.** Creatina Fosfoquinasa (CPK) en tiempos y tratamientos diferentes. Los animales fueron observados por dos periodos consecutivos de 45 días, donde a la dieta base se le adicionó o no un complemento dietario conteniendo antioxidantes (30 mg de Resveratrol y 20 UI de acetato de  $\alpha$ -tocoferol). CPK es considerada un buen biomarcador de sarcopenia en perros. Después de 45 días de suplementación, hubo una reducción estadísticamente significativa de las concentraciones séricas de CPK (ver Tabla 2). Estos valores retornaron a sus niveles basales después de 45 días de dieta de base sin suplementación (control).

Alcalina es un biomarcador indirecto de la formación de hueso; cabe mencionar, que las muestras de sangre fueron tomadas siempre a la misma hora, de tal forma que la remodelación del hueso fue evaluada sin interferencia del ritmo circadiano. Diferentes investigaciones mostraron que, después de comenzar un tratamiento con drogas para reducir la reabsorción ósea, existe una disminución significativa en los dos biomarcadores de reabsorción (entre 4 y 6 semanas), y en biomarcadores de formación ósea (entre 2 y 3 meses).

En un gran número de casos, el nivel de meseta es alcanzado a los 2 o 3 meses desde el comienzo del tratamiento y se mantiene constante mientras el tratamiento continúa.

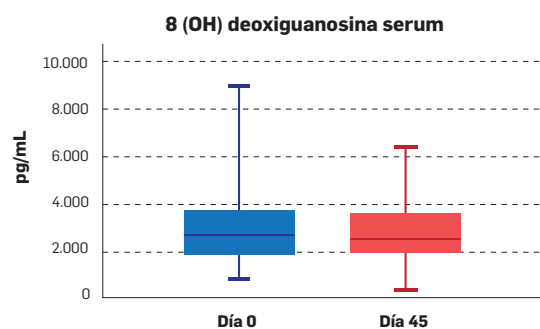
Por lo tanto, las modificaciones van a depender del agente terapéutico usado y el biomarcador estudiado [23–24–25]. En ejemplares jóvenes, el alto valor de fosfatasa alcalina indica que hay remodelación de hueso con predominio de formación; en adultos con estrés postmenopáusico y oxidativo, la fosfatasa alcalina sigue siendo alta, pero la remodelación es asociada con una predominancia de reabsorción neta [19].

De los resultados de la elaboración estadística, se ha mostrado que el complemento dietario con antioxidantes (resveratrol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol) puede modular positivamente estos biomarcadores. Como se muestra en Tabla 2, después de 45 días de suplementación, hubo una reducción estadísticamente significativa de las concentraciones de Creatina Fosfoquinasa (Fig.1) y Fosfatasa Alcalina Total en suero (Fig. 2).

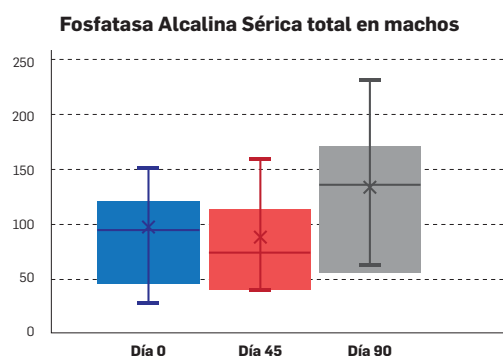


**Fig. 2.** Fosfatasa Alcalina Sérica (FAS) en diferentes tiempos y tratamientos. Los animales fueron observados por dos periodos consecutivos de 45 días, donde a la dieta básica se le agregó o no, un complemento dietario conteniendo antioxidantes (30 mg de Resveratrol y 20 UI Acetato de  $\alpha$ -tocoferol). De los resultados de los análisis estadísticos, se ha mostrado que el complemento alimenticio con antioxidantes (Resveratrol y Acetato de  $\alpha$ -tocoferol) puede modular positivamente la FAS. Después de 45 días de suplementación, hubo una reducción estadísticamente significativa de las concentraciones de FAS. Estos indicadores volvieron a sus valores basales después de 45 días alimentando a los perros con la dieta base sin suplementos (control). Además, en este caso, el incremento fue estadísticamente significativo, mientras que no se observó diferencia entre el valor basal y los resultados al día 90 (Ver Tabla 2).

