



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL

2020

ESTRATEGIAS NEUROPROTECTORAS FRENTE AL
DETERIORO COGNITIVO ASOCIADO A LA EDAD.
ESTUDIO COMPORTAMENTAL Y NEUROQUÍMICO EN
RATA

Margarita Rosa Ramis Escudero



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2020

Programa de Doctorado en Neurociencias

ESTRATEGIAS NEUROPROTECTORAS FRENTE AL
DETERIORO COGNITIVO ASOCIADO A LA EDAD.
ESTUDIO COMPORTAMENTAL Y NEUROQUÍMICO EN
RATA

Margarita Rosa Ramis Escudero

Directora: Dra. Susana Cristina Esteban Valdés

Director: Dr. Antoni Miralles Socias

Tutor: Dr. Antoni Miralles Socias

Doctora por la Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears

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

DECLARAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Estrategias neuroprotectoras frente al deterioro cognitivo asociado a la edad. Estudio comportamental y neuroquímico en rata*, presentada por Margarita Rosa Ramis Escudero para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo nuestra supervisión y que cumple con los requisitos necesarios para optar al título de Doctor Internacional.

Y para que quede constancia de ello firman este documento.

Dra. Susana Esteban

Dr. Antoni Miralles

Doctoranda: Margarita R Ramis Escudero

Palma de Mallorca, 19/04/2021

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda económica del Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (referencia: AP2010-4798). El trabajo de investigación fue financiado por el Programa Pont La Caixa-UIB (7/2014) y por el Govern Balear (AAEE 18/2014).

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis ha sido un largo camino, del que por fin ha llegado el momento de poner punto y final a esta etapa muy importante de mi vida y de mi formación. Hay muchas personas a las que me gustaría agradecerles su apoyo y ayuda, de forma directa o indirecta, ya que sin ellas no habría podido llegar a este momento.

En primer lugar, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis, la Dra. Susana Esteban y el Dr. Antoni Miralles, por iniciarme en el mundo de la investigación y haberme acompañado hasta este momento. Gracias por permitirme formar parte de vuestro grupo de investigación y darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, fomentando mi interés por la ciencia y mi formación en el mundo de la investigación. Gracias también por estar siempre ahí, ofreciéndome vuestro apoyo en todo lo que fuera necesario, así como vuestra dedicación y proximidad, guiándome a lo largo de todo el camino.

También me gustaría agradecer al Dr. Jesús García Sevilla y a la Dra. Julia García, por su inestimable colaboración con los experimentos de electrotransferencia, así como a todo al grupo de Neurofarmacología de la UIB. Gracias a María, Benjamin, Rubén, Gloria y Toni por ayudarme siempre en mis innumerables preguntas sobre el mundo *western blot*.

Durante el desarrollo de esta tesis tuve la oportunidad de realizar una estancia en el laboratorio del Dr. Russel Reiter en UTHSC (Texas), al que quisiera agradecer su incondicional ayuda, así como a todo su grupo de investigación, especialmente al Dr. Tan. Gracias por haberme acogido con los brazos abiertos durante mi estancia y permitirme formar parte de la *Pineal Mafia*.

Todavía recuerdo la primera vez que entré en el laboratorio de Fisiología Animal en segundo de carrera, permitiéndome conocer a grandes profesionales y mejores personas. Gracias a todos los profesores por estar siempre ahí y sacarme una sonrisa: Dr. Rubén Rial, Dra. Cristina Nicolau, Dr. Toni Gamundí y Dr. Mourad Akaarir. También a todos los colaboradores (que a lo largo de todos estos años han sido muchos) y compañeros de laboratorio por su apoyo y ayuda, compartiendo muchas horas tanto dentro como fuera del laboratorio; sin todos vosotros este camino no hubiera sido posible. En particular, gracias al Dr. Joanllo, Dra. Bea y la futura Dra. Lidia, quienes siempre están sin importar el tiempo que pase. También quisiera agradecer a la Dra. Fiorella, compañera de experimentos, así como a Pere, Jessy, Diana, Dra. Isis, Cristina y Dani. De forma muy especial quiero agradecer a la Dra. M^a Antonia Fiol por su imprescindible apoyo y consejos durante todo el camino, por todos los momentos vividos, compartiendo risas y lágrimas, incluso en la otra punta del mundo. Nunca olvidaré el día que supimos que las dos teníamos la beca para realizar el doctorado, *perquè sempre serem invencibles*. También me

gustaría agradecer al Dr. David Moranta por toda su ayuda y disposición en el desarrollo de esta investigación, especialmente con el HPLC, así como a la Dra. Silvia Tejada. Asimismo, me gustaría dar las gracias al Dr. Manuel Torres del grupo de Biomedicina Molecular y Celular por sus consejos. Gracias también a Charo por todo su apoyo, así como a todo el personal del edificio Guillem Colom y del Estabulario de la UIB. De igual forma, un millón de gracias a la Dra. Sara Aparicio por permitirme entrar en el mundo de la docencia en las prácticas de Fisiología Animal y por estar siempre ahí, animándome a seguir adelante. Quién nos iba a decir cuando nos conocimos que años después formaría parte de Álvarez; gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo fuera del mundo UIB. Quisiera también dar las gracias a todos los compañeros de Álvarez por todo su apoyo; en particular a Antonia Ramis y a Xisca Chercoles, que siempre están a mi lado. Aga, mil gracias por ayudarme con la portada.

Finalmente, me gustaría agradecer a mi familia por todo el apoyo que me han dado durante el desarrollo de esta tesis. Papá y mamá, gracias por dejarme cumplir todas mis metas, aun sin ni siquiera entender muy bien que me depararía el camino escogido. Me habéis permitido volar sabiendo que siempre estaríais ahí. Gracias también a mis amigos, por vuestros consejos y por no cansaros nunca de oírme hablar de la tesis, animándome a seguir adelante, y por vuestra paciencia. *Expelliarmus*, *Noltrustragus*, *4 ulls volant*, *Sargantanes*, *Jovenetes* y *Bio Tim* son mucho más que simples nombres de grupos; gracias por compartir miles de momentos, tanto en nuestra *roqueta* como recorriendo mundo. Bel G, Bel B, Joana, Neus V, Marga R, Maria y Pere Joan mil gracias por todo.

A todos, simplemente gracias

Cuando crees que sabes todas las
respuestas, llega el universo y te cambia
las preguntas

Albert Espinosa

Portem a dins, encara, els somnis
d'aquells nens que buscaven els pirates
pels estels

Txarango

Als meus pares

PRINCIPALES ABREVIATURAS

- 5-HIAA, ácido 5-hidroxi-indolacético
- 5-HT, 5-hidroxitriptamina, serotonina
- 5-HTP, 5-hidroxitriptófano
- AADC, enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
- ADN, ácido dextrorribonucleico
- AMPA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- ANOVA, análisis de la varianza
- ATP, adenosina trifosfato
- BCA, ácido bicinconínico (del inglés *bicinchoninic acid*)
- BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés *brain derived neurotrophic factor*)
- BSA, albúmina sérica bovina (del inglés *bovine serum albumin*)
- CAT, catequina
- DA, dopamina
- DOI, densidad óptica integrada
- DOPA, 3,4-dihidroxifenilalanina
- DOPAC, ácido hidroxifenilacético
- EA, enriquecimiento ambiental
- ECL, electroquimioluminiscencia amplificada (del inglés *enhanced chemiluminescence*)
- EDTA, ácido etilenediamino tetraacético
- EGCC, galato de epigalocatequina
- Ejerc, ejercicio
- Ejerc + Cat, ejercicio + catequina
- ES, estrés crónico moderado impredecible
- HPLC, cromatografía líquida de alta resolución (del inglés *high pressure liquid chromatography*)
- HRP, peroxidasa de rábano (del inglés *horseradish peroxidase*)
- HVA, ácido homovanílico
- i.p., intraperitoneal
- MDA, malondialdehído
- mtADN, ADN mitocondrial
- NA, noradrenalina
- NF- κ B, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
- NSD-1015, hydroxybenzyl hydrazine, inhibidor de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
- PGC-1 α , coactivador transcripcional 1 alfa (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1-alpha*)

POL 60, *poliphenon 60*

RbAp48/46, proteína de unión a histonas (del inglés *retinoblastoma-binding protein*)

RC, restricción calórica

RES, reveratrol

ROS, especies reactivas de oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

SDS, dodecil sulfato sódico (del inglés *sodium dodecyl sulphate*)

SIRT1, sirtuína 1

SNC, sistema nervioso central

TBS, tampón Tris-salino (del inglés *Tris buffer saline*)

TH, tirosina hidroxilasa

TPH, triptófano hidroxilasa

Toc 20, tratamiento con α -tocoferol a una dosis de 20 mg/kg/día durante 28 días.

Toc 40-60, tratamiento con α -tocoferol a una dosis de 40 mg/kg/día durante 28 días seguido de otra dosis de 60 mg/kg/día durante otros 28 días.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Introducción

Figura 1. Proyección estadística de la población mayor de 65 años.....	8
Figura 2. Pirámides de población de España: ayer, hoy, mañana.....	8
Figura 3. Doble papel de los niveles de especies de oxígeno reactivo (ROS).....	11
Figura 4. Efectos del envejecimiento sobre varias habilidades cognitivas.....	13
Figura 5. Esquema de la síntesis de las catecolaminas y la síntesis de la serotonina.....	17
Figura 6. Estructura química del compuesto α -tocoferol.....	26
Figura 7. Estructura química del compuesto <i>trans</i> -resveratrol.....	30
Figura 8. Estructuras químicas de los principales flavanoles.....	32

Materiales y métodos

Figura 9. Grupos de animales adultos utilizados en el tratamiento de resveratrol y restricción calórica. ..	55
Figura 10. Grupos de animales viejos utilizados en los tratamientos con α -tocoferol.....	56
Figura 11. Grupos de animales viejos utilizados en los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i>	56
Figura 12. Grupos de animales viejos utilizados en el ejercicio físico moderado.....	57
Figura 13. Objetos utilizados en los programas de enriquecimiento ambiental.....	58
Figura 14. Objetos utilizados en los programas de estrés crónico moderado impredecible.....	59
Figura 15. Grupos de animales utilizados en los programas de enriquecimiento ambiental, dieta y estrés crónico a largo plazo.....	61
Figura 16. Ejemplo de los diferentes alimentos utilizados para la aplicación de la dieta rica en antioxidantes.....	62
Figura 17. Grupos de animales utilizados en los programas de enriquecimiento ambiental y estrés iniciado a edades intermedias.....	63
Figura 18. Diseño experimental de la realización de las pruebas comportamentales.....	65
Figura 19. Dispositivo del laberinto radial, junto con sus medidas, utilizado para analizar la memoria de trabajo espacial en roedores.....	66
Figura 20. Dispositivo del laberinto de <i>Barnes</i> utilizado para analizar el aprendizaje visoespacial, junto con sus medidas y detalle de la caja de escape.....	67
Figura 21. Dispositivo del campo abierto, junto con sus medidas, utilizado para la realización del test de reconocimiento de objeto nuevo.....	69
Figura 22. Ejemplo de las tres fases de las que consta el test de reconocimiento de objeto nuevo utilizado para analizar la memoria episódica.....	69
Figura 23. Dispositivo del <i>rotarod</i> , junto con sus medidas, utilizado para analizar la coordinación motora.....	71
Figura 24. Esquema de las diferentes regiones cerebrales recogidas durante la disección del cerebro.....	72
Figura 25. Esquema de la inhibición de la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos mediante el fármaco NSD-1015.....	73

Figura 26. Esquema de los diferentes componentes del equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	75
Figura 27. Análisis cromatográfico representativo de uno de los estándar utilizados para la cuantificación de los picos obtenidos para cada uno de los componentes de estudio	76
Figura 28. Fotografía del material utilizado para la realización del <i>western blot</i>	77
Figura 29. Esquema de un dispositivo para SDS-PAGE	80
Figura 30. Esquema representativo de los elementos de la electrotransferencia	80
Figura 31. Sistema de detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL.	83
Figura 32. Reacción de oxidación del luminol por acción del peróxido de hidrógeno y catalizado por la peroxidasa de rábano.....	84
Figura 33. Inmunoblots representativos de β -actina y SIRT1.	85
Figura 34. Representación gráfica de la densidad óptica integrada obtenida frente a la cantidad de proteína cargada en el gel para cada una de las proteínas de estudio.	86
Figura 35. Efecto del fármaco NSD-1015 en cada una de las proteínas de estudio	87

Resultados

Figura 36. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial.	93
Figura 37. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i>	94
Figura 38. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.....	95
Figura 39. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la coordinación motora analizada mediante el test del <i>rotarod</i>	96
Figura 40. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo	97
Figura 41. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la actividad de la enzima TH en el estriado	98
Figura 42. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo	99
Figura 43. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado	99
Figura 44. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal	100
Figura 45. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la expresión de la proteína SIRT1 en hipocampo	101
Figura 46. Efecto del envejecimiento en ratas sobre la expresión de la proteína NF- κ B total en hipocampo.....	101
Figura 47. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 en hipocampo	102

Figura 48. Efecto del tratamiento agudo con los antioxidantes <i>trans</i> -resveratrol, α -tocoferol, catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial en animales adultos.	103
Figura 49. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol en el peso corporal de animales adultos	104
Figura 50. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la temperatura corporal (°C) de animales adultos.....	105
Figura 51. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial en animales adultos	106
Figura 52. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en ratas adultas.....	106
Figura 53. Efecto de la restricción y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en ratas adultas.....	107
Figura 54. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la coordinación motora mediante el test del <i>rotarod</i> en animales adultos.....	108
Figura 55. Efecto de la restricción y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas adultas.....	108
Figura 56. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas adultas	109
Figura 57. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas adultas.....	110
Figura 58. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas adultas.....	110
Figura 59. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas adultas.....	111
Figura 60. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la expresión de la proteína SIRT1 en hipocampo de ratas adultas	111
Figura 61. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la expresión de la proteína NF- κ B total en hipocampo de ratas adultas.....	112
Figura 62. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante <i>trans</i> -resveratrol sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 en hipocampo de ratas adultas	112
Figura 63. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial en ratas viejas.....	114
Figura 64. Efecto del tratamiento con α -tocoferol Toc 40-60 sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> en ratas viejas	115
Figura 65. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en animales viejos	116
Figura 66. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la coordinación motora mediante el test del <i>rotarod</i> en animales viejos	117
Figura 67. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre el contenido del antioxidante α -tocoferol en corteza cerebral de ratas viejas	118

Figura 68. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre el contenido del marcador de peroxidación lipídica malondialdehído en corteza cerebral de ratas viejas.....	118
Figura 69. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas	119
Figura 70 Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas	119
Figura 71. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas.....	120
Figura 72. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas	120
Figura 73. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas	121
Figura 74. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la expresión de la proteína SIRT1 en hipocampo de ratas viejas.....	122
Figura 75. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la expresión de la proteína NF- κ B total en hipocampo de ratas viejas.....	122
Figura 76. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 en hipocampo de ratas viejas.....	123
Figura 77. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial en ratas viejas.	124
Figura 78. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> en ratas viejas	125
Figura 79. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en ratas viejas	126
Figura 80. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la coordinación motora mediante el test del <i>rotarod</i> en ratas viejas	127
Figura 81. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas	127
Figura 82. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas.	128
Figura 83. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas	129
Figura 84. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas	129
Figura 85. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas	130
Figura 86. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la expresión de la proteína SIRT1 en hipocampo de ratas viejas	130
Figura 87. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la expresión de la proteína NF- κ B total en hipocampo de ratas viejas	131
Figura 88. Efecto de los tratamientos con catequina y <i>poliphenon 60</i> sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 en hipocampo de ratas viejas	131

Figura 89. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial en ratas viejas	132
Figura 90. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> en ratas viejas.....	133
Figura 91. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en ratas viejas	134
Figura 92. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la coordinación motora mediante el test del <i>rotarod</i> en ratas viejas.....	135
Figura 93. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas.....	136
Figura 94. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas.....	137
Figura 95. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas	138
Figura 96. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas	138
Figura 97. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas	139
Figura 98. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la expresión de la proteína SIRT1 en hipocampo de ratas viejas.....	139
Figura 99. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la expresión de la proteína total en hipocampo de ratas viejas	140
Figura 100. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 en hipocampo de ratas viejas.....	140
Figura 101. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre el peso de los animales.	141
Figura 102. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial.	142
Figura 103. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> a los 6 meses de edad	143
Figura 104. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> a los 12 meses de edad.	144
Figura 105. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> a los 19 meses de edad.	145
Figura 106. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.....	146
Figura 107. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.....	147
Figura 108. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la coordinación motora mediante el test del <i>rotarod</i>	147

Figura 109. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas.....	148
Figura 110. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas.....	149
Figura 111. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas.....	150
Figura 112. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas.....	150
Figura 113. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas.....	150
Figura 114. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo de ratas viejas.....	151
Figura 115. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína NF- κ B total en hipocampo de ratas viejas.....	151
Figura 116. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 en hipocampo de ratas viejas.....	152
Figura 117. Efecto del enriquecimiento ambiental aplicado a edades adultas sobre el peso corporal.....	152
Figura 118. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial.....	153
Figura 119. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> a los 12 meses de edad.....	154
Figura 120. Efecto del enriquecimiento ambiental desde los 7 meses de edad sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> a los 19 meses de edad.....	155
Figura 121. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.....	156
Figura 122. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.....	157
Figura 123. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad frente a los animales del grupo control sobre la coordinación motora mediante el test del <i>rotarod</i>	157
Figura 124. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas.....	158
Figura 125. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas.....	159
Figura 126. Efecto del enriquecimiento ambiental desde los 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas.....	160
Figura 127. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas.....	160
Figura 128. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas.....	160
Figura 129. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la expresión de la proteína SIRT1 en hipocampo de ratas viejas.....	161

Figura 130. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la expresión de la proteína NF- κ B total en hipocampo de ratas viejas.....	161
Figura 131. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 en hipocampo de ratas viejas.	162
Figura 132. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial.....	163
Figura 133. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i>	163
Figura 134. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.	164
Figura 135. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la coordinación motora mediante el test del <i>rotarod</i>	164
Figura 136. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo.....	165
Figura 137. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la actividad de la enzima TH en el estriado.....	166
Figura 138. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo.....	166
Figura 139. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado.....	167
Figura 140 Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal.....	167
Figura 141. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la expresión de la proteína SIRT1 en hipocampo.....	168
Figura 142. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la expresión de la proteína NF- κ B total en hipocampo de ratas viejas.....	168
Figura 143. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre el peso corporal.	169
Figura 144. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo en ratas sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial.....	170
Figura 145. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo en ratas sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i>	171
Figura 146. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.....	172
Figura 147. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.....	173
Figura 148. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la coordinación motora mediante el test del <i>rotarod</i>	174

Figura 149. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo.	175
Figura 150. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el estriado	176
Figura 151. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo	177
Figura 152. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado	177
Figura 153. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal	178
Figura 154. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína SIRT1 en hipocampo	179
Figura 155. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína NF- κ B total en hipocampo de ratas viejas.....	179
Figura 156. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 en hipocampo de ratas viejas.....	180
Figura 157. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre el peso de los animales.....	181
Figura 158. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial	182
Figura 159. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> a los 6 meses de edad.....	183
Figura 160. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> a los 12 meses de edad.....	184
Figura 161. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> a los 19 meses de edad.....	184
Figura 162. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.....	185
Figura 163. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.....	186
Figura 164. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la coordinación motora mediante el test del <i>rotarod</i>	187
Figura 165. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas	188
Figura 166. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas	188

Figura 167. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas.....	189
Figura 168. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas.	189
Figura 169. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas.	190
Figura 170. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la expresión de la proteína SIRT1 en hipocampo de ratas viejas.....	190
Figura 171. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la expresión de la proteína NF-κB total en hipocampo de ratas viejas.....	191
Figura 172. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 en hipocampo de ratas viejas.....	191
Figura 173. Efecto del estrés moderado aplicado a edades adultas sobre el peso corporal	192
Figura 174. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad de los animales sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial	193
Figura 175. Efecto del estrés moderado desde los 7 meses de edad sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> a los 12 meses de edad	194
Figura 176. Efecto del estrés moderado a medio plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de <i>Barnes</i> a los 19 meses de edad.....	195
Figura 177. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad de los animales sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo	196
Figura 178. Efecto del estrés moderado desde los 7 meses de edad sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo.....	197
Figura 179. Efecto del estrés moderado desde los 7 meses de edad sobre la coordinación motora mediante el test del <i>rotarod</i>	197
Figura 180. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas.....	198
Figura 181. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas.....	199
Figura 182. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas.....	200
Figura 183. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas.....	200
Figura 184. Efecto del estrés moderado desde los 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas	200
Figura 185. Efecto del estrés moderado desde los 7 meses de edad sobre la expresión de la proteína SIRT1 en hipocampo de ratas viejas	201
Figura 186. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad de los animales sobre la expresión de la proteína NF-κB total en hipocampo de ratas viejas.....	201
Figura 187. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 en hipocampo de ratas viejas	202

Tabla 1. Comparación de los principales resultados obtenidos en cada una de las estrategias aplicadas frente al deterioro cognitivo asociado a la edad en ratas, incluyendo parámetros comportamentales y neuroquímicos.	204
---	-----

Anexo A

Tabla A1. Cronograma de los objetos proporcionados a los animales (desde 1 hasta 20 meses de edad) en el programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo, así como los factores estresantes aplicados a los animales en el programa de estrés crónico moderado impredecible a largo plazo	245
---	-----

Tabla A2. Cronograma de los objetos proporcionados a los animales (desde 7 hasta 20 meses de edad) en el programa de enriquecimiento ambiental intermedio, así como los factores estresantes aplicados a los animales en el programa de estrés crónico moderado impredecible.....	248
---	-----

Tabla A3. Cronograma de los objetos proporcionados a los animales (desde 18.5 hasta 20 meses de edad) en el programa de enriquecimiento ambiental en animales viejos.....	252
---	-----

Tabla A4. Cronograma de los alimentos, así como su cantidad, proporcionados a los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (a partir de los 14 meses de edad de los animales), tanto en el grupo Dieta como en el grupo Dieta + EA.	252
--	-----

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Envejecimiento	7
1.1.1 Dinámica poblacional	7
1.1.2 Proceso de envejecimiento.....	8
1.1.3 Teoría del envejecimiento por estrés oxidativo	9
1.1.4 Consecuencias del envejecimiento a nivel cerebral	12
1.1.4.1 Declive cognitivo y motor asociado al envejecimiento	13
1.1.4.2 Cambios estructurales y neurofisiológicos en el cerebro envejecido	15
1.1.4.2.1 Alteraciones del sistema de neurotransmisión monoaminérgica.....	16
1.1.4.2.2 Relación de sirtuínas, NF-kB y RbAp48 con el envejecimiento y el declive cognitivo	19
1.2 Estrategias para la prevención del envejecimiento cerebral.....	24
1.2.1 Prevención del envejecimiento cerebral mediante el uso de antioxidantes.....	25
1.2.1.1 Beneficios de la Vitamina E sobre el envejecimiento cerebral.....	26
1.2.1.2 Relevancia de los polifenoles en la prevención del envejecimiento cerebral	28
1.2.2 Prevención del envejecimiento cerebral mediante ejercicio físico	34
1.2.3 Prevención del envejecimiento cerebral mediante enriquecimiento ambiental	37
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.1 MATERIALES	47
3.1.1 Animales de experimentación.....	47
3.1.2 Fármacos y tratamientos	48
3.1.3 Anticuerpos.....	49
3.1.4 Reactivos	50
3.1.5 Material de laboratorio.....	51
3.2 MÉTODOS	53
3.2.1 Tratamientos	53
3.2.1.1 Tratamientos con antioxidantes	53
A) Uso de la restricción calórica y tratamientos con el fármaco antioxidante resveratrol en animales adultos.....	54
B) Tratamientos con el fármaco antioxidante α -tocoferol en animales viejos	55
C) Tratamientos con los fármacos antioxidantes catequina y poliphenon 60 en animales viejos	56
3.2.1.2 Tratamientos con ejercicio físico moderado y la acción combinada con el antioxidante catequina	56
3.2.1.3 Tratamientos con programas de enriquecimiento ambiental y estrés	58
A) Programas de enriquecimiento ambiental y estrés crónico en ratas a partir de 1 mes de edad, junto al efecto combinado del enriquecimiento ambiental y la dieta rica en antioxidantes	60

B) Programas de enriquecimiento ambiental y estrés crónico en ratas a partir de 7 meses de edad.....	63
C) Programa de enriquecimiento ambiental en ratas a partir de 18.5 meses de edad.....	64
3.2.2 Pruebas comportamentales	65
3.2.2.1 Test del laberinto radial.....	66
3.2.2.2 Test del laberinto de Barnes	67
3.2.2.3 Test de reconocimiento de objeto nuevo	69
3.2.2.4 Test del rotarod.....	70
3.2.3 Sacrificio y obtención de las muestras cerebrales.....	71
3.2.4 Determinación cromatográfica de la actividad tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) in vivo	72
3.2.5 Detección y cuantificación de la inmunoreactividad de proteínas mediante la técnica de western blot.....	76
3.2.5.1 Preparación de las muestras.....	77
3.2.5.2 Determinación del contenido proteico de las muestras. Método del ácido bicinconírico (BCA).....	78
3.2.5.3 Electroforesis.....	78
3.2.5.4 Electrotransferencia (western blot) e inmunodetección de las proteínas diana	80
3.2.5.5 Sistema de detección	82
3.2.5.6 Cuantificación fotodensitométrica.....	84
3.2.6 Determinación de los niveles cerebrales de α -tocoferol y ensayo de peroxidación lipídica (análisis de los niveles de malondialdehído)	87
3.2.7 Análisis estadístico de los resultados	89
4. RESULTADOS	91
4.1 Efectos del envejecimiento sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de rata	93
4.1.1 Efectos conductuales del envejecimiento	93
4.1.2 Efectos del envejecimiento sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo	96
4.1.3 Efectos del envejecimiento sobre la inmunoreactividad de las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo	100
4.2 Efectos del tratamiento con antioxidantes y de la restricción calórica en ratas adultas	102
4.2.1 Efectos de los tratamientos agudos con los antioxidantes trans-resveratrol, α -tocoferol, catequina y poliphenon 60 sobre las habilidades cognitivas en ratas adultas	102
4.2.2 Efectos de la restricción calórica y del tratamiento con resveratrol en las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas adultas.....	103
4.2.2.1 Efectos de la restricción calórica y el resveratrol en el peso y la temperatura corporal ..	104
4.2.2.2 Efectos conductuales producidos por la restricción calórica y el resveratrol en ratas adultas	105
4.2.2.3 Efectos de la restricción calórica y el resveratrol sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo	108
4.2.2.4 Efectos de la restricción calórica y el resveratrol sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo	111

4.3 Efectos de los tratamientos con α -tocoferol sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas viejas	113
4.3.1 Efectos conductuales producidos por los tratamientos con α -tocoferol en ratas viejas	113
4.3.2 Contenido cerebral de α -tocoferol y niveles de peroxidación lipídica en ratas jóvenes y viejas sin tratar, y tras los tratamientos con α -tocoferol en ratas viejas	117
4.3.3 Efectos del α -tocoferol sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo	118
4.3.4 Efectos del α -tocoferol sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo	121
4.4 Efectos de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas viejas	123
4.4.1 Efectos conductuales de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 en ratas viejas	123
4.4.2 Efectos de los antioxidantes catequina y poliphenon 60 sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo	127
4.4.3 Efectos de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo	130
4.5 Efectos del ejercicio y del ejercicio más catequina sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas viejas	131
4.5.1 Efectos conductuales del ejercicio y del ejercicio más catequina en ratas viejas	132
4.5.2 Efectos del ejercicio y del ejercicio más catequina sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo	136
4.5.3 Efectos del ejercicio y del ejercicio más catequina sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo	139
4.6 Efectos del enriquecimiento ambiental iniciado a distintas edades (1, 7 y 18.5 meses de edad) sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas viejas	141
4.6.1 Efectos del programa de enriquecimiento ambiental aplicado desde 1 mes de edad hasta los 20 meses de vida (enriquecimiento ambiental temprano)	141
4.6.1.1 Efectos conductuales producidos por el programa de enriquecimiento ambiental temprano	142
4.6.1.2 Efecto del enriquecimiento ambiental temprano sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo	148
4.6.1.3 Efectos del enriquecimiento ambiental temprano sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo	151
4.6.2 Efectos del programa de enriquecimiento ambiental aplicado desde 7 meses de edad hasta los 20 meses de vida (enriquecimiento ambiental intermedio)	152
4.6.2.1 Efectos conductuales del programa de enriquecimiento ambiental intermedio	153
4.6.2.2 Efectos del enriquecimiento ambiental intermedio sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo	158
4.6.2.3 Efectos del enriquecimiento ambiental intermedio sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo	161
4.6.3 Efectos del enriquecimiento ambiental desde 18.5 meses de edad hasta los 20 meses de vida (enriquecimiento ambiental tardío)	162
4.6.3.1 Efectos conductuales producidos por el programa de enriquecimiento ambiental tardío	162
4.6.3.2 Efectos del enriquecimiento ambiental tardío sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo	165

4.6.3.3 Efectos del enriquecimiento ambiental tardío sobre las proteínas SIRT1, NF-κB y RbAp48/46 en el hipocampo	167
4.7 Efectos del enriquecimiento ambiental y una dieta rica en antioxidantes desde los 14 meses de edad hasta los 20 meses de vida sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF-κB y RbAp48/46 en el cerebro de ratas viejas.....	168
4.7.1 Efectos conductuales producidos por una dieta rica en antioxidantes y el enriquecimiento ambiental	169
4.7.2 Efectos de una dieta rica en antioxidantes y el enriquecimiento ambiental sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo	174
4.7.3 Efectos de una dieta rica en antioxidantes y el enriquecimiento ambiental sobre las proteínas SIRT1, NF-κB y RbAp48/46 en el hipocampo.....	178
4.8 Efectos del estrés moderado iniciado a distintas edades (1 y 7 meses de edad) sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF-κB y RbAp48/46 de ratas viejas	180
4.8.1 Efectos del programa de estrés moderado aplicado desde 1 mes de edad hasta los 20 meses de vida (estrés moderado temprano).....	180
4.8.1.1 Efectos conductuales del programa de estrés moderado temprano.....	181
4.8.1.2 Efectos del estrés moderado temprano sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo	187
4.8.1.3 Efectos del estrés moderado temprano sobre las proteínas SIRT1, NF-κB y RbAp48/46 en el hipocampo	190
4.8.2 Efectos del programa de estrés moderado aplicado desde 7 meses de edad hasta los 20 meses de vida (estrés moderado intermedio).....	191
4.8.2.1 Efectos conductuales producidos por el programa de estrés moderado intermedio	192
4.8.2.2 Efectos del estrés moderado intermedio sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo.	198
4.8.2.3 Efectos del estrés moderado intermedio sobre las proteínas SIRT1, NF-κB y RbAp48/46 en el hipocampo	201
4.9 Tabla resumen de los resultados globales obtenidos.....	202
5. DISCUSIÓN.....	205
5.1 Efectos del envejecimiento	208
5.2 Efectos de los tratamientos con antioxidantes sobre el proceso de envejecimiento.....	214
5.2.1 Efectos de la restricción calórica y el resveratrol en animales adultos	214
5.2.2 Efectos del α-tocoferol, catequina y poliphenon 60 en animales viejos, así como la administración de una dieta rica en antioxidantes	218
5.3 Efectos del ejercicio sobre el proceso de envejecimiento	223
5.4 Efectos del enriquecimiento ambiental sobre el proceso de envejecimiento	228
5.5 Efectos del estrés crónico moderado sobre el proceso de envejecimiento	233
5.6 Consideraciones finales	237
6. CONCLUSIONES.....	239
7. ANEXOS	243
Anexo A. Programas de enriquecimiento ambiental, estrés moderado impredecible y dieta rica en antioxidantes	245
Anexo B. Publicaciones relacionadas con la tesis	255
8. BIBLIOGRAFÍA.....	259

RESUMEN

Entre las estrategias propuestas para mantener una buena salud mental al alcanzar edades avanzadas, una dieta adecuada, rica en antioxidantes que contrarresten los efectos adversos del envejecimiento debidos al daño oxidativo, así como el fomento del ejercicio y el enriquecimiento socio-cultural, podrían desempeñar un papel clave en el retraso del deterioro cognitivo. El objetivo de este trabajo fue comparar de los efectos neuroprotectores de diversas estrategias dietéticas y conductuales midiendo los cambios cognitivos y neuroquímicos durante el envejecimiento a nivel cerebral en ratas. Se han evaluado los resultados tras los tratamientos crónicos con antioxidantes (resveratrol, α -tocoferol, catequina, *poliphenon 60*), después de una dieta rica en antioxidantes, tras la aplicación de programas de ejercicio físico y de enriquecimiento ambiental o de estrés crónico moderado impredecible. Se analizaron las capacidades cognitivas y motoras mediante una serie de pruebas comportamentales en animales de distintas edades. Al final de los tratamientos, una vez envejecidos los animales, se analizó la capacidad de síntesis de los neurotransmisores monoaminérgicos (noradrenalina, dopamina y serotonina) implicados en los procesos cognitivos, en hipocampo y estriado. Asimismo, se determinaron los niveles de diversas proteínas (SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46) asociadas al proceso de envejecimiento. Los resultados muestran cómo el envejecimiento está asociado con un importante deterioro cognitivo, así como con una reducción muy significativa de los neurotransmisores monoaminérgicos en hipocampo y estriado. También va acompañado de un declive en la expresión de SIRT1 y RbAp48/46. Los tratamientos crónicos con antioxidantes, el ejercicio físico y el enriquecimiento ambiental, redujeron significativamente los deterioros de memoria y aprendizaje asociados a la edad. Estas mejoras fueron parejas con la recuperación de las vías noradrenérgica, dopaminérgica y serotoninérgica, como consecuencia de una mayor actividad de las enzimas limitantes (TH y TPH), en hipocampo y estriado. El estrés crónico mostró un efecto adverso en la memoria, acompañado por una disminución de la vía serotoninérgica. Por otra parte, los antioxidantes y el ejercicio físico recuperaron la expresión de SIRT1 en el hipocampo, no así el enriquecimiento ambiental. No se observó, en ningún caso, modificación de la proteína RbAp48/46. En base a todos estos resultados se puede establecer la importancia de las condiciones de vida saludables para preservar las habilidades cognitivas en la vejez.

RESUM

Entre les estratègies proposades per a mantenir una bona salut mental en arribar a edats avançades, una dieta adequada, rica en antioxidants que contraresten els efectes adversos de l'envelliment deguts al dany oxidatiu, així com el foment de l'exercici i l'enriquiment socio-cultural, podrien exercir un paper clau en el retard del deteriorament cognitiu. L'objectiu d'aquest treball va ser comparar els efectes neuroprotectors de diverses estratègies dietètiques i conductuals mesurant els canvis cognitius i neuroquímics durant l'envelliment a nivell cerebral en rates. S'han avaluat els resultats després dels tractaments crònics amb antioxidants (resveratrol, α -tocoferol, catequina, *poliphenon 60*), després d'una dieta rica en antioxidants, després de l'aplicació de programes d'exercici físic i d'enriquiment ambiental o d'estrès crònic moderat imprevisible. Es van analitzar les capacitats cognitives i motores mitjançant una sèrie de proves comportamentals en animals de diferents edats. A la fi dels tractaments, un cop envellits els animals, es va analitzar la capacitat de síntesi dels neurotransmissors monoaminèrgics (noradrenalina, dopamina i serotonina) implicats en els processos cognitius, en hipocamp i estriat. Així mateix, es van determinar els nivells de diverses proteïnes (SIRT1, NF- κ B i RbAp48/46) associades al procés de l'envelliment. Els resultats mostren com l'envelliment està associat amb un important deteriorament cognitiu, així com una reducció molt significativa dels neurotransmissors monoaminèrgics en hipocamp i estriat. També va acompanyat d'un declivi en l'expressió de SIRT1 i RbAp48/46. Els tractaments crònics amb antioxidants, l'exercici físic i l'enriquiment ambiental, van reduir significativament els deterioraments de memòria i aprenentatge associats a l'edat. Aquestes millores van ser parelles amb la recuperació de les vies noradrenèrgica, dopaminèrgica i serotoninèrgica, com a conseqüència d'una major activitat dels enzims limitants (TH i TPH), en hipocamp i estriat. L'estrès crònic va mostrar un efecte advers en la memòria, acompanyat per una disminució de la via serotoninèrgica. D'altra banda, els antioxidants i l'exercici físic van recuperar l'expressió de SIRT1 en l'hipocamp, no així l'enriquiment ambiental. No es va observar, en cap cas, modificació de la proteïna RbAp48/46. En base a tots aquests resultats es pot establir la importància de les condicions de vida saludables per a preservar les habilitats cognitives en la vellesa.

ABSTRACT

Among the strategies proposed to maintain good mental health in old age, an adequate diet, rich in antioxidants that counteract the adverse effects of aging due to oxidative damage, as well as the promotion of exercise and socio-cultural enrichment, could play a key role in delaying cognitive decline. The aim of this work was to compare the neuroprotective effects of different dietary and behavioral strategies by measuring cognitive and neurochemical changes during aging at the brain level in rats. The results have been evaluated after chronic treatments with antioxidants (resveratrol, α -tocopherol, catechin, polyphenon 60), after a diet rich in antioxidants, after the application of physical exercise and environmental enrichment programs or unpredictable moderate chronic stress. Cognitive and motor abilities were analyzed through a series of behavioral tests in animals of different ages. At the end of the treatments, once the animals were aged, it was analyzed the capacity of synthesis of the monoaminergic neurotransmitters (noradrenaline, dopamine and serotonin) involved in the cognitive processes, in hippocampus and striatum. Likewise, it was determined the levels of various proteins (SIRT1, NF- κ B and RbAp48/46) associated with the aging process. The results show how aging is associated with an important cognitive deterioration, as well as with a very significant reduction in monoaminergic neurotransmitters in hippocampus and striatum. It is also accompanied by a decline in the expression of SIRT1 and RbAp48/46. Chronic treatments with antioxidants, physical exercise and environmental enrichment significantly reduced age-associated memory and learning impairments. These improvements were coupled with the recovery of the noradrenergic, dopaminergic and serotonergic pathways, as a consequence of an increased activity of the limiting enzymes (TH and TPH), in hippocampus and striatum. Chronic stress showed an adverse effect on memory, accompanied by a decrease in the serotonergic pathway. On the other hand, antioxidants and physical exercise recovered the expression of SIRT1 in the hippocampus, but not environmental enrichment. No modification of the RbAp48/46 protein was observed in any case. Based on all these results, it is possible to establish the importance of healthy living conditions to preserve cognitive abilities in old age.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el aumento de la esperanza de vida de la población ha conllevado un incremento en la aparición de enfermedades asociadas a la edad, especialmente enfermedades relacionadas con el deterioro cognitivo y motor. Es por ello que parte de la investigación científica se ha centrado en la búsqueda de terapias o estrategias para paliar los efectos adversos asociados a la edad.

1.1 Envejecimiento

1.1.1 Dinámica poblacional

En las últimas décadas se han producido cambios demográficos mundiales que están conduciendo a un aumento del envejecimiento de la población. Esta situación es resultado de las mejoras sanitarias (debidas a su vez a importantes avances en la investigación biomédica) y de las mejoras sociales de la población. Así, la aparición de nuevos tratamientos para diversas enfermedades originadas a edades tempranas y adultas ha permitido incrementar significativamente tanto la calidad de vida como la longevidad. Estas mejoras, junto a la disminución de la tasa de natalidad en la mayoría de los países desarrollados, han generado una inversión de la tendencia demográfica. Según la Organización Mundial de la Salud y las Naciones Unidas, mientras que en el período de 1990-1955 la esperanza de vida al nacer a nivel mundial era de 64.5 años para ambos sexos, en el período de 2010-2015 la esperanza de vida se incrementó a 70.5 años. Además, las proyecciones realizadas indican que se espera llegar a los 77.1 años en 2045-2050 e incluso a los 83.2 años en 2095-2100. Eso conllevará que entre el año 2000 y el 2050 la proporción de la población en el mundo correspondiente a edades superiores a 60 años se doblará (Fernández Muñoz, 2014) (figura 1). En España también se puede observar este incremento significativo de la población mayor de 65 años (figura 2).

La mayor duración de la vida tiene consecuencias sobre la aparición de enfermedades entre la población de edad avanzada, especialmente desórdenes asociados a disfunciones cerebrales como demencias, Alzheimer y Parkinson. Además, conlleva modificaciones de los patrones de morbilidad (con un aumento de las enfermedades de tipo crónico y degenerativo) y mortalidad. Todo ello puede suscitar un importante incremento tanto del gasto en servicios sociales como del gasto en sanidad y atención a las necesidades de las personas mayores, conllevando un profundo impacto en la salud pública y cambios en la atención hospitalaria (Anuari de l'envelliment. Illes Balears, 2014). Por todo ello, es necesario conocer los cambios ocurridos durante el proceso del envejecimiento, así como el desarrollo de intervenciones terapéuticas que permitan retrasar la aparición de los efectos adversos asociados a la edad, tales como los deterioros que se producen en las capacidades cognitivas y motoras de las personas mayores (Bishop et al., 2010; Jiang et al., 2001).

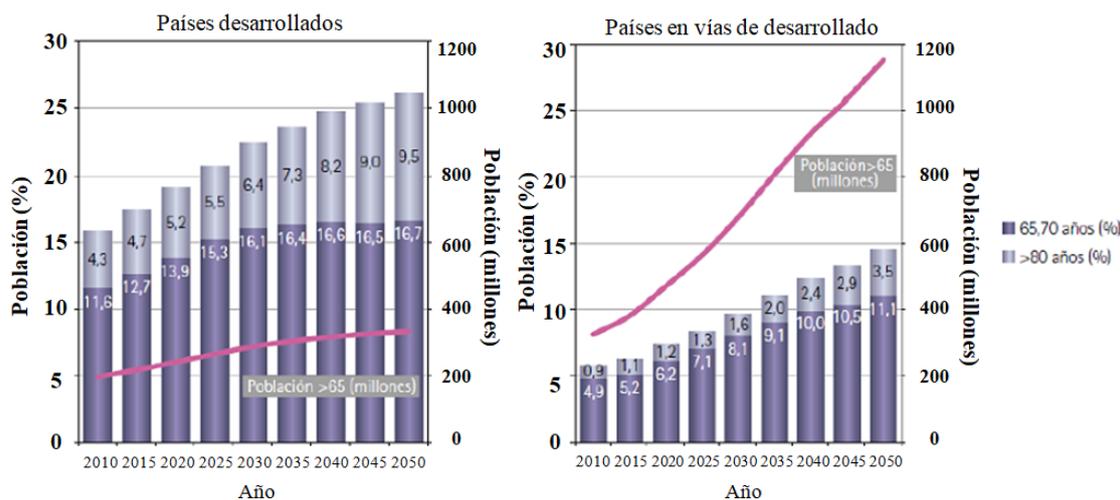


Figura 1. Proyección estadística de la población mayor de 65 años. En esta figura se representa el cálculo estimado del % de población mayor de 65 años, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo entre el año 2010 y 2050 (millones y porcentaje) (obtenido de Fernández Muñoz, 2014).

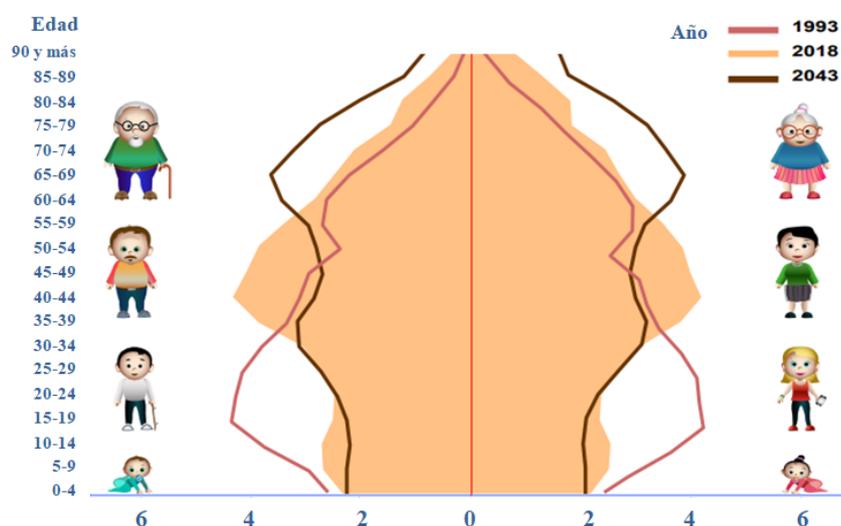


Figura 2. Pirámides de población de España: ayer, hoy, mañana. En esta figura se representan las pirámides de población en España en el año 1993, 2018 y una proyección del 2043, observándose como el porcentaje de personas de edad avanzada es cada vez más significativo (obtenido de Cifras de población, Proyecciones de población INE - España, 2020).

1.1.2 Proceso de envejecimiento

El concepto de envejecimiento es un concepto difícil de definir, no habiendo una definición universal aceptada para explicar este proceso. En 1956 Harman postuló que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de cambios en el cuerpo, ocurridos con el paso del tiempo y que provocan un incremento en la probabilidad de sufrir una enfermedad y morir (Harman, 1956). En los años posteriores esta idea se ha ido ampliando, considerando al envejecimiento como un fenómeno universal en la naturaleza, intrínseco, progresivo, complejo, multifactorial y deletéreo, el cual causa una pérdida progresiva de diferentes funciones y un incremento del

riesgo de morir (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Dabhade y Kotwal, 2013; López-Otín et al., 2013; Mandavilli et al., 2002; Shokolenko et al., 2014; Viña et al., 2007).

Además, en el sistema nervioso central (SNC) el envejecimiento está asociado a modificaciones en diversas áreas, tanto a nivel molecular (alteraciones de la expresión genética, reducciones de la cantidad de neurotransmisores y neuromoduladores, cambios en la estructura de las membranas lipídicas,...) como a nivel estructural (con disminuciones en el tamaño de diversas estructuras cerebrales) y funcional (cambios en las densidades sinápticas, alteraciones de las relaciones entre áreas cerebrales,...) (Andrews-Hanna et al., 2007; Bishop et al., 2010; Del Arco et al., 2011; Joseph et al., 2000; Park y Reuter-Lorenz, 2009). Todo ello conlleva la pérdida de funciones cognitivas, motoras y sensoriales (Mora et al., 2007; Park y Reuter-Lorenz, 2009; Pieramico et al., 2014), estrechamente relacionada con alteraciones en los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos y colinérgicos cerebrales (Burgess et al., 2002; Del Arco et al., 2011; Diamond et al., 2004; Esteban et al., 2010a, b; González-Burgos y Feria-Velasco, 2008; Haider et al., 2006, 2007, 2011; McNeill et al., 1984; Meneses, 1999; Peters, 2006; Sano et al., 1997; Tsunemi et al., 2005). Así, los déficits subyacentes al envejecimiento pueden ser el detonante de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, siendo muy importante la búsqueda de estrategias que puedan retrasar o revertir tales efectos.

1.1.3 Teoría del envejecimiento por estrés oxidativo

En el proceso del envejecimiento está implicado un complejo número de rutas moleculares que se encargan del mantenimiento, reparación y defensa de las funciones celulares (Rattan, 2014). Debido a la gran diversidad de vías implicadas, han surgido numerosas teorías para intentar explicar las causas de este fenómeno (Bishop et al., 2010; Viña et al., 2007). De entre todas las teorías surgidas para explicar este proceso, la *Teoría del estrés oxidativo o de los radicales libres del envejecimiento* (Harman, 1956) es una de las más aceptadas. Esta teoría indica que el envejecimiento es el resultado del fallo de varios mecanismos protectores del daño producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente a nivel mitocondrial. Las mitocondrias son responsables de la producción de energía a través del proceso de fosforilación oxidativa que genera adenosina trifosfato (ATP), molécula esencial para las funciones celulares (Walker, 1992). La cadena transportadora de electrones consume más del 90% del oxígeno tomado por las células (Boveris et al., 1972). Sin embargo, en este proceso también se genera ROS como consecuencia de la reducción incompleta de moléculas de oxígeno a agua, aceptor final de los electrones en el proceso de la generación de ATP (Ambrosio et al., 1993; Boveris et al., 1972). Por ejemplo, alrededor del 1-5% del oxígeno inhalado es convertido al anión superóxido durante la respiración celular, incluso en un estado fisiológico normal (Turrens y Boveris, 1980). En células sanas la oxidación mitocondrial y generación de ROS ocurre en

rangos controlados, pero en condiciones de elevado estrés o en algunas enfermedades la producción de ROS se eleva. Estas especies reactivas generadas durante la respiración pueden causar daños oxidativos acumulativos en moléculas esenciales como proteínas, lípidos y ADN, resultando en la muerte celular (Mariani et al., 2005; Scheibye-Knudsen et al., 2015) y afectando a la salud de la mayoría de los órganos vitales (Dai et al., 2014). Este proceso es conocido como estrés oxidativo y se le atribuye una gran importancia en el envejecimiento y muerte celular (Alexeyev et al., 2004). A partir de las bases que estableció Harman, numerosos autores también han sugerido la posibilidad de que el incremento del estrés oxidativo en el envejecimiento cerebral pueda conllevar disminuciones de la actividad de las enzimas antioxidantes (Pietá Dias et al., 2007; Rodrigues Siqueira et al., 2005; Tian et al., 1998).