Los cambios en los valores de fosfatasa alcalina fueron diferentes entre machos y hembras: los valores basales de la fosfatasa alcalina fueron superiores en hembras, donde la intervención nutricional influyó significativamente en la tasa de la remodelación ósea al D45. Los machos mostraron una disminución en la concentración de fosfatasa alcalina en el mismo tiempo, pero no se alcanzó la significancia estadística. Después del retiro de suplementación, un significado incremento en la tasa de la remodelación ósea fue observada en D90 en ambos subgrupos (Fig. 4 y Fig. 5). Todos los perros eran castrados y libres de enfermedad hepática, por lo tanto la reducción observada en la Fosfatasa Alcalina Total valuada en D45, debe ser debido a la disminución de la velocidad de remodelación ósea como resultado de la actividad antioxidante de la suplementación nutricional con Resveratrol y Acetato de  $\alpha$ -Tocoferol. Esta hipótesis fue confirmada por el hecho de que los valores medidos en D90, después de 45 días de dieta sin suplementación (control), retornó a los datos basales. También, en este caso, el aumento fue estadísticamente significativo, mientras que ninguna diferencia fue observada entre los resultados basales y los datos del día 90 (Tabla 2). A pesar de la no significancia estadística, la reducción del 13% de 8-Hidroxi-deoxi-guanosina [8(OH)dG] fue también observada entre el día 0 y 45 (3226.7 + 1966 vs 2856.1 + 1380.6 pg/mL,



**Fig. 3.** 8(OH)dG sérica en diferentes tiempos y tratamientos. Los animales fueron observados en dos periodos consecutivos de 45 días, donde a la dieta básica se le adicionó o no, un complemento conteniendo antioxidantes (30 mg de Resveratrol y 20 UI de Acetato de  $\alpha$ -tocoferol). Aunque no haya habido significancia estadística, el 13% de reducción que pudo verse en la media de 8-hidroxi-deoxi-guanosina (8(OH) dG), fue también observada entre los días 0 y 45 (ver Tabla 2). La alta variabilidad (desvío estándar) de los datos fue probablemente la responsable de este resultado. Además, cambios positivos en la oxidación de ADN probablemente necesiten periodos más prolongados de tratamiento que también son modulados por la dieta basal utilizada.

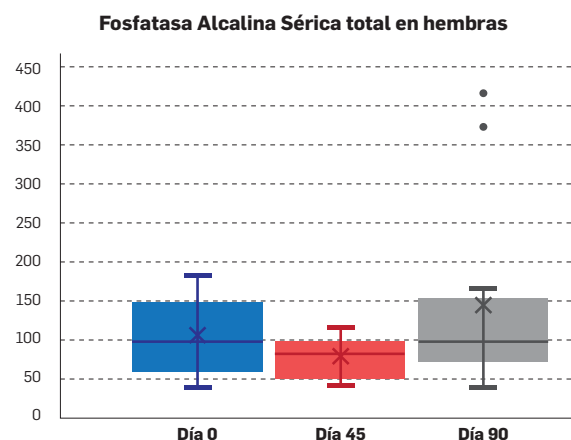


**Fig. 4.** Fosfatasa Alcalina en machos en diferentes tiempos y tratamientos. D0 vs D45 NS: D45 vs D90<0.05: D0 vs D90<0.05. Fosfatasa Alcalina Sérica en machos. Después de 45 días de suplementación, las concentraciones séricas de la Fosfatasa Alcalina Total decrecieron pero no alcanzó significancia estadística. Estos valores retornaron al inicio después de 45 días adicionales de la dieta basal sin suplementación (control). En este caso, el incremento en valores desde D45 a D90 sí fue estadísticamente significativo, mientras que no se observaron diferencias entre los valores basales y los datos del día 45 (ver Tabla 2).