Se ha indicado que las mitocondrias son la principal fuente de ROS; asimismo, también son la mayor diana de estas especies tóxicas. Las consecuencias biológicas del incremento de los niveles del daño molecular abarcan un amplio rango de efectos, incluyendo modificaciones en la expresión génica y estabilidad del genoma, mayor presencia de mutaciones, empeoramiento de la comunicación celular, disfunciones tisulares y orgánicas, incremento de la vulnerabilidad al estrés y eventualmente la muerte celular y del organismo (Rattan, 2006, 2014). La ausencia de histonas protectoras alrededor del ADN mitocondrial (mtADN) y su proximidad a la cadena transportadora de electrones lo convierten en un elemento extremadamente vulnerable al daño oxidativo. Como resultado, los niveles de oxidación de las bases en el mtADN son 2-3 veces superiores al ADN nuclear (Alexeyev et al., 2004; Ames et al., 1993; Chistiakov et al., 2014; Hudson et al., 1998; Scheibye-Knudsen et al., 2015; Shigenaga et al., 1994). Si este daño no es reparado, se puede producir la disminución de la funcionalidad de la cadena transportadora de electrones y el correspondiente aumento de ROS. Este círculo vicioso en la producción de ROS, así como el consecuente daño en el mtADN, conlleva una reducción de la producción de energía en la célula y su apoptosis (Alexeyev et al., 2004; Mandavilli et al., 2002; Shokolenko et al., 2014). Sin embargo, otros estudios indican que el daño oxidativo no contribuye a la mutagénesis del mtADN asociada a la edad (Greaves et al., 2012; Kennedy et al., 2013; Shokolenko et al., 2014), siendo necesarios más estudios para elucidar la causa de la mutagénesis del mtADN y el posible rol de ROS en la disfunción mitocondrial ocurrida durante el envejecimiento.

El envejecimiento y las enfermedades asociadas también están acompañados por cambios estructurales en las mitocondrias, con las correspondientes modificaciones de las propiedades biofísicas de las membranas, tales como la asimetría y la disminución de la fluidez. De igual forma, la alteración en las actividades de los complejos de la cadena transportadora produce fallos mitocondriales y desequilibrios de energía. Estas perturbaciones deterioran la función mitocondrial, ponen en peligro la homeostasis celular y aumentan la vulnerabilidad al estrés

oxidativo (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Chistiakov et al., 2014; Eckmann et al., 2013; Omodei y Fontana, 2011; Pu et al., 1999). El fallo progresivo de la homeostasis conduce a una mala función fisiológica que se manifiesta como un deterioro funcional general, enfermedades y, finalmente, la muerte (Rattan, 2006).

Últimamente se ha re-evaluado el papel de ROS en el envejecimiento y se ha postulado que el daño oxidativo puede no ser la causa esencial del envejecimiento (Hekimi et al., 2011; López-Otín et al., 2013). Varias investigaciones han demostrado una falta de correlación entre el nivel de producción de ROS y la longevidad en algunas especies. En base a estas observaciones, algunos estudios concluyeron que el aumento de ROS puede prolongar la vida útil de levaduras y gusanos (Doonan et al., 2008; Mesquita et al., 2010; Van Raamsdonk y Hekimi, 2009) y que manipulaciones genéticas que incrementan ROS en las mitocondrias y el daño oxidativo no aceleran el envejecimiento en ratones (Van Remmen et al., 2003; Zhang et al., 2009a). Además, recientemente se observó que la ubicación de ROS es crucial para determinar sus efectos sobre la esperanza de vida (Schaar et al., 2015); la presencia de niveles elevados de ROS en las mitocondrias puede aumentar la esperanza de vida, mientras que en el citoplasma la reducen.

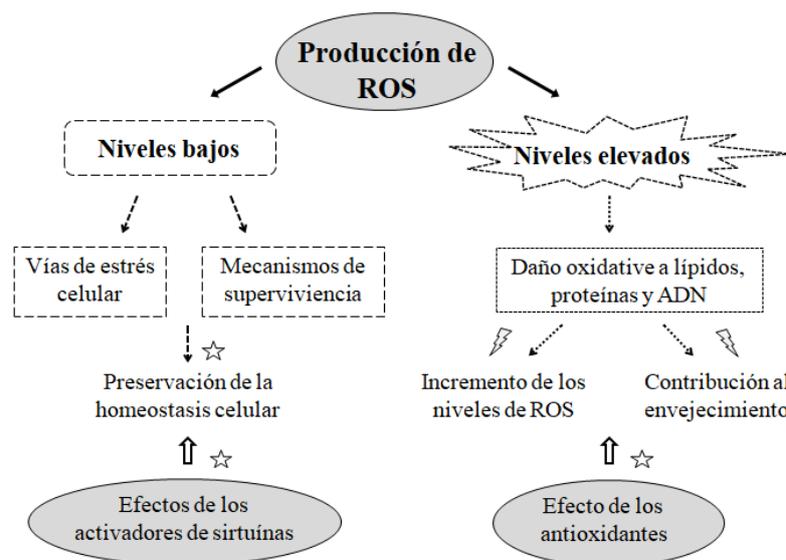


Figura 3. Doble papel de los niveles de especies de oxígeno reactivo (ROS). Los niveles bajos de ROS están implicados en las respuestas de estrés celular y los mecanismos de supervivencia, mientras que los niveles altos crónicos de ROS pueden producir daño oxidativo a macromoléculas cruciales y daño celular, lo que contribuye al fenotipo envejecido. En consecuencia, los compuestos que activan las sirtuínas, una de las vías protectoras frente al estrés oxidativo, pueden ejercer efectos beneficiosos que promueven la salud; los antioxidantes también pueden desempeñar un papel importante, especialmente cuando hay niveles elevados de ROS (modificado de Ramis et al., 2015a).

Asimismo, varios estudios indican que ROS no solo es el responsable del estrés oxidativo, sino que también puede activar moléculas que promueven la salud al prevenir o retrasar varias enfermedades crónicas y, en última instancia, prolongar la esperanza de vida (Sena y Chandel,

2012). Por lo tanto, ROS podría desempeñar un papel clave en la mediación de la respuesta al estrés asociada a la edad, lo que explicaría la correlación observada entre el envejecimiento y ROS sin implicar que ROS sea el desencadenante más temprano o la causa principal del envejecimiento (Hekimi et al., 2011). Aunque está ampliamente aceptado que niveles altos de ROS inducen daño celular y promueven el envejecimiento, bajos niveles pueden mejorar los mecanismos de defensa sistémica induciendo una respuesta adaptativa (figura 3), concepto conocido como hormesis (Masoro, 2005; Ristow y Schmeisser, 2014). Esto ocurriría porque ROS participa en numerosas funciones biológicas cruciales en la señalización y respuesta al estrés oxidativo celular (Dai et al., 2014; Shokolenko et al., 2014). Por consiguiente, Hekimi et al. (2011) propusieron que el nivel de generación de ROS aumenta gradualmente con la edad hasta alcanzar un nivel en el que la toxicidad de ROS participaría en la producción del daño que se suponía que ayudaría a aliviar. Así, los eventos de señalización de dosis bajas mediadas por ROS pueden converger para mejorar la fisiología celular y el control homeostático (Cristòfol et al., 2012; Ristow y Schmeisser, 2014).

1.1.4 Consecuencias del envejecimiento a nivel cerebral

El cerebro es uno de los órganos clave en el envejecimiento del organismo. Además, cabe destacar que es una de las estructuras del organismo más susceptibles a la excesiva carga de radicales libres que se producen con la edad (Floyd et al., 2002; Möller et al., 2010). En parte es debido a que el cerebro, aunque solo constituye un pequeño porcentaje del peso corporal, consume una gran cantidad de oxígeno para hacer frente al gran rendimiento energético que posee. Sin embargo, a pesar de este elevado consumo, no está dotado de un sistema antioxidante adicional u otros mecanismos de defensa. Es por ello que el envejecimiento cerebral podría estar asociado, al menos parcialmente, a un desequilibrio progresivo entre las defensas antioxidantes y las concentraciones intracelulares de ROS. La composición molecular de las estructuras cerebrales, con membranas ricas en ácidos grasos poliinsaturados fácilmente oxidables, también podría contribuir a la acumulación del daño neuronal con la edad (Coyle y Puttfarcken, 1993; Freeman y Keller, 2012; Kedar, 2003; Mariani et al., 2005; Maxwell, 1995; Reiter, 1998; Sohal et al., 1990; Yankner et al., 2008). Por todo ello, el daño producido por el estrés oxidativo se considera un factor muy importante en el desarrollo y consecuencias tanto del declive cognitivo asociado a la edad como de numerosas enfermedades neurodegenerativas (Bishop et al., 2010).

El proceso de envejecimiento en el cerebro conlleva varios cambios estructurales y fisiológicos que pueden afectar a la funcionalidad del mismo, incluso en ausencia de enfermedades neurodegenerativas (Bishop et al., 2010; Forster et al., 1996; Viña et al., 2007). Estos cambios están asociados a un empeoramiento de las funciones cognitivas y motoras, pudiendo comprometer la capacidad de las personas mayores para mantener un estilo de vida

activo e independiente (Cruz-Sánchez et al., 1997). A continuación, se detallan algunos de estos cambios cerebrales asociados a la edad, los cuales están implicados en los procesos cognitivos analizados en esta tesis.

1.1.4.1 Declive cognitivo y motor asociado al envejecimiento

Durante el envejecimiento se produce un deterioro de las capacidades cognitivas y motoras, el cual puede llevar a comprometer la calidad de vida del individuo. El control de los movimientos requiere de una interacción compleja de los sistemas cognitivo y sensoriomotor. Con la edad, la capacidad motora sufre numerosas alteraciones que pueden ser debidas a disfunciones del sistema neuromuscular regulado tanto por el sistema nervioso central como periférico (Digges-Buckles, 1993; Salthouse, 1982, 1988; Welford, 1984). Entre estas alteraciones destacan la disminución del equilibrio y la coordinación, así como la pérdida de fuerza muscular (Contreras-Vidal et al., 1998; Darling et al., 1989; Greene y Williams, 1996; Seidler et al., 2010). Estos cambios también se asocian a ejecuciones de movimiento más lentos y tiempos de reacción superiores (Ketcham y Stelmach, 2004; Serrien et al., 2000; Spirduso et al., 1995). Esta mayor lentitud para procesar la información asociada al movimiento podría deberse a un incremento del ruido neural y otros cambios sinápticos (Salthouse, 1993; Salthouse y Somberg, 1982). Además, las numerosas acciones que subyacen a la vida diaria imponen una carga adicional en las personas mayores en comparación a los jóvenes, lo cual podría ser debido a disminuciones en el procesamiento cognitivo con la edad (Clark, 1996; Hasher y Zacks, 1988; McDowd et al., 1991; Serrien et al., 2000) y al deterioro de las estructuras y funciones sensoriales (Schaumburg et al., 1983; Skinner et al., 1984; Stelmach y Sirica, 1986).

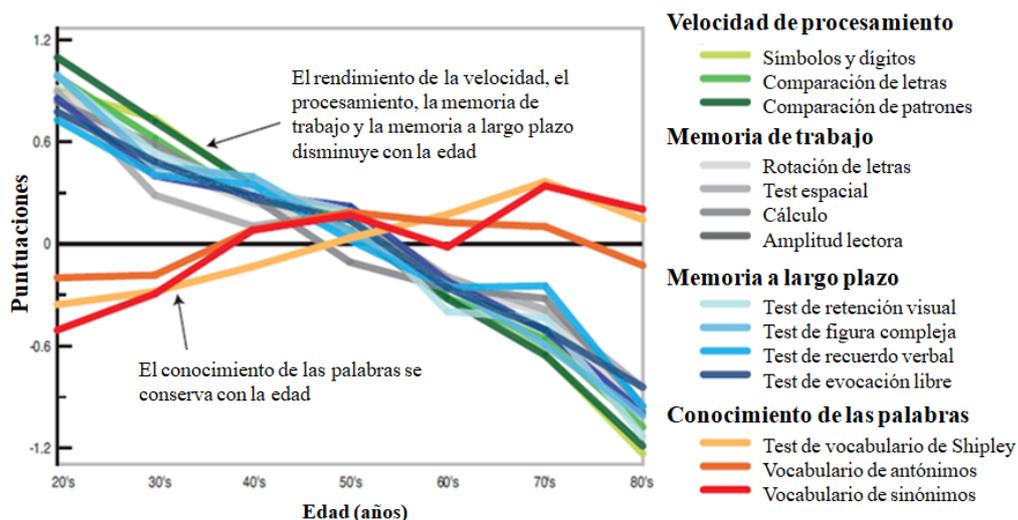


Figura 4. Efectos del envejecimiento sobre varias habilidades cognitivas, tales como la velocidad de procesamiento, memoria de trabajo, memoria a largo plazo y el lenguaje. Casi todas las medidas de la función cognitiva muestran un declive con la edad, excepto el lenguaje, que incluso puede mostrar alguna mejora (modificado de Park y Reuter-Lorenz, 2009).

A medida que los individuos envejecen, muchos aspectos del procesamiento de la información se vuelven menos eficientes, incluida la velocidad de procesamiento, la capacidad de la memoria de trabajo, la función inhibitoria y la memoria a largo plazo. Al mismo tiempo, otros aspectos de la función cognitiva como el lenguaje y la memoria implícita están protegidos y son relativamente resistentes al envejecimiento cognitivo (figura 4) (Glorioso y Sibille, 2011; Park et al., 2002; Park y Reuter-Lorenz, 2009; Zacks et al., 2000).

Existen varias clasificaciones de la memoria. Entre ellas se encuentra la teoría basada en los psicólogos Richard Atkinson y Richard Shiffrin (1968), en la que se considera que la información va pasando por diferentes almacenes de memoria a medida que se va procesando. Según esta teoría, contamos con tres tipos distintos de memoria: la memoria sensorial, la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo.

A) La memoria sensorial se correspondería a una memoria muy breve, la cual llega a través de los sentidos y rápidamente desaparece o se transmite a la memoria a corto plazo.

B) La memoria a corto plazo permite mantener durante un período de tiempo concreto los estímulos o acontecimientos del presente y es capaz de manipular esa información, interviniendo en otros procesos cognitivos superiores a lo largo de toda la vida (Cowan, 2008; Klingberg, 2010). Este tipo de memoria también es conocida como memoria de trabajo por su importancia funcional en el procesamiento cognitivo, permitiendo el desarrollo de tareas cognitivas como el razonamiento, la comprensión y la resolución de problemas. Así, en este tipo de memoria intervendría: el bucle fonológico (que trabaja con información verbal; por ejemplo, interviniendo en la lectura o en el aprendizaje de un número de teléfono), la agenda visoespacial (trabajando con un formato de imágenes visoespacial; por ejemplo, participaría en el aprendizaje de un itinerario) y el sistema ejecutivo (integrando y regulando información procedente de una variedad de fuentes, como la visual, espacial y verbal) (Baddeley, 1992). Sin embargo, nuevos estudios consideran que la memoria de trabajo debería diferenciarse de la memoria a corto plazo.

C) La memoria a largo plazo permite almacenar la información de forma duradera (Cowan, 2008), pudiéndose clasificar en memoria implícita y explícita.

- La memoria implícita o no declarativa se almacena de manera inconsciente, aunque la recuperación de dicha información sea consciente o inconsciente. Está implicada en el aprendizaje de diversas habilidades, cuya repetición tiende a incrementar la destreza en su ejecución y se activa de modo automático. Por ejemplo, intervendría en el proceso de montar en bicicleta o conducir un automóvil.

- La memoria explícita o declarativa está asociada a la consciencia o, al menos, a la percepción consciente. Se pueden distinguir dos tipos: la memoria semántica (son, por ejemplo,

los conocimientos sobre el mundo exterior o los nombres de personas y cosas y su significado, información que hemos ido aprendiendo durante nuestra vida) y la episódica (la memoria autobiográfica que permite recordar hechos concretos o experiencias personales).

En el cerebro podemos encontrar varias estructuras cerebrales que participan en los procesos de memoria y aprendizaje. Sin embargo, entre estas áreas el hipocampo y el cuerpo estriado jugarían un papel clave en dichos procesos cognitivos. Estas dos regiones pueden funcionar en paralelo como parte de un sistema dinámico de memoria (Kim y Baxter, 2001; Poldrack y Packard, 2003). Cabe destacar que la función de estas áreas cerebrales se ve considerablemente afectada con la edad, conllevando deterioros en diversos procesos cognitivos y motores (Driscoll y Sutherland, 2005; Umegaki et al., 2008). Es por ello que la presente tesis doctoral se ha centrado principalmente en estas dos regiones para el análisis del deterioro cognitivo asociado al envejecimiento.

1.1.4.2 Cambios estructurales y neurofisiológicos en el cerebro envejecido

El declive cognitivo y motor asociado a la edad puede deberse en parte a los cambios que se producen tanto a nivel estructural como a nivel neurofisiológico. Además, el envejecimiento es un proceso que parece ser específico para cada área cerebral, estando relacionado con los sustratos moleculares sinápticos neuronales de esa área (Mora et al., 2007).

A nivel estructural se han descrito modificaciones en la anatomía de las neuronas, tales como cambios en el tamaño del soma neuronal, desmielinizaciones de los axones o modificaciones de las dendritas (Burke y Barnes., 2006; Liu et al., 2017; Sugiyama et al., 2002). Además, se producen reducciones en el volumen de materia gris (Finch, 1993; Glorioso y Sibille, 2011; Greenough et al., 1986), lo cual podría estar en parte relacionado con la disminución en el número de espinas dendríticas que se produce durante el envejecimiento ya que se ha observado una menor densidad sináptica (Saito et al., 1994; Terry y Katzman, 2001). Se han observado también cambios en la barrera hematoencefálica afectando a la homeostasis cerebral, considerándose que la desregulación o el deterioro de dicha barrera es uno de los factores que pueden desencadenar en el envejecimiento cerebral y enfermedades neurodegenerativas (Delaney y Campbell, 2017; Erdő et al., 2017).

Estos cambios podrían conllevar alteraciones funcionales, tales como una disminución de la plasticidad neuronal, así como reducciones de la eficacia de los procesos de comunicación neuronal y neurotransmisión (por ejemplo, afectando a los potenciales de acción y su velocidad de conducción) (Randall et al., 2012; Rizzo et al., 2015; Sibille, 2013; Todorova y Blokland, 2017; Zhang et al., 2013).

Entre todos los cambios que se producen con la edad, en este estudio nos hemos centrado en el estudio de las vías monoaminérgicas tanto en el hipocampo como el estriado, así como la alteración en la expresión de diversas proteínas que juegan un papel importante en el proceso del envejecimiento.

1.1.4.2.1 Alteraciones del sistema de neurotransmisión monoaminérgica

Una de las principales causas de la disfunción del SNC es la alteración de la concentración de neurotransmisores en el cerebro. Los neurotransmisores monoaminérgicos están involucrados en numerosas funciones cerebrales, cuyo funcionamiento se ve considerablemente afectado durante el envejecimiento.

El sistema monoaminérgico está formado por neurotransmisores y neuromoduladores cuya estructura química consiste en un anillo aromático conectado a un grupo amino. Las monoaminas pueden derivar de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina o el triptófano. Dentro del grupo de las monoaminas se encuentran: las catecolaminas, las indolaminas y la imidazolamina (Carlsson, 1987). Estos compuestos, además de tener actividad neurotransmisora, también poseen actividad neuromoduladora, pudiendo ejercer una influencia directa o indirecta sobre la excitabilidad de las neuronas a las que estimulan (González-Burgos y Feria-Velasco, 2009). Las monoaminas se sintetizan y liberan en los terminales nerviosos de varias regiones del cerebro, tales como el hipocampo (región rica en neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas) (Berumen et al., 2012; Viljoen y Panzer, 2007) y el estriado (región rica en neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas) (George et al., 1994; Phillips, 2003), participando en la organización de diversos procesos cognitivos incluyendo el aprendizaje, la memoria y la actividad locomotora (Adams et al., 2008; Burgess et al., 2002; Cools, 2011; Gonzalez-Burgos y Feria-Velasco, 2008; Kemp y Manahan-Vaughan, 2008; Lemon et al., 2009; Lemon y Manahan-Vaughan 2006; Li et al., 2003; McNeill et al., 1984; Meneses, 1999; Schmitt et al., 2006). De esta forma, la disminución de las capacidades cognitivas y motoras durante el envejecimiento se ha asociado con una reducción de la neurotransmisión monoaminérgica en regiones involucradas en procesos cognitivos y motores como el hipocampo y el estriado (Esteban et al., 2010a, b; Haider et al., 2011, 2014; Luine et al., 1990; Ramis et al., 2016, 2020, 2021a, b; Sarubbo et al., 2015, 2018; Tsunemi et al., 2005).

Varios estudios han indicado que el estrés oxidativo es capaz de desactivar directamente la función enzimática de las enzimas limitantes en la síntesis de monoaminas, concretamente la actividad de triptófano hidroxilasa y tirosina hidroxilasa (Cash, 1998; De la Cruz et al., 1996; Hussain y Mitra, 2000; Kuhn y Arthur, 1996), lo que podría explicar la marcada disminución relacionada con la edad de las monoaminas centrales en las regiones cerebrales indicadas anteriormente.

A) Sistema catecolaminérgico:

El sistema catecolaminérgico está formado por el sistema noradrenérgico y el sistema dopaminérgico. En el paso inicial de la vía de las catecolaminas la enzima tirosina hidroxilasa (TH), limitante de esta vía, cataliza el paso de la L-tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). A continuación, DOPA es descarboxilada de forma rápida por la enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (AADC) para formar dopamina (DA) y ésta posteriormente es transformada en noradrenalina (NA) (figura 5) (Fernstrom y Fernstrom, 2007). Debido a que la TH cataliza la reacción inicial y es la enzima autolimitante en la biosíntesis de las catecolaminas, los niveles tisulares de DA y NA están determinados, en gran medida, por la actividad de esta enzima.

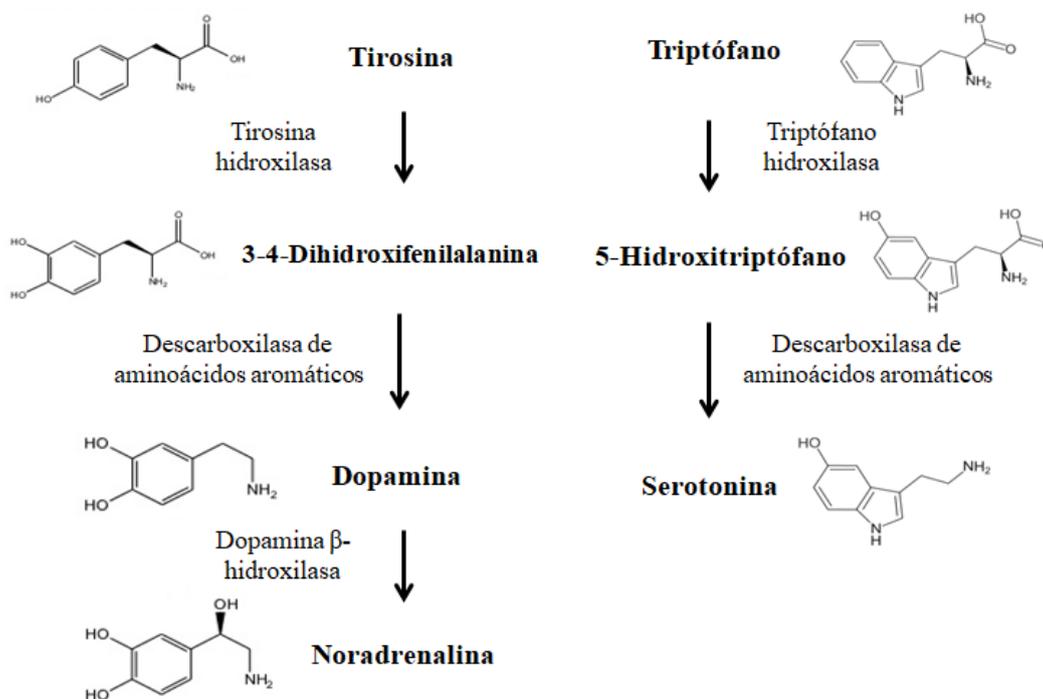


Figura 5. Esquema de la síntesis de las catecolaminas (izquierda) y la síntesis de la serotonina (derecha).

En relación al sistema dopaminérgico, esta vía se ha asociado significativamente a diversos procesos cognitivos (Lemon y Manahan-Vaughan, 2006; Li et al., 2003; Manahan-Vaughan y Kulla, 2003). Varios estudios han indicado que, con la edad, la actividad de la vía dopaminérgica disminuye debido al descenso del número de receptores dopaminérgicos y sinapsis y/o a su afinidad por los receptores (Peters, 2006; Seidler et al., 2010). Además, esta reducción también lleva ligada disminuciones en las capacidades cognitivas y motoras (Esteban et al., 2010a, b; Peters, 2006; Seidler et al., 2010; Volkow et al., 1998). Por ejemplo, se ha encontrado una correlación negativa entre los niveles de DA y el número de errores cometidos en el laberinto en forma de T (Sahakian et al., 1985).

De modo similar, la NA también participa en funciones cognitivas y es fundamental para la consolidación de la memoria. Así, la alteración de su concentración en el cerebro durante el desarrollo podría comprometer la capacidad cognitiva (Tsunemi et al., 2005). Reducciones de la neurotransmisión noradrenérgica se han asociado a déficits en el aprendizaje espacial en ratas de edad avanzada (Collier et al., 2004). Asimismo, esta vía es importante tanto en el procesamiento de nueva información como en la exploración de la novedad (Delini-Stula et al., 1984), lo cual requiere un aumento de la actividad noradrenérgica en el locus coeruleus (Sara et al., 1995; Vankov et al., 1995) y la liberación de NA en el hipocampo (Lemon et al., 2009; Sara et al., 1994). Los niveles de NA, igual que en la DA, se reducen significativamente con la edad, conllevando alteraciones de las capacidades cognitivas asociadas (Esteban et al., 2010a, b; Luine et al., 1990).

B) Sistema serotonérgico:

La serotonina (5-HT) se sintetiza a partir del triptófano gracias a la acción de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH). Dicha enzima transforma el triptófano de la dieta en 5-hidroxitriptófano (5-HTP), el cual es rápidamente descarboxilado y transformado en 5-HT por la enzima descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (figura 5) (Lovenberg et al., 1962). Existen dos isoformas de la enzima TPH: la isoforma tipo 1 (TPH-1) y la isoforma tipo 2 (TPH-2). La TPH-1 se encuentra principalmente en la glándula pineal y en las células del intestino, mientras que TPH-2 se expresa especialmente en el cerebro (Walther et al., 2003). El sistema serotonérgico tiene un papel muy importante en la función de la memoria y el aprendizaje (Gonzalez-Burgos y Feria-Velasco, 2009; Schmitt et al., 2006). Alteraciones en la actividad de la TPH pueden reducir los niveles de 5-HT cerebrales, relacionándose con la depresión tardía y otros trastornos cerebrales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Hussain y Mitra, 2000). Además, la disminución de 5-HT asociada a la edad (Haider et al., 2014; Koprowska et al., 2004) podría estar involucrada en cambios en la regulación de la plasticidad sináptica y la neurogénesis (Mattson et al., 2004). En este sentido, durante el envejecimiento se han observado cambios en la densidad de los receptores serotonérgicos (Seyedabadi et al., 2014). Por otra parte, algunos estudios han demostrado que el aumento de 5-HT en el cerebro mejora el rendimiento cognitivo (Haider et al., 2006) y el uso de diversos moduladores de serotonina han dado resultados positivos en el tratamiento de varios trastornos de la memoria (Perez-Garcia y Meneses, 2008; Seyedabadi et al., 2014).

La melatonina endógena (*N-acetyl-5-methoxytryptamine*) es un derivado de 5-HT muy importante para la sincronización de los ritmos biológicos, así como un potente compuesto para prevenir el daño oxidativo. Esta indolamina tiene la capacidad de actuar directamente como un antioxidante (Tan et al., 1993) y también puede incrementar la actividad de enzimas

antioxidantes endógenas (Fischer et al., 2013; García et al., 2014; Rodríguez et al., 2004). Además, cabe destacar que los metabolitos resultantes son capaces de actuar contra especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Allegra et al., 2003; Galano et al., 2013; Tan et al., 2014). Por otra parte, la melatonina puede interactuar con numerosas vías de señalización intracelulares (Acuña-Castroviejo et al., 1994; Dubocovich y Markowska, 2005; León et al., 2005), incluyendo la activación de sirtuínas (Chang et al., 2009; Kireev et al., 2013; Lim et al., 2012; Ramis et al., 2015a, b; Yang et al., 2015b). En la glándula pineal la 5-HT es el precursor de la síntesis de melatonina mediante la acción de la enzima TPH-1. Sin embargo, durante el envejecimiento se produce un deterioro morfológico y funcional de la glándula pineal, acompañado por un descenso significativo de la biosíntesis de melatonina endógena en dicha glándula (Reiter et al., 1980, 1981). Esta reducción de melatonina puede conllevar alteraciones en los ciclos cronobiológicos, así como el desarrollo de diversas enfermedades (dolencias cardiovasculares, cáncer...) y envejecimiento prematuro (Erren y Reiter, 2008; Poeggeler, 2005). La disminución de la síntesis de melatonina con la edad puede relacionarse con alternaciones en la actividad de TPH-1 y las correspondientes reducciones en la síntesis de 5-HT. Es por ello que el consumo de alimentos ricos en triptófano y melatonina pueden contribuir a recuperar la función de la glándula pineal, previniendo el descenso de la síntesis de 5-HT y la melatonina (Esteban et al., 2010a; Moranta et al., 2014).

1.1.4.2.2 Relación de sirtuínas, NF- κ B y RbAp48 con el envejecimiento y el declive cognitivo

Numerosas vías de señalización se ven alteradas durante el envejecimiento (Bishop et al., 2010). Es por ello que comprender los mecanismos modificados e identificar los moduladores asociados puede tener importantes consecuencias en la prevención y tratamiento de las discapacidades y las enfermedades relacionadas con la edad (Glorioso y Sibille, 2011). En la presente tesis doctoral se han analizado tres posibles vías que pueden estar relacionadas con la memoria y los cambios producidos con la edad: SIRT1, NF- κ B y RbAp48.

A) La restricción calórica y la vía de las sirtuínas en relación a la longevidad y el envejecimiento

La restricción calórica (RC), es decir, la reducción de la ingesta de calorías sin causar malnutrición, es la única intervención conocida que aumenta la esperanza de vida en muchas especies como levaduras, moscas de la fruta, nematodos, peces, ratas, ratones, hámsteres y perros (Ingram y Roth, 2015; Masoro, 2005; Weindruch, 1996) e incluso primates (Colman et al., 2009; Ingram et al., 2006). La evidencia de que la longevidad de los mamíferos podría incrementarse surgió en 1935 en un estudio con roedores que mostró que la RC incrementó el promedio de vida, así como la vida útil máxima, y retrasó la aparición de patologías asociadas a

la edad (McCay et al. 1935). Sin embargo, no fue hasta la década de 1990 que la restricción calórica se vio como un modelo científico que podría proporcionar información sobre el retraso del proceso de envejecimiento y, por lo tanto, identificar los mecanismos subyacentes del envejecimiento (Kennedy et al., 2007). Se ha demostrado que la RC retarda la acumulación de moléculas dañadas por la oxidación asociada a la edad. Así, atenúa el aumento asociado a la edad en la peroxidación de lípidos (Matsuo et al., 1993), anula la acumulación de proteínas oxidadas, eleva el recambio de proteínas (Dubey et al., 1996; Lee et al., 1999) y reduce el daño oxidativo del ADN (Chistiakov et al., 2014), reflejándose en los niveles de 8-oxo-2-desoxiguanosina (Hamilton et al., 2001; Sohal et al., 1990). Todo ello conduce a una mejora de la función mitocondrial general y biogénesis mitocondrial (Chistiakov et al., 2014; Civitarese et al., 2007). Además, se ha descrito que la RC en mamíferos induce una red compleja de cambios fisiológicos y de comportamiento, como una reducción de la glucosa en sangre, triglicéridos y factores de crecimiento, una disminución en la temperatura corporal y un aumento en el movimiento y la actividad (Lane et al., 2002; Mattison et al., 2003; Speakman y Mitchell, 2011; Weindruch, 1996). Todos estos cambios pueden llevar a una mejoría en la salud, reduciendo la incidencia y la aparición de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, aumentando la resistencia al estrés oxidativo y desacelerando el deterioro funcional (Allard et al., 2009; Ingram et al., 2006; Ingram y Roth, 2015; Omodei y Fontana, 2011). Incluso si se pudiera corroborar la RC como una estrategia eficaz contra el envejecimiento en humanos, la aplicación de esta intervención sería problemática debido al grado y la duración de la restricción requerida. Es por ello que numerosos estudios se han centrado en la búsqueda o creación de “miméticos de la restricción calórica”. Esta estrategia se enfoca en la identificación de compuestos que pueden imitar algunos de los efectos beneficiosos asociados con la RC, incluyendo la capacidad de actuar sobre las vías metabólicas y de respuesta al estrés moduladas por la RC (Ingram et al., 2004; Ingram y Roth, 2015).

Una gran cantidad de estudios ha sugerido que el incremento de la vida útil y los principales efectos beneficiosos para la salud de la RC están mediados por mecanismos que involucran a las sirtuínas (Michan y Sinclair, 2007; Sauve et al., 2006). Las sirtuínas son una antigua familia de histonas deacetilasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000; Morris, 2013), ampliamente distribuidas en todos los filos. Las sirtuínas desempeñan varios roles en diversos procesos biológicos (Michan y Sinclair, 2007; Morris, 2013; Sauve et al., 2006), tales como el silenciamiento transcripcional, recombinación de ADN y mecanismos de reparación (Bennett et al., 2001; Brachmann et al., 1995; O'Hagan et al., 2008; Oberdoerffer et al., 2008), apoptosis (Luo et al., 2001; Motta et al., 2004), respuesta celular al estrés (Anderson et al., 2003; Brunet et al., 2004; Cohen et al., 2004), protección

axonal (Araki et al., 2004) y el envejecimiento (Guarente, 2000; Kaeberlein et al., 2004; Lin et al., 2000; Oberdoerffer et al., 2008).

En los mamíferos se pueden encontrar 7 sirtuínas diferentes (SIRT1-7), las cuales regulan un conjunto diverso de vías relacionadas con el metabolismo energético, la supervivencia celular y la longevidad (Michan y Sinclair, 2007). Todas las sirtuínas de mamíferos contienen un dominio de unión NAD^+ y un dominio catalítico, pero difieren en sus dominios terminales (Horio et al., 2011; Morris, 2013). Estas siete sirtuínas tienen diferentes sustratos y se localizan en compartimentos celulares específicos (Yamamoto et al., 2007). Además de tener una localización particular dentro de las células, en el cerebro cada tipo de sirtuína también tiene un patrón de expresión variable dependiente de cada región cerebral (Sidorova-Darmos et al., 2014). Entre todas las sirtuínas, la sirtuína 1 (SIRT1) ha sido una de las más estudiadas (Haigis y Guarente, 2006). SIRT1 puede desacetilar histonas (Imai et al., 2000; Vaquero et al., 2004), así como un gran número de sustratos (Yamamoto et al., 2007), incluyendo la proteína supresora de tumores p53, el factor de reparación de ADN Ku70, el factor nuclear NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), el transductor de señal y activador de transcripción 3 de la familia FOXO y otras proteínas que afectan a la resistencia al estrés en las células (Bernier et al., 2011; Brunet et al., 2004; Cohen et al., 2004; Luo et al., 2001; Motta et al., 2004; Vaziri et al., 2001; Yeung et al., 2004). Diversos estudios han sugerido también que SIRT1 juega un papel importante en el metabolismo energético; se cree que la dependencia de NAD^+ como cofactor para la catálisis vincula la actividad de SIRT1 con el estado energético y metabólico de la célula (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000). Además, el metabolismo de la glucosa, los ácidos grasos y el colesterol es modulado en varios tipos de células por los efectos de SIRT1 sobre reguladores conocidos de enzimas metabólicas, entre las que se encuentran el coactivador transcripcional 1 alfa (PGC-1 α), el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR- γ) y el receptor hepático X (Gerhart-Hines et al., 2007; Picard et al., 2004; Rodgers y Puigserver, 2007).

Asimismo, las aplicaciones potenciales de las sirtuínas en la supervivencia de las células neuronales, la respuesta al estrés y el control del ciclo celular apuntan a la importancia de esta familia de genes en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (Yamamoto et al., 2007). SIRT1 desempeña un papel clave en el mantenimiento de los sistemas neuronales y el comportamiento durante el envejecimiento normal, incluida la modulación de la plasticidad sináptica y los procesos de memoria (Herskovits y Guarente, 2014). Así, SIRT1 se expresa en las neuronas del hipocampo y su ausencia conlleva deterioros de las habilidades cognitivas, incluyendo la memoria inmediata, el condicionamiento clásico y el aprendizaje espacial (Michán et al., 2010). Por lo tanto, SIRT1 puede ofrecer un enfoque prometedor en el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas (Herskovits y Guarente, 2013, 2014).

Por ejemplo, se ha observado que una mayor actividad de SIRT1 protege contra la toxicidad de la proteína β amiloide en cultivos celulares y la neurodegeneración en el modelo de ratón p25/CDK5, el cual presenta aspectos de la patología de la enfermedad de Alzheimer y la tauopatía (Kim et al., 2007).

Se han identificado varios compuestos que tienen la capacidad de activar sirtuínas en diversos organismos, incluidos levaduras, moscas y mamíferos. Entre estos activadores se encuentran varios polifenoles (como el resveratrol, antioxidante presente en diversos alimentos), la melatonina (indolamina producida en la mayor parte de organismos, incluyendo los mamíferos), así como una serie de compuestos farmacéuticos (por ejemplo, el compuesto SRT1720) (Baur, 2010; Minor et al., 2011; Sauve et al., 2005, 2006; Yu et al., 2014).

B) Neuroinflamación y envejecimiento. La vía de NF- κ B

Durante el proceso de envejecimiento otra característica habitual es el incremento de procesos asociados a la inflamación. La neuroinflamación es un mecanismo de defensa contra los estímulos dañinos y el daño cerebral. Sin embargo, la inflamación crónica puede resultar perjudicial tanto en el propio proceso del envejecimiento como en enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad. Además, la neuroinflamación crónica puede asociarse a procesos neurodegenerativos implicados en el deterioro cognitivo y la disfunción motora (Bok et al., 2019; Di Benedetto et al., 2017; Godbout et al., 2005; Mattson y Arumugam, 2018; Salminen et al., 2008; Spencer et al., 2012). En relación a ello, la inducción de genes asociados a respuestas inmunitarias e inflamatorias se observa en la mayoría de las regiones del cerebro humano durante el envejecimiento normal, aunque los cambios varían en las distintas áreas cerebrales (Berchtold et al., 2008; Cribbs et al., 2012; Soreq et al., 2017).

NF- κ B es un factor de transcripción para genes involucrados en la supervivencia celular y apoptosis, inflamación, adhesión celular, diferenciación y crecimiento celular. Además, es activado por una gran variedad de estímulos como agentes inflamatorios, patógenos o promotores tumorales (Dorai y Aggarwal, 2004; Hayden y Ghosh, 2008; Karin et al., 2004; Sivandzade et al., 2018; Tilstra et al., 2012). En los mamíferos NF- κ B consta de cinco subunidades (RelA, RelB, c-Rel, p105/50 y p100/52) que poseen funciones de activador transcripcional (proteínas Rel) o de represor (p50, p52). Dentro del SNC la señalización de NF- κ B abarca la activación principalmente de heterodímeros que contienen RelA, c-Rel y p50. Asimismo, en neuronas y poblaciones de células gliales NF- κ B se activa rápidamente bajo un estrés metabólico o traumático (Haenold et al., 2014; Herrmann et al., 2005). Este factor de transcripción también posee actividad constitutiva en subconjuntos de poblaciones de células neuronales (Kaltschmidt et al., 1994). NF- κ B es un factor de respuesta rápida que se mantiene en un estado de "reposo" a través de la asociación con el inhibidor de proteínas κ B (I κ B). Los

estímulos inductores, tales como el estrés oxidativo, las citoquinas y los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), estimulan los receptores de la superficie celular desencadenando la activación del complejo de quinasa I κ B, lo que lleva a la fosforilación, ubiquitinación y degradación de I κ B. La degradación proteasomal de I κ B, por lo tanto, conduce a la liberación y translocación de dímeros NF- κ B al núcleo donde se unen a secuencias específicas de ADN y promueven la transcripción de genes diana específicos. Aunque el NF- κ B se caracterizó por primera vez en células del sistema hematopoyético, diversas investigaciones muestran su presencia en la mayoría de células, incluidas las neuronas, astrocitos, microglía, oligodendrocitos y células endoteliales de unidades neurovasculares y cerebrovasculares. Además, varios estudios han demostrado un papel fisiológico importante de la vía de señalización NF- κ B en el SNC, desarrollando funciones relacionadas con respuestas celulares a las lesiones neuronales y la plasticidad sináptica (Baker et al., 2011; Hayden y Ghosh, 2012; Shih et al., 2015; Sivandzade et al., 2018; Zhang et al., 2017). Sin embargo, con la edad se produce la sobreactivación de esta vía (Bok et al., 2019; Tilstra et al., 2012), lo cual conllevaría una neuroinflamación crónica. La inflamación continuada induce la generación de ROS en varios tipos celulares y, a su vez, ROS puede activar NF- κ B, formándose un bucle de mayor producción de ROS e incremento de la actividad de NF- κ B (Chung et al., 2002; Mhatre et al., 2004).

Varios estudios han sugerido que la RC reduce la inflamación inhibiendo la vía de señalización NF- κ B en el cerebro. Este efecto podría ser debido a que la activación de la vía de señalización de NF- κ B puede ser regulada por SIRT1 (la cual mediaría la desacetilación de la subunidad p65 de NF- κ B), disminuyendo la inflamación (Oeckinghaus y Ghosh, 2009; Yeung et al., 2004) y la secreción de citoquinas proinflamatorias (Csiszar et al., 2014; Xu et al., 2015; Zhang et al., 2016). Es por ello que activadores de SIRT1 (tales como algunos polifenoles) podrían regular los procesos inflamatorios (Spencer et al., 2012).

C) Papel de RbAp en el declive cognitivo asociado a la edad

En un estudio del grupo liderado por Eric R. Kandel mostraron que la pérdida de la proteína de unión a histonas RbAp (del inglés *retinoblastoma-binding protein*) en el giro dentado (una subregión del hipocampo) es clave para la disminución de la memoria relacionada con la edad (Pavlopoulos et al., 2013). En este estudio se observó que los ratones de edad avanzada presentaban niveles de RbAp48 más bajos que los animales jóvenes. Además, al inducir la expresión de una forma negativa dominante de RbAp48 en ratones jóvenes (RbAp48-DN), estos animales mostraban una menor capacidad que los animales control para desarrollar tareas relacionadas con la memoria de reconocimiento de objetos nuevos y con la memoria espacial. En ambas tareas, los déficits de memoria fueron similares a los de ratones de tipo salvaje

envejecidos genéticamente. Cabe destacar que cuando los autores detuvieron la expresión de RbAp48-DN (alimentando a los ratones con doxiciclina) se remitieron los efectos adversos sobre la memoria. Es por ello que la falta de RbAp48 puede comprometer la capacidad para formar recuerdos sólidos de objetos y ubicaciones nuevas.

La proteína RbAp48 interactúa con las histonas y modifica su acetilación, lo que es crucial para la consolidación de la memoria. Así, en los ratones que expresan RbAp48-DN se observó una disminución específica en el giro dentado de la actividad de la histona acetiltransferasa (HAT) de la proteína de unión CREB (CBP) y una reducción en los niveles de histonas acetiladas H4 y H2B. Por otra parte, cuando los autores incrementaron la expresión de RbAp48 en el giro dentado de ratones envejecidos, no solo pudieron mejorar los déficits de memoria de estos ratones, sino que también aumentaron la actividad HAT de la CBP y los niveles de H4 y H2B acetilados (Pavlopoulos et al., 2013). Posteriormente se ha indicado que la proteína RbAp48 puede controlar la expresión de las proteínas BDNF (del inglés *brain derived neurotrophic factor*) y GPR158 (receptor acoplado a proteínas G 158) en el hipocampo (Kosmidis et al., 2018), ambos componentes críticos de la señalización de la osteocalcina (OCN) en el hipocampo del ratón. Kosmidis *et al.* mostraron que la inhibición de RbAp48 hipocampal inhibe las funciones beneficiosas de OCN en la cognición y provoca déficits en la memoria. A su vez, la interrupción de la señalización de OCN/GPR158 conduce a la regulación a la baja de la proteína RbAp48, imitando los déficits de memoria observados en el hipocampo envejecido. Por otra parte, la activación de la vía OCN/GPR158 aumenta la expresión de RbAp48 en el giro dentado envejecido y previene la pérdida de memoria relacionada con la edad.

Todos estos resultados indicarían que RbAp48 es un factor clave para la pérdida de memoria asociada a la edad y que el desarrollo de compuestos que aumenten la señalización de esta proteína podría ser útil para reducir los problemas de memoria que conlleva el envejecimiento (Flight, 2013).

1.2 Estrategias para la prevención del envejecimiento cerebral

Tomando en conjunto toda la información anterior, el envejecimiento no estaría mediado por un solo mecanismo clave en la producción del daño oxidativo, sino que puede ser el resultado de una desregulación progresiva en una red funcional compleja, con una multiplicidad de procesos celulares y moleculares implicados que contribuirían a la senescencia en el cerebro. Es por ello que se requiere un cóctel de intervenciones múltiples que se dirijan a varios de los puntos clave de esta red para limitar la dishomeostasis relacionada con la edad (Drögue y Schipper, 2007). A continuación, se detallan las diferentes estrategias utilizadas en esta tesis

para paliar o retrasar la aparición de los efectos adversos asociados al envejecimiento, principalmente los relacionados con el deterioro cognitivo y motor.

1.2.1 Prevención del envejecimiento cerebral mediante el uso de antioxidantes

Numerosos estudios han asociado el incremento de ROS con la aparición de disfunciones cerebrales y la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Berr et al., 2000; Gallagher et al., 1996; Serrano y Klann, 2004). Por ejemplo, se ha relacionado el aumento de la generación de oxidantes en el cerebro con el empeoramiento del aprendizaje y la memoria (Fukui et al., 2005). Además, el deterioro de la memoria relacionado con la edad se correlaciona con una disminución de los antioxidantes del cerebro y del plasma (Berr, 2000; Perrig et al., 1997; Rinaldi et al., 2003). Del mismo modo, el envejecimiento cerebral podría asociarse con un desequilibrio progresivo entre las defensas antioxidantes y las concentraciones intracelulares de ROS (Reiter, 1998). Una característica común en varias enfermedades neurodegenerativas es la existencia de daño mitocondrial debido al estrés oxidativo (Acuña-Castroviejo et al., 2001). Por lo tanto, la dependencia parcial del daño oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas puede sugerir el uso de antioxidantes en su tratamiento (Schapira, 1999). La teoría de los radicales libres del envejecimiento también proporciona una justificación para la intervención mediante la administración de antioxidantes (Sastre et al., 2000). Un antioxidante se puede definir como cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo provocado por ROS de una molécula objetivo (Gutteridge y Halliwell, 2010; Halliwell, 1997). Los antioxidantes se clasifican en función de su solubilidad en hidrosolubles y liposolubles. Entre los antioxidantes hidrosolubles encontramos por ejemplo la vitamina B y la vitamina C (ácido ascórbico), mientras que entre los liposolubles estarían los carotenoides, la vitamina E, la vitamina A, algunas quinonas y la mayoría de los polifenoles (Corredor, 2006).

Además de los efectos protectores de las defensas enzimáticas antioxidantes endógenas, el consumo de antioxidantes en la dieta (principalmente frutas y verduras) parece ser de gran importancia y se asocia con un menor riesgo de enfermedades degenerativas (Ames et al., 1993). Los antioxidantes pueden ayudar al sistema de defensa antioxidante mitocondrial (Ramis et al., 2015b), especialmente cuando las concentraciones de ROS aumentan notablemente. En este sentido, varios estudios han indicado que los antioxidantes de la dieta pueden reducir algunos de los cambios cerebrales producidos en la expresión de genes relacionados con la edad, prevenir el daño oxidativo cerebral y disminuir el deterioro cognitivo en ratas de edad avanzada (Lau et al., 2005; Liu et al., 2002; Murphy et al., 2014; Park et al., 2009). Por ejemplo, varios experimentos han mostrado que la aplicación de suplementos dietéticos con extractos de frutas (como fresa) o vegetales (como espinacas) en ratas puede retrasar y revertir los efectos nocivos del envejecimiento sobre el comportamiento cognitivo y motor (Joseph et al., 2000,

2009) y prevenir la aparición de varias patologías neurodegenerativas (Corredor, 2006; Joseph et al., 2009). Aunque los mecanismos mediante los cuales los antioxidantes pueden ejercer su acción se están todavía investigando, algunos estudios han indicado que es posible que varios polifenoles presentes en los alimentos presenten propiedades antiinflamatorias (Joseph et al., 2009) y la capacidad de modificar la fluidez de las membranas (Halder y Bhaduri, 1998), además de su propia capacidad antioxidante.