$p=0.4273$ ), la alta variabilidad (desvío estándar) de información probablemente fue responsable por este resultado (Fig. 3). Además, los procesos oxidativos en el ADN probablemente necesiten periodos más largos de tratamiento.

Urquiaga I. y col [26] mostró que el consumo moderado de vino (conteniendo resveratrol), tanto en dietas occidentales como Mediterráneas, incrementan la capacidad antioxidante del plasma, decrece el daño oxidativo del ADN, y normaliza la función endotelial. Los resultados fueron más significativos aún en el grupo que consumen dietas occidentales. La mejora de la alimentación y el cuidado veterinario han permitido una extensión considerable de la esperanza de vida de mascotas en general y en perros y gatos en particular. Por lo tanto, los perros muestran más frecuentemente una decreciente capacidad de reaccionar frente al stress, y más aún, desbalances homeostáticos y un aumento de riesgos de enfermedades. Existen muchas evidencias científicas que la nutrición influencia el epigenoma. Esta relación dinámica entre nutrición y genes a lo largo de la vida de un organismo ha sido reconocida como un subcampo llamado Epigenómica Nutricional o Nutrigenómica. Esto provee información prometedora para mejorar la salud y prevención de enfermedades [27, 28, 29].

Numerosas evidencias muestran la caída del stress oxidativo y sarcopenia por suplementación con Resveratrol, gracias al incremento de la biogénesis mitocondrial, un mejorado control



**Fig. 5.** Fosfatasa Alcalina en hembras en diferentes tiempos y tratamientos D0 vs D45 NS: D45 vs D90<0.05: D0 vs D90<0.05. Fosfatasa Alcalina Sérica en hembras. Después de 45 días de suplementación, hubo una reducción estadísticamente significativa de las concentraciones de Fosfatasa Alcalina Sérica. Estos valores retornaron a su nivel basal luego de 45 días de dieta de base sin suplementación (control). También, en este caso el incremento fue estadísticamente significativo, mientras que ninguna diferencia fue observada entre los datos basales y los del día 90 (ver Tabla 2).

de la calidad de fusión/fisión mitocondrial, un incremento de la síntesis de enzimas antioxidantes vía SIRT1, y los efectos similares a la restricción calórica [30, 31, 32, 33]. Varios estudios han mostrado que el efecto antioxidante del Acetato de  $\alpha$ -tocoferol está directamente correlacionado a la disminución del stress oxidativo intracelular y mejora de la fuerza y masa muscular [34]. Esta investigación en perros fue realizado en una biología que envejece aproximadamente 7 veces más rápido que el humano [35] y soporta la hipótesis de que la sarcopenia y el aumento de la velocidad de la remodelación ósea, la cual frecuentemente afecta perros adultos gerontes, que puede al menos, prevenirse parcialmente por la suplementación con antioxidantes. El presente estudio, creemos que abre interesantes interrogantes para futuras investigaciones en el campo del envejecimiento humano y animal que requeriría mayor tiempo de intervención con Resveratrol solo o con combinaciones con otros polifenoles. En efecto, la suplementación con Resveratrol y Acetato de  $\alpha$ -tocoferol causó la reducción de las concentraciones séricas de CPK y FA, que pueden estar asociadas con las patologías antes mencionadas, en perros adultos. La correlación entre suplementación y efecto fue confirmada por el segundo periodo del tratamiento, en el cual los valores de los dos biomarcadores regresaron a sus niveles basales.

En conclusión, la presente investigación ha mostrado que la suplementación de la dieta con una fórmula conteniendo Resveratrol y Acetato de  $\alpha$ -tocoferol puede modular biomarcadores séricos, como la CPK y FA, que están asociadas con sarcopenia e incremento de la remodelación ósea. Desde estas condiciones de envejecimiento acelerado y el crecimiento de la población de perros debido a su mayor expectativa de vida, el uso de suplementación antioxidante puede ser útil en la mejora de la calidad de vida de las mascotas.

## RECONOCIMIENTOS

Quisiéramos agradecer a Microsules Argentina S.A. por la contribución de JUVENIA® DOGS complemento dietario, y por permitir llevar adelante este estudio.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sandra H. van Oostrom, Ronald Gijzen, Irina Stirbu, Joke C Koveraar, Francois G. Schellevis, H. Susan J Picavet1, Nancy Hoeymans. Time trends in prevalence of chronic diseases and multimorbidity not only due to aging: data from general practices and health surveys. *PLoS One*. 2016;11:e0160264.
2. Moylan, J.S. and Reid M.B. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve* 2007;35:411-29.
3. Lien Ai Pham-Huy, Hua He, Chuong Pham-Huy. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4:89-96.
4. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:715-48.
5. Lobo V.A., Patil, A., Phatak, N., Chandra 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4:118-26.
6. Birben E., Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum, Omer Kalayci. Oxidative stress and antioxidant defence. *World Allergy Organ J*. 2012;5:9-19.
7. Clifford J and Rosen MD (Editors). Prime on the metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Washington D.C.: The American Society for Bone and Mineral Research; 2013.
8. Almeida M., Li Han, Marta Martin-Millan, Lilian I. Plotkin, Scott A. Stewart, Paula K. Roberson, Stavroula Kousteni, Charles A. O'Brien, Teresita Bellido, A. Michael Parfitt, Robert S. Weinstein, Robert L. Jilka, and Stavros C. Manolagas. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem*. 2007;282:27285-97.
9. Mederle OA., Melania Balas, Sorin Dumitru Ioanoviciu, Camelia-Vidita Gurba, Anca Tudor, Claudia Borza. Correlations between bone turnover markers, serum magnesium and bone mass density in postmenopausal osteoporosis. *Clinical Interventions in Aging*. 2018;13:1383-9.
10. Calvani R, Federico Marini, Matteo Cesari, Matteo Tosato, Stefan D. Anker, Stephan von Haehling, Ram R. Miller, Roberto Bernabei, Francesco Landi, Emanuele Marzetti & the SPRINTT consorti. Biomarkers for physical frailty and sarcopenia: state of the science and future developments. *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle*. 2015;6: 278-86.
11. Freeman LM. Cachexia and sarcopenia: emerging syndromes of importance in dogs and cats. *J Vet Intern Med*. 2012;26: 3-17.
12. Vlasakova, K., Pamela Lane, Laura Michna, Nagaraja Muniappa, Frank D. Sistare, and Warren E. Glaab. Response of novel skeletal muscle biomarkers in dogs to drug induced skeletal muscle injury or sustained endurance exercise. *Toxicological Sciences*. 2017;156:422-7.
13. Tvarijonavičiute A., Tomas Barranco, Monica Rubio, Jose Maria Carrillo, Silvia Martinez-Subiela, Fernando Tecles, Juana Dolores Carrillo, José J. Cerón. Measurement of creatine kinase and aspartate amino transferase in saliva of dogs: a pilot study. *BMC Veterinary Research*. 2017;13:168.
14. Cruz-Jentoft AJ., Güllistan Bahat, Jürgen Bauer, Yves Boirie, Olivier Bruyère, Tommy Cederholm, Cyrus Cooper, Francesco Landi, Yves Rolland, Avan Aihie Sayer, Stéphane M. Schneider, Cornel C. Sieber, Eva Topinkova, Maurits Vandewoude, Marjolein Visser, Mauro Zamboni, Writing Group For The European Working Group on Sarcopenia In Older People (EWGSOP2), And The Extendend Group For EWGSOP. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing*. 2019;48:16-31.
15. Sehl ME, and F. Eugene Yates. Kinetics of human aging: I. Rates of senescence between ages 30 and 70 years in healthy people. *The Journals of Gerontology A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2001;56:B198-B208.
16. Meng S.J., and Long-Jiang Yu. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci*. 2010;11: 1509-26.