En la presente investigación se ha analizado el efecto de la administración de una dieta rica en antioxidantes a largo plazo. Además, también se han analizado los efectos individuales de varios antioxidantes habituales en la dieta en ratas de edad avanzada: vitamina E, catequina y *poliphenon 60*.

1.2.1.1 Beneficios de la Vitamina E sobre el envejecimiento cerebral

La vitamina E es un nutriente esencial en los seres humanos y una conocida sustancia antioxidante, muy frecuente en la dieta mediterránea (estando presente en verduras, frutas, semillas y aceites de semillas) (Schneider, 2005). Además, se le han atribuido numerosas funciones en relación al contexto fisiológico en el que se halle, entre las que se encuentran fortalecer el sistema de defensa antioxidante, la reducción de la producción de ROS y la capacidad de mantener la fluidez de la membrana en el cerebro (Hong et al., 2004).

El término vitamina E es usado para agrupar a una familia de 8 moléculas con una estructura muy similar: tocoferoles y tocotrienoles. Los 4 tocoferoles consisten en un anillo cromano con diferentes patrones de grupos metilo en las posiciones 5, 7 y 8 al inicio de la cadena (α , β , δ y γ) y en una cadena lateral con 16 carbonos. Todas estas moléculas poseen actividad antioxidante, aunque el α -tocoferol (figura 6) es el isómero químicamente y biológicamente más activo, así como el más abundante (Schneider, 2005; Sung et al., 2004). En humanos, α -tocoferol muestra la mayor actividad biológica en comparación con las otras formas de la vitamina E debido a la retención selectiva de este compuesto mediado por la proteína de transferencia de α -tocoferol hepática (α -TTP), mientras que las otras formas se degradan y excretan en el hígado. La incorporación selectiva de α -tocoferol en las lipoproteínas circulantes, que distribuyen este compuesto a los tejidos no hepáticos, también se ve favorecida por la α -TTP hepática (Jiang, 2014; Traber, 2012).

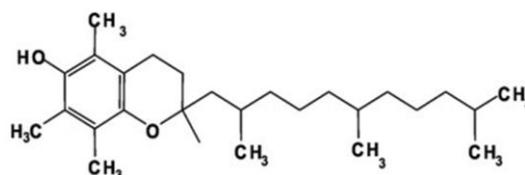


Figura 6. Estructura química del compuesto α -tocoferol (modificado de Schneider, 2005).

A este compuesto se le atribuye una gran eficacia antioxidante (Meydani, 1995). En particular, la vitamina E se encuentra en las células y las membranas de los orgánulos, donde puede ejercer su máximo efecto protector, actuando como la primera línea de defensa contra la peroxidación lipídica y promoviendo la reparación de la membrana al prevenir la formación de fosfolípidos oxidados que podrían interferir con los eventos de fusión de la membrana (Howard et al., 2011). Además, es capaz de proteger frente a la disminución de la fluidez de la membrana y de los procesos de peroxidación lipídica asociados (Reiter, 1998). En relación a esta habilidad, el α -tocoferol reacciona con los radicales peroxilo de los ácidos grasos, productos primarios de la peroxidación lipídica, e intercepta la reacción en cadena. Lo que hace que α -tocoferol sea un antioxidante tan eficaz es su capacidad de reaccionar con el radical peroxilo de forma extremadamente rápida, evitando que dicho radical pueda hacer cualquier otra reacción, de forma que elimina el carácter oxidante del ácido graso oxidado; en esta reacción antioxidante, el α -tocoferol se convierte en un radical bastante estable (Navarro et al., 2005; Schneider, 2005). Asimismo, el radical del α -tocoferol producido durante su actividad es reciclado a su forma efectiva mediante el conjunto de ubiquinol mitocondrial (Ingold et al., 1993; Lass y Sohal, 1998; Maguire et al., 1989; Mukai et al., 1990); por lo tanto, este compuesto se regenera continuamente a su forma activa en las mitocondrias (Smith et al., 1999). Otro de los motivos por los que presenta esta capacidad antioxidante se asocia también a su capacidad para conservar la función de las mitocondrias (Hong et al., 2004; Lang et al., 1986; Sokol et al., 1998; Thomas et al., 1989).

Mientras que la deficiencia de vitamina E altera el metabolismo monoaminérgico en el cerebro de rata (Adachi et al., 1999; Dexter et al., 1994), algunos estudios han sugerido que la suplementación dietética con vitamina E puede tener un papel preventivo contra el deterioro cognitivo asociado a la edad e incluso mostrar efectos positivos contra las enfermedades neurodegenerativas (Joseph et al., 1998; Navarro et al., 2005). Estudios previos han observado que α -tocoferol es capaz de evitar la oxidación y la apoptosis en cultivos celulares neuronales de hipocampo de ratón sometidos a estrés oxidativo (Choi et al., 2003), mejorando también las capacidades cognitivas y la función mitocondrial en ratones a los que se administró una dieta suplementada con vitamina E (Navarro et al., 2005). También se ha establecido que la administración repetida de antioxidantes (incluyendo α -tocoferol) previene los efectos adversos producidos por la administración del péptido β -amiloide en cultivos celulares (Tamagno et al., 2003), así como los déficits de aprendizaje y memoria en ratas (Yamada et al., 1999). En estudios realizados con pacientes adultos sanos, los resultados indicaron que tomar suplementos de vitamina C, vitamina E y β -carotenos en la dieta podría relacionarse con una menor incidencia de la enfermedad de Alzheimer, siendo la vitamina E la que presentaría un mayor efecto protector (Engelhart et al., 2002; Li et al., 2012). En esta misma línea, Sano et al. (1997)

observaron que pacientes con una moderada afectación de la enfermedad de Alzheimer presentaban una progresión más lenta de la enfermedad tras el tratamiento con α -tocoferol o con selegilina (inhibidor de la monoaminoxidasa tipo B). Además, se ha descrito también que la vitamina E posee propiedades antiinflamatorias en varios tipos celulares (Galli et al., 2017; Liu et al., 2019b; Mocchegiani et al., 2014). Así, la vitamina E previno la formación de macrófagos a través de la modulación de la actividad de la vía NF- κ B inducida por el estrés oxidativo (Huang et al., 2012; Otero et al., 2005). En varios modelos de activación neuroglial y excitotoxicidad, que simulan los efectos de la epilepsia y el trauma cerebral, se ha mostrado como α -tocoferol puede ejercer un papel citoprotector para las neuronas del hipocampo y regulador de las vías inflamatorias de la neuroglia. Esta función neuroprotectora también ha sido propuesta para explicar la supuesta relación entre un estado óptimo de vitamina E y la reducción del riesgo de deterioro cognitivo y enfermedad de Alzheimer (Galli et al., 2017; Mangialasche et al., 2013). Por todo ello, la vitamina E como suplemento dietético podría resultar un agente preventivo del declive cognitivo y motor asociado a la edad (Joseph et al., 2000).

1.2.1.2 Relevancia de los polifenoles en la prevención del envejecimiento cerebral

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas sintetizadas por las plantas como metabolitos secundarios y fitoalexinas en respuesta al estrés (tales como lesiones físicas, infecciones por patógenos incluyendo bacterias y hongos, deficiencias nutricionales, fluctuaciones de temperatura o incluso exposición a ozono o a radiación ultravioleta) (Frémont, 2000; Gómez-Pinilla y Nguyen, 2012; López-Miranda et al., 2012; Pandey y Rizvi, 2009). Los polifenoles están compuestos por múltiples grupos fenólicos, los cuales pueden asociarse con varios carbohidratos y ácidos orgánicos, distinguiéndose así taninos, ligninas y flavonoides. Químicamente se pueden separar en 10 grupos diferentes según el número de anillos de fenol que contienen y los elementos unidos a dichos anillos (Gómez-Pinilla y Nguyen, 2012). Entre los polifenoles, los flavonoides son el grupo más abundante, distinguiéndose en antocianidinas (por ejemplo, malvidinas y cianidinas), isoflavonas (que incluye la genisteína), flavanoles (como las catequinas y epicatequinas), flavonoles (por ejemplo, la quercetina), flavanonas (como la naringenina) y flavonas (por ejemplo, la apigenina). Otro grupo de polifenoles importante serían los estilbenos (que incluye el resveratrol) y los lignanos (entre los que se encuentra la silimarina) (Spencer, 2008a; Vauzour et al., 2008).

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en la dieta humana, incluyendo la dieta mediterránea, y están presentes en una amplia variedad de alimentos. Entre estos alimentos podemos encontrar la mayor parte de frutas y verduras (tales como uvas, nueces, cacahuets, granadas, grosellas, frambuesas, arándanos, manzanas, naranjas, tomates, cacao, cebollas, brócoli y alcachofas), así como otros productos derivados (como el té, cereales, aceite de oliva y

cerveza) (Baur y Sinclair, 2006; Gómez-Pinilla, 2008; Manach et al., 2004; Murphy et al., 2014; Scalbert et al., 2005a, b). Tras su consumo y su absorción a nivel intestinal, estos compuestos pueden viajar a diversos tejidos corporales y órganos, incluido el cerebro (Manach et al., 2004). Sin embargo, debido a las diversas susceptibilidades de los compuestos fenólicos por el metabolismo de las enzimas intestinales, su biodisponibilidad puede variar de muy baja a muy alta (Wollen, 2010). Además, la biodisponibilidad de un polifenol también está determinada por su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica. Algunos estudios sugieren que, en dietas ricas en polifenoles, estos compuestos pueden alcanzar una concentración del orden de 1 nmol/g de tejido en el cerebro (Schaffer y Halliwell, 2012). Se ha afirmado que muchos polifenoles poseen efectos neuroprotectores; sin embargo, varios polifenoles son incapaces de cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que sus beneficios para la salud en el cerebro se ejercerían de forma indirecta a través de otras vías (Youdim et al., 2003). Numerosas investigaciones han mostrado que gran variedad de polifenoles tienen la capacidad de retrasar o limitar los efectos adversos del envejecimiento en el SNC, incluyendo el deterioro de las capacidades cognitivas. Así, varios estudios han indicado que son capaces de reducir el daño oxidativo producido en lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN (Cirillo et al., 2014; Khurana et al., 2013). Por otra parte, los polifenoles pueden actuar sobre una importante variedad de mecanismos cerebrales que ayudan al mantenimiento de la salud mental, así como a su recuperación en enfermedades neurodegenerativas (Gómez-Pinilla y Nguyen, 2012). En este sentido, se ha demostrado que los polifenoles ejercen efectos neuroprotectores modulando directamente varias vías celulares relacionadas con los procesos neuronales (Murphy et al., 2014). Además, mejoran la función neuronal y estimulan el flujo sanguíneo cerebral y la neurogénesis (Spencer, 2010). Estudios anteriores del grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente tesis doctoral han mostrado que varios polifenoles pueden mejorar el deterioro cognitivo y motor en ratas de edad avanzada. Así, se ha comprobado como la administración del antioxidante resveratrol en ratas viejas es capaz de retrasar o prevenir los déficits en los niveles de las monoaminas cerebrales que se producen durante el envejecimiento, mejorándose también las habilidades cognitivas y motoras (Sarubbo et al., 2015). Los polifenoles silimarina, quercetina y naringenina también presentan efectos beneficiosos sobre las habilidades cognitivas y motoras de animales envejecidos, recuperando los niveles de monoaminas en hipocampo y estriado. Por otra parte, también fueron capaces de activar la proteína SIRT1 en el hipocampo, disminuyendo a su vez el estado inflamatorio cerebral (Sarubbo et al., 2018).

En este trabajo se estudió el estilbeno resveratrol y el flavonoide catequina, así como el compuesto *poliphenon 60* (correspondiente a extracto de té verde, rico en flavonoides). En el caso del resveratrol se ha analizado si los efectos positivos observados en animales de edad avanzada también se presentan en animales adultos, comparándose a su vez con la restricción

calórica. En los flavonoides se ha analizado su capacidad para paliar el deterioro cognitivo y motor en animales de edad avanzada.

A) Resveratrol

El resveratrol (3,4',5-trihydroxyl-*trans*-stilbene; figura 7) es un polifenol producido en abundancia por plantas en respuesta al estrés ambiental (Frémont, 2000; Lamming et al., 2004; Pallàs et al., 2013), presentando propiedades antifúngicas (Hain et al., 1990; Langcake y Pryce, 1977). El resveratrol existe en dos isómeros: *trans* y *cis*-resveratrol, los cuales pueden tener diferentes efectos biológicos. Se ha descrito que el isómero *trans*-resveratrol no es tóxico y es el más ampliamente estudiado (Pallàs et al., 2013; Zhao et al., 2013).

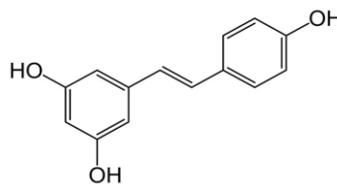


Figura 7. Estructura química del compuesto *trans*-resveratrol.

El resveratrol se encuentra en las uvas, frambuesas, arándanos, cacahuets, pistachos y plantas medicinales como *Polygonum cuspidatum* (Allard et al., 2009; Baur y Sinclair, 2006). La fuente dietética más importante del resveratrol es el vino tinto, postulándose a menudo como un factor importante en la paradoja francesa, acuñada para describir la observación de que la población francesa tiene una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares, a pesar de consumir una dieta alta en grasas insaturadas (Liu et al., 2007; Renaud y de Lorgeril, 1992); en este sentido, estudios epidemiológicos mostraron una correlación inversa entre el consumo de vino tinto y la incidencia de enfermedades cardiovasculares. El resveratrol también ha recibido un gran interés por sus efectos protectores observados en una variedad de patologías (Robb et al., 2008; Smoliga et al., 2013). Se ha demostrado que este compuesto natural tiene una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica, antiinflamatoria, vasorrelajante, antiplaquetaria, anticancerígena, antimutágena y cardioprotectora (Allard et al., 2009; Das y Maulik, 2006; Frémont, 2000; Smoliga et al., 2013), mejorando así la salud general en mamíferos (Baur et al., 2006). Algunas de las propiedades beneficiosas atribuidas a este polifenol son debidas tanto a su capacidad antioxidante intrínseca como a su habilidad para regular la actividad y los niveles de expresión de enzimas y proteínas asociadas a señales de supervivencia, de regulación de los canales iónicos y a la actividad de acciones antioxidantes (Baur y Sinclair, 2006; Halliwell, 2007; Kwon et al., 2010). Por lo tanto, las acciones beneficiosas del resveratrol pueden ser el resultado de la activación de una cascada de eventos intracelulares que conducen a una regulación al alza de los sistemas de defensa celular, los cuales a su vez protegen contra la muerte mediada por estrés oxidativo (Pallàs et al.,

2013; Robb et al., 2008). Asimismo, se ha demostrado previamente que el resveratrol prolonga la vida útil en un porcentaje superior al 60% en *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila* mediante la estimulación de sirtuínas (Howitz et al., 2003; Valenzano y Cellerino, 2006; Wood et al., 2004), activando las mismas vías que la restricción calórica. A pesar de ello, existe una disparidad en los efectos reportados por el resveratrol, especialmente en organismos superiores (Hector et al., 2012), y su capacidad para extender la vida útil.

Varias investigaciones han documentado que este compuesto ejerce efectos beneficiosos sobre la salud, incluyendo acciones neuroprotectoras contra una gran variedad de enfermedades (Ingram y Roth, 2015). Por ejemplo, la suplementación con un análogo del resveratrol incrementó la memoria de trabajo espacial en ratas viejas (Joseph et al., 2008). El resveratrol también mejoró las habilidades de memoria espacial probadas en un laberinto similar al test de *Barnes* en primates no humanos (Dal-Pan et al., 2011). En humanos de edad avanzada, el resveratrol ha demostrado ser eficaz para mejorar el rendimiento de la memoria (Witte et al., 2014). Aunque se ha indicado que el resveratrol presentaría una habilidad neuroprotectora por su efecto antioxidante, varios estudios mostraron que también puede deberse a un efecto indirecto a través de la activación de las vías de sirtuínas (Raval et al., 2006, 2008). Así se ha descrito que el resveratrol ejerce efectos dependientes de SIRT1, consiguiendo una mejor función celular y un mejor estado de salud (Frescas et al., 2005; Kolthur-Seetharam et al., 2006; Picard et al., 2004). Los efectos positivos del resveratrol a través de SIRT1 pueden ser importantes para mitigar la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas (Rocha-González et al., 2008). Además, se ha observado que el resveratrol también puede ejercer sus efectos modulando otras dianas celulares (tales como ciclooxigenasas, lipooxigenasas, quinasas y ribonucleótido reductasas) (Pacholec et al., 2010; Pirola y Fröjdö, 2008; Tang, 2010), pudiendo funcionar en paralelo a SIRT1 (Allard et al., 2009). Algunos estudios han sugerido que diferentes dosis pueden provocar distintos efectos biológicos: dosis más bajas activarían vías dependientes de SIRT1, mientras que dosis más altas actuarían mediante un mecanismo independiente de SIRT1 (Price et al., 2012).

B) Catequina y Poliphenon 60 (extracto de té verde)

Los flavonoides se encuentran principalmente en las frutas, verduras, cereales y algunas bebidas (como vino, té, cacao y jugos de frutas). Estos compuestos pueden ejercer acciones particularmente poderosas en la cognición de los mamíferos y pueden revertir los deterioros en la memoria y aprendizaje relacionados con la edad (Spencer, 2010). Las acciones biológicas de los flavonoides inicialmente se atribuyeron a su capacidad antioxidante (Rice-Evans et al., 1996), al eliminar especies reactivas o influir en el estado redox intracelular (Pollard et al., 2006). Sin embargo, esta propiedad solamente podría explicar parte de la bioactividad de los

flavonoides *in vivo*, particularmente en el cerebro donde se encuentran en concentraciones muy bajas; es por ello que estos compuestos también podrían ejercer sus acciones activando otras vías celulares (Spencer, 2008a). Cabe destacar que los flavonoides presentan mecanismos neuroprotectores gracias a su capacidad para interactuar con las vías de señalización neuronales (Schroeter et al., 2001; Smith et al., 2002) y su potencial para inhibir los procesos neuroinflamatorios en el cerebro (Chen et al., 2005; Kim et al., 2001). Se ha postulado que los flavonoides presentan la capacidad de proteger a las neuronas, mejorar la función neuronal existente, estimular el flujo sanguíneo cerebral e inducir la neurogénesis (Spencer, 2008b). Varios estudios han mostrado que los flavonoides y sus metabolitos fisiológicos son capaces de inducir vías de señalización neuronales y gliales cruciales para inducir la plasticidad sináptica (Spencer, 2009; Vauzour et al., 2008; Williams et al., 2004), incluso a bajas concentraciones nanomolares (Vauzour et al., 2007) similares a las reportadas en el cerebro.

Dentro de los flavonoides, el subgrupo de los flavanoles contiene compuestos tanto en forma de monómero (catequinas) como en forma de polímero (proantocianidinas). Los flavanoles dietéticos típicos incluyen los compuestos catequina, epicatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina y galato de epigalocatequina (figura 8) (Manach et al., 2004; Vauzour et al., 2008).

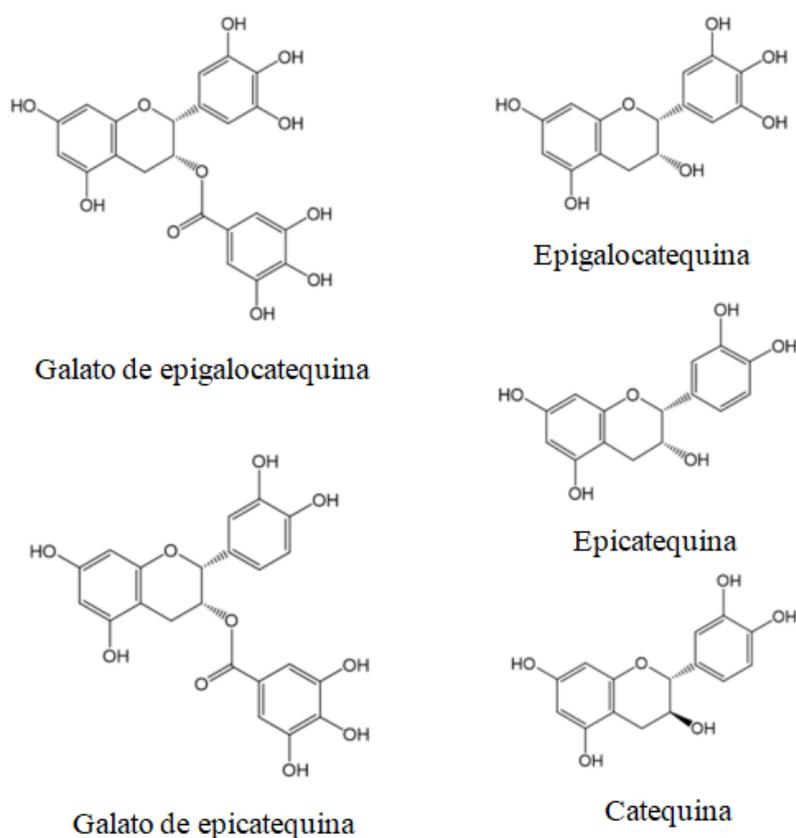


Figura 8. Estructuras químicas de los principales flavanoles (modificado de Ide et al., 2018).

Los flavanoles se encuentran en muchos tipos de frutas; por ejemplo, en los albaricoques, las manzanas y las uvas. También están presentes en el vino tinto, aunque el té verde y el chocolate son las fuentes más ricas. Cada 100 mL de té verde contiene 126 mg de flavanoles, de los cuales 71 mg se corresponderían a galato de epigallocatequina (representando entre el 50 y el 80% del total de los flavanoles del té verde) (Lakenbrink et al., 2000; Rietveld y Wiseman, 2003). El té negro contiene menos flavanoles monoméricos ya que durante la "fermentación" de las hojas de té pasan a polifenoles condensados más complejos, conocidos como teaflavinas (dímeros) y tearubiginas (polímeros). La catequina y la epicatequina son los principales flavanoles en la fruta, mientras que el galato de epicatequina, la epigallocatequina y el galato de epigallocatequina se encuentran en ciertas semillas de plantas leguminosas, en las uvas y, principalmente, en el té (Arts et al., 2000a, b). Las epicatequinas del té son notablemente estables cuando se exponen al calor siempre que el pH sea ácido (solo el 15% de estas sustancias se degradan después de 7 h en agua hirviendo a pH 5) (Zhu et al., 1997). El té (obtenido principalmente de la planta *Camellia sinensis*) es una de las bebidas más populares consumidas por los humanos en el mundo, principalmente el té negro y el té verde. Diversos estudios han sugerido que el consumo de té tiene efectos beneficios para la salud (Peng et al., 2014; Prasanth et al., 2019). Beber té verde o té negro podría conllevar un aumento significativo en el potencial antioxidante plasmático (Leenen et al., 2000) y podría reducir significativamente la oxidación del ADN y la peroxidación de lípidos (Meng et al., 2001; Rietveld y Wiseman, 2003). También se ha descrito que el té podría tener capacidad antienvjecimiento, prolongando la vida útil de *Drosophila* en un 10-16%. Esta capacidad antienvjecimiento se acompañó por una mayor expresión de las enzimas antioxidantes endógenas superóxido dismutasa y catalasa (Li et al., 2007, 2008; Peng et al., 2009; Prasanth et al., 2019). Los estudios en *C. elegans* también mostraron resultados similares, lo que indicaría que los componentes del té conseguirían una vida útil significativamente más larga (Abbas y Wink, 2009; Zhang et al., 2009b). En ratones, consumir polifenoles del té, desde los 13 meses hasta la muerte, también aumentó la vida útil en más de un 6% (Kitani et al., 2007). Además, estos compuestos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer sus efectos en el SNC (Faria et al., 2011; Nakagawa y Miyazawa, 1997; Wu et al., 2012). Haque et al. (2008) mostró que la administración de extracto de té verde a largo plazo redujo considerablemente los niveles de ROS y protegió del deterioro cognitivo inducido por la proteína β amiloide en ratas. De modo semejante, la administración de extractos de té verde en animales de edad avanzada produjo una mejora significativa del aprendizaje y el rendimiento de la memoria (Kaur et al., 2008). Todos estos estudios pueden sugerir que los flavanoles del té reducen el estrés oxidativo en el tejido periférico y cerebral, disminuyendo también los déficits cognitivos (Ide et al., 2018) asociados a la edad y a diversas enfermedades (como el Alzheimer). Estos compuestos, además de su capacidad intrínseca como antioxidantes, pueden ejercer su función a través de otras vías. Por ejemplo, se ha descrito que los flavanoles

poseen propiedades antiinflamatorias, reduciendo el daño neuronal debido a los elementos proinflamatorios, y también la habilidad de interactuar con la proteína quinasa C y con la enzima acetilcolinesterasa (Ide et al., 2018; Kaur et al., 2008; Levites et al., 2003; Prasanth et al., 2019). En este sentido, varios estudios han sugerido que el té posee habilidades antiinflamatorias (Fu et al., 2018; Pervin et al., 2018, 2019; Rothenberg y Zhang, 2019). Así, el polifenol galato de epigalocatequina (EGCC) presenta efectos neuroprotectores gracias a su capacidad antiinflamatoria, reduciendo también los niveles de las citoquinas proinflamatorias (Pervin et al., 2018; Xu et al., 2017). Las teaflavinas del té negro y el EGCG han mostrado ser potentes agentes antiinflamatorios a través de la regulación negativa de la vía de señalización de NF- κ B y la reducción del estrés oxidativo (Cai et al., 2007; Fu et al., 2018; Rothenberg y Zhang, 2019). Asimismo, los metabolitos de las catequinas del té también poseerían varias actividades biológicas, incluyendo efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Pervin et al., 2019).