17. Brioché T, Lemoine-Morel S. Oxidative stress, sarcopenia, antioxidant strategies and exercise: Molecular aspects. *Current Pharmaceutical Design*. 2016;22:2664-78.
18. Alway Stephen E, Matthew J. Myers, Junaith S. Mohamed. Regulation of satellite cell function in sarcopenia. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2014; Volume 6: Article 246.
19. Romagnoli Elisabetta, Giovanni Minisola, Vincenzo Carnevale, Alfredo Scillitani, Vincenzo Frusciante, Giuseppe Aliberti, Salvatore Minisola. Assessment of Serum Total and Bone Alkaline Phosphatase Measurement in Clinical Practice *Clin Chem Lab Med*. 1998;36:163-8.
20. Wu Lily L., Chiu-Chian Chiou, Pi-Yueh Chang, James T. Wu. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*. 2004;339:1-9.
21. Wu Danni, Baodong Liu, Junfa Yin, Tian Xu, Shuli Zhao, Qun Xu, Xi Chen, Hailin Wang. Detection of 8-Hydroxy deoxy-guanosine [8(OH)dG] as a biomarker of oxidative damage in peripheral leukocyte DNA by UHPLC-MS/MS. *J Chromatography B*. 2017;1064:1-6.
22. Gülçin İlhami. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Engineering Technologies*. 2010;11:210-8.
23. Romero Barco Carmen M., Sara Manrique Arija, Manuel Rodriguez Perez. Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. *Reumatol Clin*. 2012; 8:149-52.
24. Delmas PD. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2000;11(Suppl 6):2-17.
25. Singer FR, Eyre DR. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleve Clin J Med*. 2008; 75:739-50.
26. Urquiaga Inés, Pablo Strobel, Druso Perez, Carlos Martinez, Ada Cuevas, Oscar Castillo, Guillermo Marshall, Jaime Rozowski, Federico Leighton. Mediterranean diet and red wine protect against oxidative damage in young volunteers. *Atherosclerosis*. 2010;211:694-9.
27. Fang Mingzhu, Dapeng Chen, and Chung S. Yang. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr*. 2007;137:223S-228S.
28. Reik Wolf. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007;447: 425-432.
29. Zhang Naifeng. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. *Animal Nutrition*. 2015;1(3):144-51.
30. Price Nathan L, Ana P. Gomes, Alvin J.Y. Ling, Filipe V. Duarte, Alejandro Martin-Montalvo, Brian J. North, Beamon Agarwal, Lan Ye, Giorgio Ramadori, Joao S. Teodoro, Basil P. Hubbard, Ana T. Varela, James G. Davis, Behzad Varamini, Angela Hafner, Ruin Moaddel, Anabela P. Rolo, Roberto Coppari, Carlos M. Palmeira, Rafael de Cabo, Joseph A. Baur, and David A. Sinclair. SIRT1 is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. *Cell Metabolism*. 2012;15: 675-90.
31. Lagouche Marie, Carmen Argmann, Zachary Gerhart-Hines, Hamid Meziane, Carles Lerin, Frederic Daussin, Nadia Messadeq, Jill Milne, Philip Lambert, Peter Elliott, Bernard Geny, Markku Laakso, Pere Puigserver, and Johan Auwerx. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1. *Cell*. 2006;127:1109-22.
32. Hu Yi, Jing Liu, Junfeng Wang, Qingsong Liu. The controversial links among calorie restriction, SIRT1, and resveratrol. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011;51:250-6.
33. Kuršvietienė Lolita, Inga Stanevičienė, Aušra Mongirdienė, Jurga Bernatoniė. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina*. 2016;52:148-55.
34. Khor Shy Cian, Norwahidah Abdul Karim, Wan Zurinah Wan Ngah, Yasmin Anum Mohd Yusof, Suzana Makpol. Vitamin E in Sarcopenia: Current Evidences on Its Role in Prevention and Treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2014, Article ID 914853, 16 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/914853>.
35. Matt Kaerberlein, Kate E. Creevy, Daniel E.L. Promislow. The Dog Aging Project: Translational Geroscience in Companion Animals. *Mamm Genome*. 2016;27(7-8): 279-88.