1.2.2 Prevención del envejecimiento cerebral mediante ejercicio físico

La inactividad física es un factor de riesgo importante para el deterioro cognitivo en el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Norton et al., 2014). Por el contrario, el ejercicio puede transmitir un efecto protector (Ahlskog et al., 2011; Ngandu et al., 2015; Prakash et al., 2015), incluso si se inicia después de la mediana edad (Tolppanen et al., 2015). Se ha descrito también que la actividad física regular aumenta la longevidad y disminuye la incidencia de varias enfermedades (Hollozy y Kohrt, 1995). Numerosos estudios han indicado que el ejercicio puede mejorar la función cerebral y prevenir el deterioro cognitivo asociado a la edad (Bronner et al., 1995; Johnson y McKnight, 1989; Mattson, 2000, 2012; Oliff et al., 1998; Radák et al., 2013). Además, el ejercicio puede estimular la neurogénesis (Johnson y McKnight, 1989; Oliff et al., 1998), así como mejorar el aprendizaje y la plasticidad cerebral (Cotman y Engesser-Cesar, 2002). No obstante, sigue sin estar claro si el ejercicio disminuye la trayectoria del envejecimiento normal modificando los factores de riesgo vascular y metabólico y/o aumenta sistemáticamente la función cerebral al inducir cambios estructurales y neuroquímicos en el hipocampo y otras áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria (Duzel et al., 2016). Estudios anteriores han sugerido que el ejercicio mejora las capacidades funcionales del cerebro, actuando sobre las sinapsis y células madre neurales; sin embargo, los cambios moleculares y estructurales que ocurren en las sinapsis en respuesta al ejercicio, así como sus consecuencias funcionales, todavía se están dilucidando (Mattson, 2012). En un estudio en ratas que tenían acceso libre a una rueda giratoria, estos animales mostraron una mayor potenciación a corto plazo y a largo plazo hipocampal en comparación con los controles (Farmer et al., 2004). Correr también incrementó la complejidad dendrítica y el

número de espinas dendríticas en varias regiones cerebrales, incluyendo el giro dentado (Eadie et al., 2005; Siette et al., 2013; Stranahan et al., 2007). Asimismo, el registro extracelular de las neuronas del hipocampo CA1 reveló que la potenciación a largo plazo está alterada en ratas sedentarias privadas de sueño, mientras que es normal en las ratas privadas de sueño que hacen ejercicio (Zagaar et al., 2012).

Por otra parte, el ejercicio aeróbico es capaz de aumentar la angiogénesis tanto en roedores como en humanos, lo cual puede relacionarse con una mejora de la perfusión en el hipocampo (Pereira et al., 2007). En este sentido, varios estudios en animales adultos sugieren que la angiogénesis está estrechamente relacionada con la neurogénesis (Louissaint et al., 2002; Palmer et al., 2000; Pereira et al., 2007). La neurogénesis del hipocampo en adultos se correlaciona positivamente con una mayor plasticidad sináptica y memoria espacial en animales adultos. Así, el ejercicio puede revertir la disminución de la neurogénesis y la función de la memoria en roedores viejos (Marlatt et al., 2010; Opendak y Gould, 2015; Van Praag, 2008; Vivar et al., 2013) y estimularía la neurogénesis en el hipocampo de roedores adultos (Cotman y Engesser-Cesar, 2002; Ma, 2008; Oliff et al., 1998; Van Praag et al., 1999). En relación a este punto, la actividad física mejoraría la neurogénesis a través de mecanismos que involucran la regulación al alza de la expresión de factores tróficos (tales como BDNF, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 o el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares) (Mattson, 2012; Oliff et al., 1998; Radák et al., 2013; Ryan y Nolan, 2016; Trejo et al., 2008). Se ha propuesto también que un déficit en la neurogénesis en adultos puede resultar, o estar involucrado de alguna manera, en el trastorno depresivo mayor, por lo que varios estudios han sugerido que el ejercicio presentaría propiedades antidepressivas (Ernst et al., 2006; Ota y Duman, 2013). Además, la actividad física parece elevar los niveles de TPH en los núcleos del rafe (Lim et al., 2001; Min et al., 2003) y del triptófano en el hipocampo (Chaouloff et al., 1989), lo que podría aumentar tanto la producción de 5-HT como la neurogénesis (Ernst et al., 2006).

El ejercicio ha sido asociado también con beneficios sobre el estado inflamatorio (Ryan y Nolan, 2016). Un elemento común que subyace a los efectos centrales y periféricos del ejercicio podría estar relacionado con la inflamación, activando varias cascadas celulares que conlleven la mejora de la función cerebral (Cotman et al., 2007), aunque los mecanismos a través de los cuales se produce esta mejora no han sido definidos. De este modo, se ha observado que la actividad física es capaz de producir interacciones en vías antiinflamatorias y neuroprotectoras hipocampales (Ryan y Nolan, 2016), tales como la disminución de la expresión de la citoquina proinflamatoria interleuquina 1 beta (Speisman et al., 2013). Del mismo modo, el ejercicio protegería contra las lesiones neurológicas mediante la estimulación del eje anti-inflamatorio HSP70/NF- κ B/IL-6/sinapsina I (Chio et al., 2017). Se ha descrito también que el ejercicio es

capaz de interactuar con factores de transcripción sensibles al estado redox, principalmente NF- κ B y PGC-1 α , lo que lleva a la reparación de los mecanismos de defensa antioxidante al mejorar la expresión y las actividades de superóxido dismutasa y catalasa en varios tejidos como el cerebro y el músculo esquelético (Sallam y Laher, 2016), modificando el estado antioxidante y redox del cerebro (Somani et al., 1995, 1996). Se ha sugerido que diversas mioquinas pueden estar involucradas en la mediación de los efectos beneficiosos para la salud del ejercicio, en particular estarían involucradas en la protección contra las enfermedades crónicas asociadas con la inflamación (Petersen y Pedersen, 1985). Por ejemplo, se ha indicado que la actividad física puede proteger contra la inflamación a través de la regulación de la señalización de la vía JNK/NF- κ B en animales con osteoartritis (Chen et al., 2019).

La alimentación y el ejercicio son aspectos complementarios de la regulación del equilibrio energético que han influido en la evolución del cerebro moderno durante miles de años (Gomez-Pinilla y Tyagi, 2013). El consumo de alimentos y la actividad física estimulan los procesos metabólicos presentes en las mitocondrias y la provisión energética en el cerebro, lo cual puede conllevar la modulación de varias vías de señalización y moléculas vinculadas a la función neuronal y a la plasticidad sináptica. Es por ello que esta relación entre la actividad metabólica y la función neuronal sugiere que nuestros hábitos dietéticos y de ejercicio pueden influir en los mecanismos moleculares que definen nuestras habilidades cognitivas (Gomez-Pinilla y Nguyen, 2012). Además del papel de BDNF en la plasticidad cerebral, este factor también se ha relacionado con el metabolismo energético cerebral, tal y como se evidencia en algunos estudios en los que la alteración de la vía de señalización de BDNF se correlaciona con desórdenes metabólicos (Rothman et al., 2012); así, BDNF podría jugar un papel clave en el metabolismo energético cerebral y la plasticidad, sugiriendo una importante relación entre dieta, ejercicio y función cerebral (Gomez-Pinilla y Nguyen, 2012; Rothman et al., 2012). De este modo, el ejercicio y su combinación con la dieta también podrían actuar sobre varias rutas moleculares relacionadas con la plasticidad y el metabolismo cerebral. Asimismo, es posible que el ejercicio pueda potenciar los efectos beneficiosos de los componentes de una dieta saludable y viceversa, tanto a nivel celular como a nivel molecular (Murphy et al., 2014). Por ejemplo, se ha demostrado que el ejercicio trabaja en tándem con una dieta enriquecida en el ácido docosahexaenoico, incrementando la función cognitiva (Chytrova et al., 2010). En particular, el ejercicio podría actuar sobre los mecanismos que preservan el ácido docosahexaenoico en la membrana plasmática y aumentar su neurotransmisión (Gomez-Pinilla, 2011). Además, los efectos de la dieta enriquecida en ácido docosahexaenoico y el ejercicio podrían estar mediados por la acción de BDNF sobre la plasticidad sináptica (Wu et al., 2008). En otro estudio, la combinación de una dieta enriquecida en ácido docosahexaenoico y el ejercicio voluntario restauró la homeostasis de las membranas para contrarrestar los efectos adversos producidos en

un daño cerebral traumático, mejorando la plasticidad sináptica y la cognición (Wu et al., 2013). De forma similar, la combinación del ejercicio con una dieta enriquecida en flavonoides promovió la expresión de genes asociados a la plasticidad cerebral, mientras que disminuyó la expresión de genes que comprometían dicha plasticidad, incluyendo aquellos relacionados con la inflamación y la muerte celular (Van Praag et al., 2007). Asimismo, el flavanol epicatequina podría incrementar los efectos del ejercicio en la memoria espacial de ratones jóvenes (Van Praag, 2009). Es por ello que la aplicación de programas de forma conjunta, como son programas de ejercicio y tratamientos con antioxidantes, podría mejorar la función sináptica y mejorar las habilidades cognitivas en animales de edad avanzada.

1.2.3 Prevención del envejecimiento cerebral mediante enriquecimiento ambiental

Cada día se hace más patente la importancia que el entorno ejerce sobre la vida de un individuo. Durante el envejecimiento, el cerebro modifica su estructura y función, cambios que pueden estar modulados por la interacción de los sujetos con su entorno (Leggio et al., 2005; Mohammed et al., 2002; Mora et al., 2007). Así, se ha descrito que las condiciones ambientales juegan un papel clave en el proceso del envejecimiento cerebral y en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Nithianantharajah y Hannan, 2009; Van Praag et al., 2000).

En la experimentación animal, el enriquecimiento ambiental (EA) se refiere a un entorno con unas condiciones en las que los animales experimentan interacciones cognitivas y sociales mejoradas, así como incrementos de las estimulaciones sensoriales y motoras, potenciando el aprendizaje y la memoria (Mora et al., 2007). El concepto de plasticidad cerebral (Diamond, 1988; Greenwood y Parasaman, 2010; Pascual-Leone et al., 2011; Rosenzweig et al., 1962) apoya la idea de que nuestro entorno puede contribuir a dar forma a la estructura y funciones del cerebro (Cassarino y Setti, 2015). De hecho, los resultados en modelos animales muestran que los ambientes enriquecidos y estimulantes producen cambios plásticos en el cerebro (Leggio et al., 2005; Nithianantharajah y Hannan, 2006), tanto en animales jóvenes como mayores (Mora, 2013). Los estudios con animales también indican que los entornos enriquecidos pueden desencadenar cambios morfológicos en el cerebro a través de la estimulación sensorial tanto en los jóvenes como en los de edad avanzada (Baroncelli et al., 2012; Engineer et al., 2004; Landers et al., 2011; Nithianantharajah y Hannan, 2009). Estas investigaciones están en línea con el concepto de reserva cognitiva, el cual capta la idea de que la estimulación ambiental puede aumentar la resiliencia al envejecimiento cognitivo (Cassarino y Setti, 2015; Steffener et al., 2014; Stern, 2002, 2009; Tucker y Stern, 2014).

Varios estudios han mostrado como la experiencia y el EA pueden modificar la estructura (Globus et al., 1973; Greenough y Volkman, 1973; Mohammed et al., 2002), el crecimiento (Hubel y Wiesel, 1977; Kempermann et al., 1997; Stryker y Harris, 1986) y la eficacia

fisiológica (Green y Greenough, 1986; Wiesel y Hubel, 1963) de las neuronas de mamíferos y sus conexiones sinápticas. Así, el EA puede mejorar el aprendizaje y la memoria en roedores (Escorihuela et al., 1995b; Kempermann et al., 1997; Rampon et al., 2000; Rosenzweig y Bennett, 1996). Igualmente, los animales y los seres humanos expuestos a una estimulación ambiental más rica presentan menos signos de degeneración cerebral (Hannan, 2014; Herring et al., 2009; Landau et al., 2012; Robertson, 2013, 2014) y desempeñan mejor las tareas cognitivas que los que no están expuestos a ambientes enriquecidos (Bennett et al., 2006; Berardi et al., 2007; Harati et al., 2011; Jankowsky et al., 2005; Robertson, 2013; Valenzuela y Sachdev, 2009). La mejora en la memoria inducida por EA ha sido asociada a posibles cambios en la señalización intracelular y a la conectividad sináptica modificada (Duffy et al., 2001; Elgersma y Silva, 1999; Escorihuela et al., 1995a; Martin et al., 2000b; Micheau y Riedel, 1999; Paylor et al., 1992). En este sentido, estudios neuroquímicos han mostrado cambios en diferentes sistemas de neurotransmisores en los animales mantenidos en condiciones de EA (Mora et al., 2007). Los animales que viven en ambientes enriquecidos también muestran una mayor expresión de determinados genes relacionados con la plasticidad, tales como el factor de crecimiento nervioso, el factor neurotrófico derivado de la glía y el BDNF en varias áreas del cerebro (Mohammed et al., 2002; Pham et al., 2002; Rossi et al., 2006; Van Praag et al., 2000; Zhu et al., 2006). En particular, BDNF parece ser necesario para la mejora en el aprendizaje y la neurogénesis producida en el hipocampo de animales que viven en estos entornos enriquecidos (Rossi et al., 2006). Varios estudios experimentales han demostrado que EA atenúa los cambios relacionados con la edad en el grosor cortical, la ramificación dendrítica, la densidad de la columna vertebral, la neurogénesis y la gliogénesis (Kempermann et al., 2002; Kolb et al., 2003; Mora et al., 2007; Segovia et al., 2006). Del mismo modo, los animales que viven en estas condiciones presentan una modificación en las respuestas de varios neurotransmisores al estrés, una mayor neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, con un aumento de peso y tamaño del cerebro y una mayor gliogénesis. Se han descrito también mejoras en las ramificaciones dendríticas y sinaptogénesis en varias áreas cerebrales (Leggio et al., 2005; Llorens-Martin et al., 2010; Mora et al., 2007; Segovia et al., 2008, 2009; Van Praag et al., 2000). Todos estos resultados sugieren que el EA es capaz de modificar la anatomía y la fisiología del cerebro envejecido, afectando a su plasticidad (Mora, 2013). Por otra parte, se ha observado que los animales mantenidos en condiciones de enriquecimiento presentan una mejor función del sistema inmune (Arranz et al., 2010). El EA también ha sido asociado con beneficios sobre el estado inflamatorio, lo cual a su vez podría relacionarse con el rendimiento mejorado en las pruebas de comportamiento (Briones et al., 2013). Así, investigaciones previas han mostrado como el EA reduce las citoquinas proinflamatorias y aumenta las antiinflamatorias en la corteza, disminuyendo además la respuesta inflamatoria periférica (Silva et al., 2020). Igualmente, se demostró que el EA redujo la neuroinflamación del hipocampo y mejoró el rendimiento

cognitivo en ratones infectados con el virus de la gripe (Jurgens y Johnson, 2012). El EA redujo la neuroinflamación de la corteza tras una lesión cerebral traumática leve, mejorando así la función cognitiva (Briones et al., 2013). En relación a este punto, se ha descrito que el EA puede promover la neurogénesis y plasticidad a través de NF- κ B/p65 (Neidl et al., 2016; Zhang et al., 2018). Por todo ello, el EA podría ejercer efectos beneficiosos en la recuperación tras lesiones cerebrales, como procesos isquémicos o de infarto en la corteza prefrontal (Kolb y Whishaw, 1998; Turner et al., 2002). Otras investigaciones también sugieren la efectividad del EA para disminuir algunas de las alteraciones producidas en varias patologías como la enfermedad de Parkinson o el Alzheimer (Nithianantharajah y Hannan, 2006, 2009) y en procesos tan complejos como la adicción a drogas (Bardo et al., 2001; Green et al., 2003; Solinas et al., 2009).

En la presente investigación se pretende analizar el efecto de un enriquecimiento ambiental a largo plazo, así como su comparación con el efecto de un estilo de vida contrario como sería la aplicación de estrés crónico moderado impredecible a largo plazo. Los humanos vivimos en sociedades en las que constantemente se experimentan diversas formas de estrés. Existe una respuesta orgánica permanente a este estrés social crónico, con implicaciones para el cerebro y, en particular, para el cerebro durante el proceso de envejecimiento (Dias-Ferreira et al., 2009; Mora, 2011). Las condiciones ambientales en las que se desarrollan los organismos vivos también podrían determinar una mayor o menor vulnerabilidad a los efectos producidos por el estrés.

El estrés se define como una situación en la que la homeostasis del individuo está amenazada, potencial o realmente (McEwen, 2000; Mora et al., 2012; Selye, 1976). La información relacionada con el estrés proveniente de todos los sistemas sensoriales principales (por ejemplo, señales interoceptivas como el volumen de sangre y la osmolaridad, y/ o señales exteroceptivas como el olor de un depredador) se transmite al cerebro, que recluta sistemas neurales y neuroendocrinos (efectores) para minimizar el costo neto para el animal. La respuesta fisiológica al estrés implica un conjunto eficiente y altamente conservado de sistemas de interbloqueo que tiene como objetivo mantener la integridad fisiológica, incluso en las circunstancias más exigentes (Ulrich-Lai y Herman, 2009). Además, las regiones límbicas responsables de regular las respuestas al estrés se entrecruzarían con los circuitos que son responsables de la memoria y la recompensa, lo que proporciona un medio para adaptar la respuesta al estrés con respecto a la experiencia anterior y los resultados anticipados (Ulrich-Lai y Herman, 2009). Durante el proceso de estrés se desencadena la activación de varios mecanismos que producen la liberación de diversas hormonas y neuromoduladores, tanto en el cerebro como en otros órganos y glándulas del organismo, para poder restablecer la homeostasis (Mora, 2013; Mora et al., 2012). Asimismo, el estrés crónico puede reclutar vías distintas de las

implicadas en las respuestas agudas (Ulrich-Lai y Herman, 2009). A parte de la activación del sistema nervioso simpático (como fase inicial) y la liberación de adrenalina y noradrenalina por la corteza suprarrenal, el mecanismo más estudiado es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, que, en último término, produce la liberación de glucocorticoides (Mora, 2013; Mora et al., 2012). Dichos glucocorticoides (incluyendo la corticosterona liberada en los roedores y el cortisol en el humano y la mayoría de mamíferos) ejercen una acción sistémica para aportar energía al organismo (Sapolsky et al., 2000) y son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica distribuyéndose en diferentes áreas del cerebro (incluida la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo) (de Kloet, 2000; McEwen et al., 1968). Los efectos fundamentales de los glucocorticoides a nivel cerebral son: aportar energía a las neuronas, modular los procesos de memoria (favoreciéndolos o inhibiéndolos) y regular el propio eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Garrido, 2011; Sapolsky et al., 2000). Asimismo, estos compuestos interactúan con las neuronas y los astrocitos en áreas específicas donde son capaces de producir cambios, tanto a nivel funcional de los neurotransmisores como a nivel anatómico (Abbot, 2004; Garrido et al., 2012; McEwen, 2010). De especial relevancia para el envejecimiento cerebral son los efectos mediados por los glucocorticoides en el hipocampo (Hibberd et al., 2000; Mora et al., 2012), donde parecen ser neurotóxicos, afectando al balance energético neuronal y a los sustratos neuronales para el aprendizaje y la memoria (Hibberd et al., 2000; Sapolski et al., 1986). Por otra parte, numerosos estudios relacionan el hipocampo con la inhibición del eje hipotálamo-pituitaria-adrenocortical (Herman et al., 2003; Jacobson y Sapolsky, 1991). Así, la estimulación del hipocampo disminuiría la secreción de glucocorticoides en ratas y humanos (Dunn y Orr, 1984; Rubin et al., 1966), mientras que el daño del hipocampo aumenta el estrés inducido y, en algunos casos, la secreción basal de glucocorticoides (Herman et al., 2003; Jacobson y Sapolsky, 1991). Además, un aumento permanente de los niveles "basales" de glucocorticoides, resultado de un estilo de vida estresante, también podría contribuir al daño neuronal que se produce en varias áreas cerebrales durante el envejecimiento (Garrido et al., 2012; Mora, 2013; Mora et al., 2012). Sin embargo, el enriquecimiento ambiental sería efectivo para atenuar los aumentos de los glucocorticoides producidos por el estrés agudo en la corteza prefrontal de ratas adultas (Mora et al., 2007, 2012). Asimismo, el EA podría ayudar a mantener la plasticidad neuronal durante el envejecimiento y proteger el cerebro contra los efectos dañinos de la exposición al estrés (Garrido, 2011). Por otra parte, el estrés y los estados depresivos han sido asociados con incrementos del estado inflamatorio (Adler et al., 2008; Fu et al., 2019; Gao et al., 2018; Guo et al., 2019; Li et al., 2017; Liu et al., 2018; Lu et al., 2019; Mikova et al., 2001). Por ejemplo, se han descrito incrementos de citoquinas proinflamatorias en el hipocampo (Guo et al., 2019; Liu et al., 2018), así como la activación de la vía de NF- κ B (Fu et al., 2019; Li et al., 2017; Liu et al., 2018; Liu et al., 2019a; Wang et al., 2018; Zhu et al., 2018).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años, el aumento de la esperanza de vida de la población ha desencadenado un incremento de la proporción de la población de edad avanzada y un mayor número de personas que padecen un deterioro cognitivo y/o motor, así como otras enfermedades asociadas a la edad. Este hecho, a su vez, afecta a la calidad de vida de las personas de edad avanzada de nuestra sociedad, cobrando relevancia los estudios sobre el envejecimiento, especialmente los relacionados con el envejecimiento cerebral.

Durante el proceso del envejecimiento se producen modificaciones en distintos niveles del organismo, tanto a nivel molecular como a nivel estructural y funcional. Todos estos cambios conllevan la pérdida de funciones cognitivas, motoras y sensoriales. Entre estas modificaciones se encuentran alteraciones en los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos cerebrales y modificaciones en las vías antiinflamatorias, así como cambios en las estructuras neuronales. Numerosas teorías han intentado explicar el proceso de envejecimiento. Entre ellas podemos encontrar la teoría del estrés oxidativo o de los radicales libres del envejecimiento, la cual indica que el envejecimiento es el resultado del fallo de varios mecanismos protectores para contrarrestar el daño oxidativo producido por ROS. En relación a ello, varios estudios han mostrado que el uso de antioxidantes puede ayudar a mejorar las funciones cognitivas y motoras deterioradas con la edad. Por otra parte, se ha descrito que las condiciones ambientales y los estilos de vida pueden jugar un papel clave en el retraso de los efectos adversos asociados al envejecimiento, ya que pueden producir una serie de cambios en la plasticidad neuronal que a su vez afectan a la estructura y función del sistema nervioso. Por ejemplo, se ha descrito que el enriquecimiento ambiental (mediante la estimulación social, sensorial y motora) puede inducir cambios morfológicos en el sistema nervioso (como es un mayor volumen cerebral), además de promover la neurogénesis y la supervivencia neuronal, mejorando las habilidades cognitivas y motoras. Por contra, el estrés afectaría negativamente a dichas habilidades.

En este trabajo nos hemos planteado la **hipótesis** de que tratamientos con antioxidantes presentes en la dieta (tales como el tocoferol o los polifenoles), así como el enriquecimiento ambiental y el ejercicio, podrían ejercer un efecto protector a nivel cerebral, retrasando o paliando algunos de los cambios que se producen durante el envejecimiento, especialmente a nivel cognitivo y motor. A diferencia, el estrés crónico podría producir una aceleración del deterioro cognitivo.

Así, el **objetivo general** de este trabajo fue analizar los efectos del envejecimiento a nivel cerebral en ratas, y la posible reversión por estrategias que puedan ejercer efectos neuroprotectores sobre algunas de las modificaciones cerebrales producidas con la edad y los mecanismos implicados.

Los **objetivos específicos** planteados en la presente investigación fueron:

1. Estudiar *in vivo* el efecto del envejecimiento y su posible reversión por diferentes tratamientos crónicos sobre las capacidades cognitivas (mediante el análisis de la memoria de trabajo espacial y episódica, así como el aprendizaje visoespacial) y la coordinación motora en ratas viejas.
 - 1.1. Análisis del efecto del tratamiento a largo plazo con el compuesto polifenólico resveratrol en animales adultos y su comparación con la aplicación de un tratamiento basado en la restricción calórica.
 - 1.2. Análisis del efecto de los tratamientos crónicos con los antioxidantes α -tocoferol, catequina y *poliphenon 60* en animales de edad avanzada, así como la administración crónica de una dieta rica en antioxidantes.
 - 1.3. Análisis del efecto del ejercicio físico en animales de edad avanzada, así como la comparación de los efectos de dicho ejercicio junto a la aplicación del antioxidante catequina.
 - 1.4. Análisis del efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo (aplicado a partir de 1 mes de edad, de 7 meses y de 18.5 meses, hasta los 20 meses), así como el efecto combinado con una dieta rica en antioxidantes.
 - 1.5. Análisis de los efectos producidos por la aplicación del estrés crónico moderado impredecible (desde 1 mes y 7 meses de edad, hasta los 20 meses).
2. Estudiar el efecto de los diferentes tratamientos descritos en el punto 1 sobre la síntesis y el metabolismo *in vivo* de neurotransmisores implicados en el procesamiento de las funciones cognitivas y motoras (sistemas catecolaminérgico y serotoninérgico), en regiones cerebrales implicadas en dichos procesos (hipocampo y estriado) en animales de edad avanzada.
3. Estudiar el efecto de los tratamientos aplicados sobre las proteínas SIRT1 y NF- κ B, de las cuales se han descrito numerosas funciones en el proceso de envejecimiento, así como el estudio de la proteína RbAp48 que parece jugar un papel importante en los procesos cognitivos del hipocampo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Animales de experimentación

Los animales utilizados para las investigaciones realizadas en la presente tesis doctoral han sido ratas macho albinas (*Rattus norvegicus*), libres de patógenos específicos, de las cepas *Sprague Dawley* y *Wistar* (en función del estudio y la disponibilidad ya que se han utilizado un gran número de animales de edad avanzada). Los animales procedían de Charles River (Barcelona, ES) y permanecieron en el estabulario de la Universitat de les Illes Balears (Tipo II, registro nº ES704000000540 en la *Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears*), instalación adecuada para el mantenimiento y la experimentación con animales, hasta alcanzar la edad necesaria para realizar los diferentes experimentos. El estabulario cuenta con un área de limpieza, dos áreas de cuarentena y un área destinada a la investigación, cría y estabulación con diferentes salas en función de la especie animal, separadas por sistemas de doble puerta (área contaminada y área limpia).

Las ratas se mantuvieron en jaulas translúcidas de policarbonato (medidas internas de la cubeta: 215x465x145 mm) (Panlab, Barcelona, ES), con viruta de madera como materia de nidificación (Ultrasorb, Panlab), la cual era cambiada semanalmente. Los animales tenían libre acceso al agua y recibieron una dieta estándar (Panlab, pellet tipo A04) *ad libitum*, con un contenido calórico teórico de 2900 cal/kg y la siguiente composición en bruto: proteínas 16.10%, materias grasas 3.10 %, glúcidos 60% (de los que un 45.8% es almidón), fibra 3.90%, cenizas 5.10%, vitamina A (7630 UI/kg), calcio 0.83%, potasio 0.59%, sodio 0.25%, vitamina D3 1190 UI/kg, vitamina E 15 mg/kg, sulfato cúprico pentahidratado 15 mg/kg, sulfato ferroso heptahidratado 188 mg/kg, dióxido de manganeso 38 mg/kg y óxido de zinc 30 mg/kg. Además, los animales permanecieron bajo condiciones ambientales controladas para asegurar su correcto confort: temperatura de 22±2 °C, humedad de 50-65%, y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (luz de 8:00 a 20:00 h) utilizando lámparas fluorescentes, alcanzándose los 60 lux en la jaula del animal, acorde con lo establecido en el Real Decreto 53/2013 (RD 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos; BOE Núm. 34, 8 de febrero de 2013, Sec. I).

Los procedimientos experimentales se han realizado en concordancia a la “Convención Europea para la Protección de animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos” (Directiva del Consejo Europeo de Comunidades 86/609/EEC), siendo los protocolos aprobados por el *Comitè d'ètica d'experimentació animal de la Universitat de les Illes Balears* (UIB, ES) (número de expediente de aprobación 2014/05/AEXP).

Por otra parte, se procedió también a la estandarización de las condiciones experimentales para poder equiparar los resultados obtenidos en los diferentes grupos de investigación, haciendo todo lo posible para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su posible malestar. A la hora de establecer los grupos de edad, se consideró que las ratas son jóvenes desde 1 mes hasta los 5 meses de vida. A partir de dicho mes se consideran adultas hasta los 18 meses, momento en el que pierden la capacidad reproductora y comienza la vejez. Equiparando a humanos, se considera que 1 mes de vida en una rata sería comparable a unos 3 años en humanos (Sengupta, 2011, 2013). Además, todos los animales se mantuvieron en las mismas condiciones de estabulación, a no ser que el tratamiento requiriera un cambio específico de dichas condiciones (como en los animales sometidos al programa de estrés crónico moderado impredecible). Para minimizar el estrés, todos los animales fueron manipulados los días previos a los experimentos por los investigadores que iban a llevar a cabo el estudio y se les habituó a la sala en la que se realizaron las pruebas experimentales. Asimismo, en los periodos en que los animales debían realizar test comportamentales durante los tratamientos, dichos tratamientos se aplicaban al finalizar las pruebas; de esta manera se evitaba que los resultados obtenidos pudieran deberse a un efecto agudo del fármaco. Las pruebas comportamentales se llevaron a cabo por la mañana para evitar diferencias entre los animales debido al nivel de actividad basal (alternando cada vez un animal de cada grupo experimental). Finalmente, también se analizaron varias variables fisiológicas como son el control del peso corporal y la ingesta, así como el aspecto físico de los animales (limpieza corporal y aspecto del pelo). En las diferentes estrategias aplicadas no se detectaron alteraciones en dichos parámetros en comparación a los controles, mostrando un comportamiento propio de la edad de los animales, a no ser que se indique lo contrario en el correspondiente apartado. Por otra parte, las diferentes pruebas realizadas (tanto a nivel comportamental como molecular) han sido test utilizados anteriormente por el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo esta tesis.

3.1.2 Fármacos y tratamientos

A continuación, se detallan todos los fármacos y objetos utilizados durante el desarrollo de esta investigación para los diversos tratamientos aplicados en ratas.

- Fármacos antioxidantes: se realizaron tratamientos con diversos antioxidantes presentes en la dieta mediterránea, todos ellos obtenidos en la casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Estos compuestos fueron diluidos en aceite de maíz (nº catálogo: C8267, también obtenido en la casa comercial Sigma-Aldrich). Estos antioxidantes son:

a) Trans-resveratrol (3,4',5-Trihydroxy-*trans*-stilbene,5-[(1*E*)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol; nº catálogo: R5010)

b) DL- α -tocoferol acetato (3,4- Dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-benzopyran-6-yl-acetate; n° catálogo: T3376)

c) (+)-Catequina ((+)-Cyanidol-3, (2*R*,3*S*)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2*H*)-benzopyran-3,5,7-triol; n° catálogo: C1251)

d) Poliphenon 60 (extracto de té verde; n° catálogo: P1204).

- Tratamiento con dieta rica en antioxidantes: los diferentes alimentos suministrados a los animales fueron obtenidos en diversos supermercados y en mercados locales (anexo A).

- Tratamientos con programas de enriquecimiento ambiental y estrés: en estos estudios se utilizaron diferentes objetos obtenidos en varias jugueterías y centros de bricolaje. Además, en los programas de enriquecimiento ambiental también se usaron diferentes aromas y alimentos para incentivar la exploración de los objetos, obtenidos en diversos supermercados (anexo A).

- Al finalizar todos los tratamientos cada animal recibió una dosis de NSD-1015 (3-(Hydrazinomethyl)phenol dihydrochloride, obtenido en la casa comercial Sigma-Aldrich; n° catálogo: 54880) para la determinación *in vivo* de la actividad tirosina hidroxilasa (tirosina-3-monooxigenasa, E.C. 1.14.16.2) y triptófano hidroxilasa (triptófano-monooxigenasa, E.C.1.14.16.4) cerebrales, enzimas limitantes en las vías metabólicas de la síntesis de catecolaminas y serotonina respectivamente.

3.1.3 Anticuerpos

3.1.3.1 Anticuerpos primarios

La producción de un anticuerpo primario se obtiene inoculando un antígeno determinado o uno de sus epítopos (regiones capaces de desencadenar la respuesta inmune) en un animal (huésped; normalmente conejo, cabra y ratón) o en un cultivo celular. Principalmente existen dos tipos de anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal (moléculas de anticuerpos específicas a un único epítipo, originalmente producidas por una célula B y que comparten una secuencia idéntica) y anticuerpo policlonal (moléculas de anticuerpos que difieren en las características de su epítipo y en la secuencia de aminoácidos de su región de complementariedad). En la presente investigación se han usado los siguientes anticuerpos primarios:

- El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína NF- κ B p65 total c-20 (65 kDa), el cual fue suministrado por Santa Cruz Biotechnology (n° catálogo: sc-372, lote #F0514). Este anticuerpo es apto para usarlo en técnicas de *western blot* y se conservó alicuotado a -20 °C hasta su utilización. Se usó a una dilución 1:1000 para incubar las membranas de nitrocelulosa.

- El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína RbAp48/46 (48 kDa), el cual fue suministrado por Cell Signaling (n° catálogo: 4633S, lote #0001). Este anticuerpo es apto para usarlo en técnicas de *western blot* y se conservó alicuotado a -20 °C hasta su utilización. Se usó a una dilución 1:1000 para incubar las membranas de nitrocelulosa.

- El anticuerpo policlonal (IgG de conejo) contra la proteína SIRT1 (110 kDa), el cual fue suministrado por Merk-millipore (n° catálogo: #07-131, lote #2428681). Este anticuerpo es apto para usarlo en técnicas de *western blot* y se conservó alicuotado a -20 °C hasta su utilización. Se usó a una dilución 1:1000 para incubar las membranas de nitrocelulosa.

- El anticuerpo monoclonal contra la proteína β -actina (producido en ratón, clon AC-15; 42 kDa), el cual fue suministrado por Sigma-Aldrich (n° catálogo: A1978, lote #084M4770V). Este anticuerpo es apto para usarlo en técnicas de *western blot* y se utilizó como control de carga; se conservó alicuotado a -20 °C hasta su utilización. Se usó a una dilución 1:10000 para incubar las membranas de nitrocelulosa.

3.1.3.2 Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios utilizados en este estudio estaban conjugados con peroxidasa de rábano, una enzima que, debido a su gran estabilidad, facilidad de conjugación con las inmunoglobulinas y sencillez de detección por métodos colorimétricos es ampliamente usada. En la presente investigación se han usado los siguientes anticuerpos secundarios:

- El anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de conejo y conjugado con la enzima peroxidasa de rábano, constituido por inmunoglobulinas de cabra (*goat anti-rabbit HRP-linked antibody*), el cual fue suministrado por Cell Signaling (n° catálogo: #7074, lote 0025). Fue utilizado con los anticuerpos primarios: anti-Sirt1, anti-NF- κ B p65 y anti-RbAp48/46, y conservado a 4 °C hasta su utilización. La dilución que se usó para incubar las membranas fue de 1:5000.

- El anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de ratón y conjugado con la enzima peroxidasa de rábano, constituido por inmunoglobulinas de caballo (*horse anti-mouse HRP-linked antibody*), el cual fue suministrado por Cell Signaling (n° catálogo: #7076, lote 0031). Fue utilizado con el anticuerpo primario anti- β -actina y conservado a 4 °C hasta su utilización. Se usó a una dilución de 1:5000 para incubar las membranas.

3.1.4 Reactivos

Otros compuestos utilizados en el estudio y su fuente de obtención han sido:

- Determinación cromatográfica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): acetonitrilo (Sigma-Aldrich); ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC; Sigma-Aldrich); ácido

5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA, Sigma-Aldrich); ácido homovanílico (HVA; Sigma-Aldrich); ácido perclórico 60% (HClO₄; Scharlau Chemie, Barcelona, ES); ácido octano sulfónico (C₈H₁₇NaO₃S; Sigma-Aldrich); ácido ortofosfórico 85% (PO₄H₃; Scharlau); BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol; Sigma-Aldrich); cloruro sódico (NaCl; Sigma-Aldrich); L-3,4-dihidroxifenil-alanina (L-DOPA; Sigma-Aldrich); EDTA dipotásico (K₂EDTA; Sigma-Aldrich); etanol 96% (Scharlau Chemie); fosfato monopotásico (KH₂PO₄; Sigma-Aldrich); 5-hidroxitriptófano (5-HTP; Sigma-Aldrich); 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT; Sigma-Aldrich); 3-hidroxi-tiramina (dopamina, DA; Sigma-Aldrich); metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅; Merck & Co. Inc., Whitehouse station, NJ, USA); metanol multisolvente (Scharlau Chemie); (-)-norepinefrina (NA; Sigma-Aldrich); tetrahidrofurano (Sigma-Aldrich). Otros reactivos usados para la determinación cromatográfica fueron obtenidos en la casa comercial Sigma-Aldrich.

- Detección y cuantificación de la inmunoreactividad de proteínas por *western blot*: acrilamida (30% acrilamida: 0.8% bis-acrilamida (37.5:1); Protogel, LX, UK); ácido clorhídrico (HCl; Scharlau Chemie, S.A., Barcelona); albúmina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich); azul de bromofenol (Sigma-Aldrich); cloruro sódico (NaCl; Sigma-Aldrich); dodecil sulfato sódico (SDS; Scharlau Chemie); etanol 96% (Scharlau Chemie); glicerol (Scharlau Chemie); glicina (Scharlau Chemie); inhibidor de fosfatasa (Sigma-Aldrich); inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich); kit de BCA (*Protein assay reagent - bicinchoninic acid*, Pierce Chemicals Company, Rockford, IL, USA); leche en polvo desnatada (Asturiana S.A., ES); líquido de *Laemmli* (Sigma-Aldrich); líquido fijador (Kodak, Rochester, NY, USA); líquido revelador (Kodak, USA); marcador de pesos moleculares *Prestained SDS-PAGE standard-broad-range* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA); β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich); metanol (Scharlau Chemie); ortovanadato sódico (Sigma-Aldrich); persulfato de amonio (APS; Bio-Rad Laboratories, USA); reactivo *Enhanced chemiluminescence* (ECL) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK); tetrametiletilenediamina (Temed; Fluka - Sigma-Aldrich); tris-HCl (tris-(hidroximetil)-aminometano; Scharlau Chemie); Tween-20 (Sigma-Aldrich). Otros reactivos usados para la determinación y cuantificación de la inmunoreactividad de proteínas fueron obtenidos en la casa comercial Sigma-Aldrich.

Todos los tampones y las diluciones fueron disueltos en agua de doble destilación procedente del sistema *Milli-Q synthesis A10* (Millipore S.A.S., Molsheim, FR).

3.1.5 Material de laboratorio

- Material para la realización de los tratamientos y obtención de muestras: agujas para vehículos de relativa densidad de 0.5x16 mm (25G x 5/8”; Terumo Neolus Hypodermic

Needles, Madrid, ES); jeringuillas de insulina (volumen de 1 ml; BD Plastipak, Madrid); material de disección (incluyendo pinzas, tijeras y bisturíes; Talexco S.L., Madrid, ES).

- Aparatos para la realización de las pruebas comportamentales, obtenidos de la casa comercial Panlab (Panlab, S.L., Barcelona, ES). Asimismo, se usó un sistema de vídeo (LE 8300 con software *SEDACOM v1.3*, Panlab, SL, Barcelona, ES) para grabar el recorrido que los animales realizaban en el test del laberinto radial y se analizó con el programa *Smart v2.5* (Panlab, SL, Barcelona, ES).

- Determinación cromatográfica mediante HPLC: columna en fase reversa Spherisorb S3 ODS1 C18 (3 µm de tamaño de partícula, 4.6 mm x 10 cm; Waters, Barcelona, ES); columna NovaPack (C18, 3.9x150 mm, Waters); centrífuga refrigerada (rotor 222, Biocen 22R; Ortoalresa, ES); filtro de jeringa de teflón de 0.45 µm de diámetro de poro (Millex®-LH, PTFE Hydrophilic; Millipore, Darmstadt, DE); homogenizador de aspas tipo Tp 18/10 (Ultraturrax); micropipetas de volumen variables (desde 0.5 hasta 1000 µl, Socorex Acura 825; Socorex Isba S.A., CH); precolumna Tracer ODS2 C18 (2-5 µm de tamaño de partícula; Teknokroma, Barcelona, ES); sonicador Vibra Cell 75185 130 Watt (Ultrasonic Processor). El equipo de HPLC (Waters, Barcelona, ES) formado por bomba de doble pistón (*Waters 1515 Isocratic HPLC pump*), inyector (*Waters 717 plus autosampler*), detector (*Waters 2465 electrochemical detector*) y una interfase para monitorizar la corriente producida (*Waters busSAT/IN module*) conectada a un ordenador para poder analizar los datos gracias al software *Empower Pro* (Waters).

- Detección y cuantificación de la inmunoreactividad de proteínas por *western blot*: baño termorregulador Unitronic OR (JP Selecta, Barcelona, ES); *cassette* (Hypercassette™, Amersham, GE Healthcare Life Science, Barcelona, ES); escáner-densitómetro (GS-800 calibrated densitometer; Bio-Rad) conectado a un ordenador que contiene el programa *QuantityOne* (Bio-Rad); espectrofotómetro (BioPhotometer 562 nm, Eppendorf; Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK); films autorradiográficos (18x24 cm, Hyperfilm-ECL; Amersham); homogenizador de aspas (tipo Tp 18/10; Ultraturrax); membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm de poro (Amersham); micropipetas de volumen variables (desde 0.5 hasta 1000 µl, Socorex Acura 825; Socorex Isba S.A., CH); papel *Whatman* de 3 mm de grosor (Whatman International Ltd., Maldstone, UK); pH-metro (pH-meter Basic 20, Crisom 20; Crisom Instruments S.A., Barcelona); sonicador (Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, USA). El equipo y los accesorios para la realización del *western blot* fueron adquiridos en la casa comercial Bio-Rad, entre los que se incluyen cristales para minigeles de poliacrilamida de 6x8 cm y 1 mm de grosor, peines de teflón de 1 mm de espesor y 15 pocillos y fuente de alimentación (Power Pac 200).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Tratamientos

A lo largo del desarrollo de la tesis doctoral se han realizado diferentes procedimientos, la descripción de los cuales se detalla en los siguientes subapartados. Durante todos los tratamientos los animales fueron sometidos a una serie de pruebas comportamentales relacionadas con las funciones cognitivas y motoras: el test del laberinto radial, el test del laberinto de *Barnes*, el test de reconocimiento de objeto nuevo y el test del *rotarod* (ver apartado “3.2.2 Pruebas comportamentales”). Al finalizar los tratamientos, todos los animales fueron sacrificados humanitariamente con guillotina para la obtención de muestras cerebrales para posteriores análisis bioquímicos y moleculares (ver apartado “3.2.3 Sacrificio y obtención de las muestras cerebrales”).

3.2.1.1 Tratamientos con antioxidantes

Se realizaron tratamientos con diversos antioxidantes presentes en la dieta mediterránea: *trans-resveratrol*, α -tocoferol y catequina. Además, también se realizó un tratamiento con *poliphenon 60*, fármaco obtenido a partir de un extracto de té verde. Todos los tratamientos con antioxidantes se diluyeron en aceite de maíz como vehículo y fueron administrados por vía intraperitoneal (i.p., 1 ml/kg/día), ajustándolo a la variación diaria del peso de las ratas a lo largo del tratamiento. Se eligió esta vía de administración, en lugar de la vía oral, para intentar asegurar que todos los animales recibían la misma dosis de fármaco. Los tratamientos con los antioxidantes o con el vehículo se realizaron diariamente entre las 8:00-9:00 h de la mañana, coincidiendo con el cambio de ciclo de luz. El aceite de maíz (utilizado como vehículo de dilución) en los animales no produjo cambios en las diferentes pruebas realizadas (tanto comportamentales como neuroquímicas) en comparación a animales de la misma edad a los que se administró suero salino como vehículo.

Asimismo, todos los animales fueron sometidos a una batería de pruebas comportamentales (ver apartado “3.2.2 Pruebas comportamentales”) antes del inicio de los tratamientos, cada 15 días durante el transcurso de los tratamientos y al finalizar los mismos. De esta forma se pudieron establecer los posibles efectos de cada uno de los tratamientos sobre las capacidades cognitivas y motoras de los animales. En los periodos en que los animales realizaban las pruebas comportamentales, los fármacos se administraban al finalizar dichas pruebas. Cabe indicar que los tratamientos con los diversos antioxidantes no afectaron al peso de los animales. De igual forma, el vehículo seleccionado para la administración de los fármacos (aceite de maíz) no indujo cambios a nivel comportamental ni bioquímico en ninguno de los test realizados.

Además de los tratamientos crónicos, también se realizó un tratamiento agudo con dichos antioxidantes (*trans*-resveratrol, α -tocoferol, catequina y *poliphenon 60*) para analizar sus posibles efectos agudos sobre las habilidades cognitivas de animales adultos (10 meses, 480 ± 10 g, $n_{\text{total}}=26$) mediante el test del laberinto radial. Cada antioxidante fue administrado a una dosis de 20 mg/kg (i.p., disuelto en aceite de maíz, cada tratamiento realizado en $n=5$ ratas) 1 hora antes de la realización del test, mientras que a los animales del grupo control se les administró el vehículo de dilución (aceite de maíz, 1 ml/kg, i.p., $n=6$).

Las dosis de los antioxidantes escogidas están dentro del rango de dosis de otros estudios que utilizan enfoques similares, teniendo en cuenta la ruta y tiempo de administración (por ejemplo, para la administración i.p. ver An y Zhang, 2014), la tasa de absorción intestinal (para comparar con tratamientos en los que se sigue la administración oral), y la conversión de dosis apropiada de estudios en animales a las equivalentes en humanos (Reagan-Shaw et al., 2008).

A) Uso de la restricción calórica y tratamientos con el fármaco antioxidante resveratrol en animales adultos

Para esta investigación se usaron ratas macho *Sprague Dawley* adultas (10 meses al inicio del tratamiento, 580 ± 15 g, $n=19$, 1 animal por jaula), divididas en tres grupos (figura 9).

El primer grupo de animales ($n=6$) fue tratado con el fármaco *trans*-resveratrol (RES) a una dosis de 20 mg/kg/día (i.p.) durante 15 días. Paralelamente, los animales del grupo control ($n=6$) fueron tratados con el vehículo aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p.) durante 15 días. Estos dos grupos tuvieron libre acceso al agua y a la comida (dieta comercial estándar Panlab A04).

El tercer grupo de animales adultos ($n=7$) fue sometido a restricción calórica (RC). Para ello, los animales fueron alimentados *ad libitum* hasta los 9 meses de edad con dieta comercial A04. A partir de los 10 meses de edad se inició el régimen de restricción calórica mediante una reducción severa de la ingesta calórica (reducción del 80% respecto a la cantidad de comida consumida por los animales con libre acceso) durante 25 días, representando una pérdida de peso progresiva hasta llegar al 75% de su peso corporal inicial. Una vez alcanzado este porcentaje de pérdida de peso, los animales se mantuvieron sometidos a una reducción moderada de la ingesta calórica (40% respecto a los animales con libre acceso a la comida) durante 15 días para mantener el peso corporal al 75% del peso inicial de los animales. Dichos animales fueron pesados y controlados diariamente para detectar la posible aparición de alguna carencia nutricional (como por ejemplo presencia de calvas en el pelo), las cuales no se detectaron a lo largo del estudio.

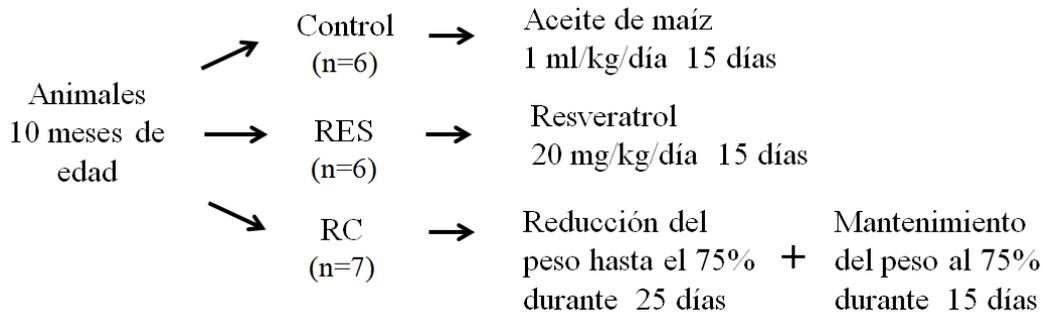


Figura 9. Grupos de animales adultos utilizados en el tratamiento de resveratrol y restricción calórica. Un grupo de animales fue tratado con el fármaco *trans*-resveratrol (RES) a una dosis de 20 mg/kg/día (i.p.) disuelto en aceite de maíz. El vehículo también fue administrado a los animales del grupo control (1 ml/kg/día, i.p.). Los animales sometidos a restricción calórica (RC) fueron sometidos a una reducción de la ingesta calórica hasta llegar al 75% de su peso corporal inicial. Una vez alcanzado este porcentaje, dichos animales se mantuvieron en este peso durante otros 15 días.

En este apartado también se ha analizado la temperatura corporal. Para conocer las posibles variaciones de temperatura de los animales debido a los tratamientos con RC y RES, respecto al grupo control, se introdujo un termistor *iButton* (DS1921H Thermochron® iButtons®, USA; con un rango de registro de temperatura de 15 hasta 46 °C, y con una recogida de muestra cada 15 min) en la cavidad abdominal de los animales mediante cirugía bajo anestesia por inhalación (Forane, AbbotR, ES). La implantación de los sensores fue realizada una semana antes de empezar los tratamientos. Una vez completados los mismos, el termistor *iButton* fue recuperado durante la disección de los animales y los datos registrados se analizaron mediante el programa *iButton Viewer 32* (Thermochron® iButtons® program, USA).

B) Tratamientos con el fármaco antioxidante α -tocoferol en animales viejos

Se llevaron a cabo dos experimentos en ratas macho *Sprague Dawley* viejas (18 meses al inicio del tratamiento, 700±10 g, n=29, 1 animal por jaula) usando distintas dosis de α -tocoferol diluido en aceite de maíz (figura 10) (Ramis et al., 2016). En el primer experimento (experimento Toc 20) las ratas viejas (n=8) recibieron una dosis de α -tocoferol de 20 mg/kg/día (i.p.) durante 28 días. En el segundo experimento (experimento Toc 40-60), se administró a los animales (n=6) una dosis mayor de α -tocoferol, de 40 mg/kg/día (i.p.) durante 28 días. No obstante, dado que no se observaron mejoras significativas en las pruebas comportamentales con respecto a las ratas del experimento Toc 20, se decidió continuar el tratamiento durante otros 28 días con una dosis aumentada de α -tocoferol (60 mg/kg/día, i.p.). Así, este grupo de ratas viejas fue tratado con 40 mg/kg de α -tocoferol durante 28 días seguido de 60 mg/kg de α -tocoferol durante los siguientes 28 días. Paralelamente, los animales control se mantuvieron en las mismas condiciones que los animales tratados con α -tocoferol y fueron administrados con el vehículo aceite de maíz (1 ml/kg/día, i.p.) durante 28 días (n=7) o 56 días (n=8) (experimentos Toc 20 y Toc 40-60 respectivamente).

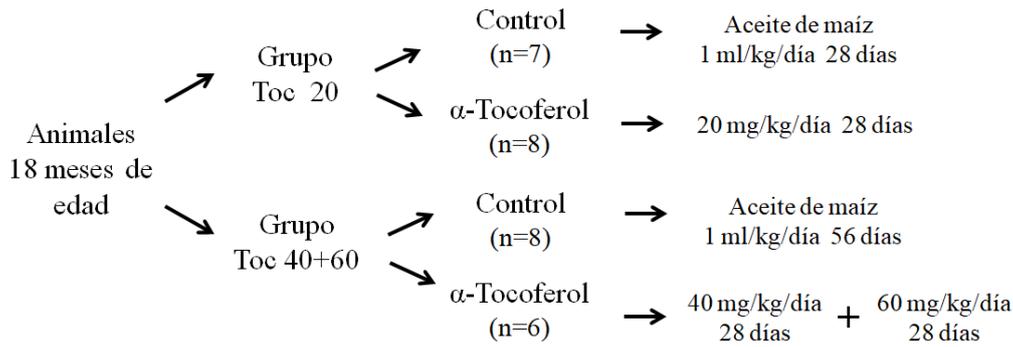


Figura 10. Grupos de animales viejos utilizados en los tratamientos con α -tocoferol. Se llevaron a cabo dos experimentos en ratas (18 meses al inicio del tratamiento), usando distintas dosis de α -tocoferol diluido en aceite de maíz: Toc 20 y Toc 40+60. Este vehículo fue administrado también a los animales control (1 ml/kg/día).

C) Tratamientos con los fármacos antioxidantes catequina y poliphenon 60 en animales viejos

Para estos tratamientos se han utilizado ratas macho *Sprague Dawley* viejas (18 meses al inicio del tratamiento, 640 ± 5 g, $n=19$, 1 animal por jaula). Tanto en el experimento con catequina ($n=6$) como en el experimento con *poliphenon 60* ($n=7$), las ratas viejas recibieron una dosis de 20 mg/kg/día (i.p.) durante 28 días seguida de una dosis de 40 mg/kg/día (i.p.) durante los siguientes 7 días (figura 11) (Ramis et al., 2020). Paralelamente a estos tratamientos, los animales del grupo control ($n=6$) recibieron el vehículo de dilución (aceite de maíz, 1 ml/kg/día, i.p.) durante 35 días.

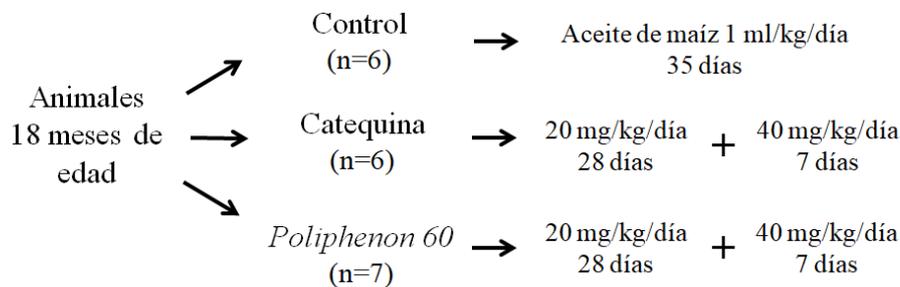


Figura 11. Grupos de animales viejos utilizados en los tratamientos con catequina y *poliphenon 60*. Los dos antioxidantes fueron diluidos en aceite de maíz; este vehículo fue administrado también a los animales control (1 ml/kg/día).

3.2.1.2 Tratamientos con ejercicio físico moderado y la acción combinada con el antioxidante catequina

Otra de las estrategias en auge para prevenir el deterioro cognitivo y motor es el ejercicio físico (figura 12). Para ello, en la presente investigación se han utilizado ratas macho *Wistar* adultas (18 meses al inicio de tratamiento, peso de 600 ± 35 g, $n=21$, 1 animal por jaula). Hasta los 18 meses, los animales se mantuvieron en las condiciones estándar de estabulación. A partir de los 18 meses, los animales que formaban parte del grupo control ($n=7$) se mantuvieron en las

mismas condiciones durante las siguientes 5 semanas. Los animales que formaban parte del grupo de ejercicio físico (n=7, grupo Ejerc), fueron sometidos a ejercicio moderado durante 5 días a la semana (de lunes a viernes), un total de 5 semanas, mediante el uso del dispositivo del *rotarod*, el cual dispone de una rueda giratoria cuya velocidad puede ir modificándose (para más detalles del dispositivo consultar el apartado “3.2.2.4. Test de *rotarod*”). La duración y la intensidad del ejercicio físico fueron incrementándose paulatinamente para que los animales se adaptaran al ejercicio. Así, los primeros 5 días de duración la velocidad se incrementó de 4 a 10 rpm, y cada día permanecían en la rueda giratoria durante 5 minutos. Las siguientes dos semanas, la velocidad se incrementó de 10 a 15 rpm, permaneciendo en la rueda giratoria de 5 a 10 minutos. Las dos últimas semanas se mantuvo la velocidad a 15 rpm, y los animales permanecieron en la rueda giratoria durante 10 minutos (Ramis et al., 2021b).

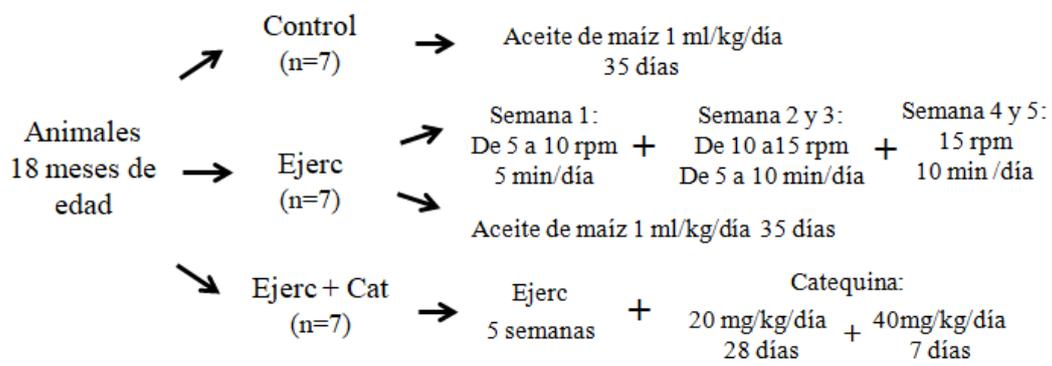


Figura 12. Grupos de animales viejos utilizados en el ejercicio físico moderado. Los animales sometidos a actividad física (Ejerc y Ejerc + Cat) realizaron un ejercicio físico en el dispositivo del *rotarod* cuya duración e intensidad fue incrementándose a lo largo de las semanas. Al grupo Ejerc + Cat, además de la aplicación del ejercicio, se le administró el antioxidante catequina diluido en aceite de maíz; este vehículo fue administrado también a los animales control y al grupo Ejerc (1 ml/kg/día) durante la duración de todo el experimento.

El tercer grupo de animales (n=7), además de la realización del ejercicio físico descrito en el grupo anterior, recibieron una dosis del antioxidante catequina para poder evaluar la posible acción conjunta del ejercicio físico y los antioxidantes (grupo Ejerc + Cat). Las ratas recibieron diariamente una dosis de 20 mg/kg/día (diluido en aceite de maíz, 1 ml/kg/día, i.p.) los primeros 28 días y una dosis de 40 mg/kg/día (i.p.) los siguientes 7 días (siguiendo la misma pauta que los animales tratados sólo con catequina). Cabe indicar que, para compensar un posible efecto de estrés producido por el pinchazo del antioxidante, tanto a los animales del grupo control como a los animales que sólo realizaron ejercicio se les administró el vehículo de dilución (aceite de maíz, 1 ml/kg/día, i.p.) durante los 35 días de tratamiento.

El programa de ejercicio físico fue aplicado a los animales entre las 9:00 y las 12:00 horas de la mañana. Asimismo, la administración de catequina, o del vehículo en su defecto, se realizó justo después de la finalización del ejercicio.

Todos los animales fueron sometidos a una batería de pruebas comportamentales (ver apartado “3.2.2 Pruebas comportamentales”) antes del inicio de los tratamientos, cada 15 días a lo largo del transcurso de los tratamientos y al finalizar los mismos. De esta forma se pudieron establecer los posibles efectos del ejercicio físico, así como la posible acción conjunta del ejercicio y los antioxidantes, sobre las capacidades cognitivas y motoras de los animales. En los periodos en que los animales realizaban las pruebas comportamentales, la aplicación del ejercicio físico y la administración de catequina o vehículo se realizaba al finalizar las pruebas.

3.2.1.3 Tratamientos con programas de enriquecimiento ambiental y estrés

Otro objetivo de la presente investigación fue conocer los efectos del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre el deterioro cognitivo y motor asociado al envejecimiento. Para ello se llevaron a cabo diferentes programas de EA empezando a distintas edades: a partir de 1 mes (ratas jóvenes; EA temprano - EA 1-20), 7 meses (ratas adultas; EA intermedio - EA 7-20) y 18.5 meses (ratas viejas; EA tardío - EA 18.5-20) de edad.



Figura 13. Objetos utilizados en los programas de enriquecimiento ambiental. Ejemplo de los diferentes materiales usados para realizar los programas de enriquecimiento ambiental, incluyendo objetos de plástico (aros, pelotas...), objetos de papel y cartón (hojas de periódico, cajas de guantes, tubos de diferentes tamaños...) y otros objetos como cuerdas y piezas de madera.

La aplicación del EA se realizó con diversos objetos de varios tamaños, formas y materiales (figura 13). Entre estos objetos estaban:

- Objetos de plástico (como aros, pelotas y cubos).
- Objetos de papel y cartón (como cajas, tubos de diferentes tamaños y hojas de papel de periódico).
- Objetos de otros materiales (como cuerdas de diferentes grosores y tacos de madera).

Cabe indicar que a veces se utilizaron diferentes aromas (de manzana, cereza, vainilla, melocotón), mediante el uso de 3-4 gotas de cada aroma sobre bolas de papel que luego se colocaban dentro de tubos o cajas para incentivar la exploración de los animales. Asimismo, con el mismo objetivo de incentivar la exploración, en algunas ocasiones se suministró a los animales una pequeña cantidad de comida (menos de 5 gramos) envuelta en bolas de papel colocadas dentro de tubos o cajas. Los animales siempre disponían de diversos tipos de objetos para aumentar la novedad de los objetos, los cuales eran cambiados regularmente (ver el anexo A para conocer el cronograma seguido).

Asimismo, se quisieron conocer las consecuencias producidas por la repetición continuada de situaciones estresantes moderadas sobre el deterioro cognitivo y motor asociado a la edad. Para ello se llevaron a cabo dos programas de estrés crónico moderado impredecible (ES) empezando a distintas edades: a partir de 1 mes (ratas jóvenes; ES temprano - ES 1-20) y 7 meses (ratas adultas; ES intermedio - ES 7-20) de edad.

Los animales sometidos a ES, al inicio de los tratamientos (1 y 7 meses de edad), fueron alojados en jaulas cuadradas individuales de pequeño tamaño (22x22x22cm) y se mantuvieron así hasta los 20 meses de edad, reduciendo la capacidad de movimiento de los animales y produciendo a su vez un aislamiento social a largo plazo. Los factores estresantes (figura 14) a los que los animales fueron sometidos eran cambiados regularmente (ver el anexo A para conocer el cronograma seguido).



Figura 14. Objetos utilizados en los programas de estrés crónico moderado impredecible. Ejemplo de los diferentes materiales usados para realizar los programas de estrés crónico, incluyendo la jaula en la que se alojaron los animales, pulverizadores de agua, globos rellenos de agua colgados de la jaula, y canicas en la base de la jaula en lugar de viruta.

Entre los factores estresantes a los que se sometieron a los animales se encontraban:

- Cambios constantes del ciclo de luz/oscuridad: a lo largo de los programas de estrés crónico, y gracias a la ayuda de diversos temporizadores, se cambió la duración del ciclo de luz/oscuridad sin seguir una pauta fija para evitar que los animales se pudieran adaptar a esas variaciones. Entre estos cambios se encontraban ciclos de 24 horas (como 20 horas luz/ 4 horas oscuridad o 6 horas luz/ 18 horas oscuridad), ciclos de luz continua durante 72 horas, ciclos de 5 horas (las luces se encendían y apagan cada 5 horas) y ciclos de 48 horas (36 horas luz/ 12 horas de oscuridad).

- Cambios en la temperatura de la sala en la que se alojaban los animales: se incrementó la temperatura de la sala por encima de 25 °C durante al menos 3 días seguidos, y también se sometió a los animales a bajas temperaturas (menos de 17 °C) durante al menos 3 días seguidos. Estos cambios se producían de forma irregular y sin orden predictivo.

- Cambios en el sustrato del suelo: hubo semanas en las que la viruta de madera no se cambió de forma semanal. En otras ocasiones, la viruta era sustituida por canicas, dejando un material de nidificación inestable e incapaz para absorber orina. Esto afectaba tanto a la capacidad motora como al sentido del olfato de las ratas.

- Factores estresantes relacionados con agua: hubo días en los que los animales se veían privados de agua en periodos de tiempo aleatorios, sin llegar a causarles problemas fisiológicos. Además, con ayuda de un pulverizador se procedía a mojar a los animales con agua a temperatura ambiente, mojando al animal y también modificando las condiciones de humedad óptimas para la rata. Asimismo, se utilizaron globos de pequeño tamaño llenos de agua colgados de la tapa de la jaula del animal (1-2 globos/jaula), con lo que, al romperlos, además del ruido, la rata se mojaba inesperadamente.

- Factores estresantes sonoros: con ayuda de un *timer* se activaban diferentes alarmas (de 3 minutos de duración) a distintas variaciones de tiempo para causar un estado de alerta continuo.

A) Programas de enriquecimiento ambiental y estrés crónico en ratas a partir de 1 mes de edad, junto al efecto combinado del enriquecimiento ambiental y la dieta rica en antioxidantes

Para este grupo de tratamientos se usaron ratas macho *Wistar* (1 mes al inicio de tratamiento, peso de 100±5 g, n=37, 2 animales por jaula) (figura 15). Los animales que formaban el grupo control (n=12, 2 animales por jaula) se mantuvieron en las condiciones estándar descritas anteriormente (ver apartado “3.1.1 Animales de experimentación”).

Los animales que formaban parte del grupo estrés (n=6, 1 animal por jaula) fueron sometidos a diferentes tipos de factores estresantes hasta que alcanzaron la edad de 20 meses. Estos factores se cambiaban semanalmente, especialmente los relacionados con los ciclos de

luz/oscuridad y los cambios de temperatura para evitar que los animales se pudieran adaptar a ellos e intentando no repetir el mismo factor estresante más de una semana seguida. En la tabla A1 del anexo A se detalla el cronograma seguido, indicando el estresante utilizado en cada semana, además de las jaulas pequeñas individuales en las que se mantuvieron a los animales durante todo el transcurso de la investigación. Los cambios en los factores estresantes aplicados se realizaban entre las 9:00 - 10:00 h de la mañana.

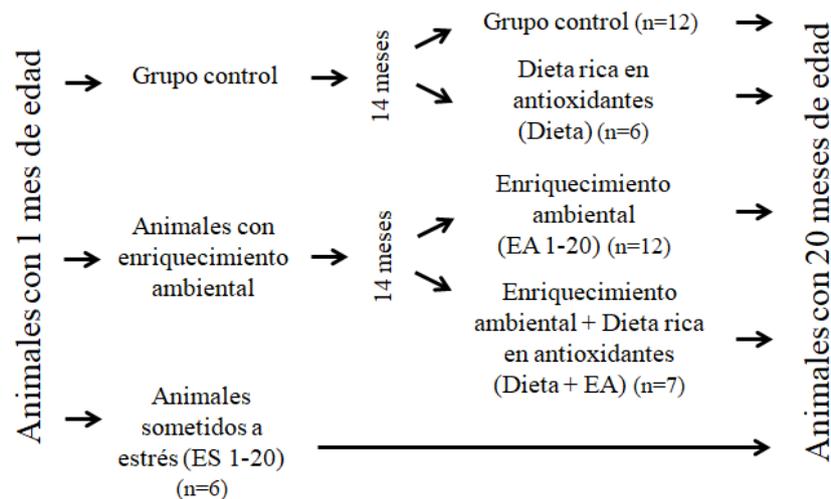


Figura 15. Grupos de animales utilizados en los programas de enriquecimiento ambiental, dieta y estrés crónico a largo plazo. Los programas de enriquecimiento ambiental o estrés se aplicaron desde 1 mes de edad de los animales hasta alcanzar los 20 meses; el programa de dieta se aplicó a partir de los 14 meses. Los animales del grupo control se mantuvieron en las condiciones estándar de estabulación.

Los animales sometidos a enriquecimiento ambiental (n=19, 2 animales por jaula) disponían de diferentes objetos de diversas formas, tamaños y materiales distribuidos por la jaula (tanto por el suelo de la jaula como en la tapa). Estos objetos eran cambiados semanalmente para motivar a los animales a una continua exploración de los mismos, intentando no repetir el mismo objeto más de una semana seguida y procurando que hubiera variedad tanto en el tipo de material de los objetos disponibles como en su tamaño. En la tabla A1 del anexo A se detalla el cronograma seguido, indicándose los objetos colocados en la jaula cada semana. Los cambios de los objetos que se les proporcionaba a los animales se realizaban entre las 9:00 - 10:00 h de la mañana.

A los 14 meses, los animales sometidos a enriquecimiento ambiental fueron divididos en dos grupos. Uno de ellos (n=12) fue mantenido en las mismas condiciones indicadas anteriormente, disponiendo de diferentes objetos que se cambiaban semanalmente, hasta que los animales tuvieron 20 meses de edad. El segundo grupo de ratas (n=7) fue sometido a la acción conjunta de dos tratamientos: enriquecimiento ambiental y dieta rica en antioxidantes (figura 16). Para ello, a los animales de este grupo, además de disponer de diversos objetos para seguir con el tratamiento de enriquecimiento ambiental (mismos objetos que el grupo de animales sometidos

sólo a enriquecimiento ambiental, más detalles en la tabla A1 del anexo A), se les proporcionó diferentes alimentos ricos en antioxidantes, los cuales se cambiaban 3 veces por semana (siguiendo la misma pauta y proporcionándoles los mismos alimentos que los animales sometidos sólo a dieta rica en antioxidantes, tal y como se detalla a continuación y en la tabla A4 del anexo A). Los dos tratamientos se aplicaron a los animales hasta alcanzar una edad de 20 meses, momento en el que se procedió a su sacrificio.

Se analizó el posible efecto beneficioso de una dieta rica en antioxidantes a largo plazo sobre el deterioro cognitivo y motor asociado al envejecimiento (Ramis et al., 2021a). Para ello se usaron ratas macho *Wistar* adultas (14 meses al inicio del tratamiento, peso de 535 ± 25 g, $n=6$, 1 animal por jaula para asegurar que todos los animales disponían de la misma cantidad de comida). Hasta los 14 meses, los animales recibieron una dieta comercial estándar (Panlab A04) *ad libitum*, del mismo modo que los animales que formaban parte del grupo control. A partir de los 14 meses se les restringió el acceso a la dieta comercial estándar (Panlab A04), con 30 g pellet/rata/día (requerimientos nutricionales suficientes para un animal de esa edad). Asimismo, 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) se les proporcionó diferentes alimentos ricos en antioxidantes hasta que los animales alcanzaron los 20 meses de edad. En la tabla A4 del anexo A se muestra el cronograma detallado de los alimentos y la cantidad administrada de cada uno de ellos (aproximadamente unos 20-25 g de comida por animal), junto a los correspondientes 30 g/pellet/rata/día. Los alimentos fueron proporcionados a los animales alrededor de las 9:00 - 10:00 h de la mañana. Entre estos alimentos suministrados (figura 16) encontramos diferentes frutas y verduras (como brócolis, zanahorias, tomates, manzanas, ciruelas, uvas, naranjas, nueces, almendras...) y cereales (como avena y trigo). Además, los animales durante todo el tratamiento tuvieron libre acceso al agua, y también se les puso otro bebedor con diversos tipos de zumos (incluyendo zumos de diferentes frutos rojos, de piña...) o de té (como té verde y té rojo) que se reponían regularmente.



Figura 16. Ejemplo de los diferentes alimentos utilizados para la aplicación de la dieta rica en antioxidantes.

Durante el transcurso de los tratamientos (de 1 a 20 meses de edad), los animales de todos los grupos experimentales (control, estrés, enriquecimiento ambiental, dieta rica en antioxidantes y enriquecimiento ambiental más dieta) fueron sometidos a una batería de pruebas

comportamentales (ver apartado “3.2.2 Pruebas comportamentales”) antes del inicio de los tratamientos, cada mes durante el transcurso de los tratamientos y al finalizar los mismos. De esta forma se pudieron establecer los posibles efectos de los tratamientos sobre las capacidades cognitivas y motoras de los animales a lo largo del proceso de envejecimiento. En los periodos en que los animales realizaban las pruebas comportamentales, la administración de los alimentos y el cambio de los juguetes o de los factores estresantes se realizaba al finalizar las pruebas.

B) Programas de enriquecimiento ambiental y estrés crónico en ratas a partir de 7 meses de edad.

Para este grupo de tratamientos se usaron ratas macho *Sprague Dawley* (7 meses al inicio del tratamiento, peso de 510 ± 10 g, $n=36$, 2 animales por jaula). Hasta que los animales alcanzaron los 7 meses de edad se mantuvieron en el estabulario en las condiciones estándar descritas anteriormente (ver apartado “3.1.1 Animales de experimentación”). Los animales que formaban parte del grupo control ($n=12$, 2 animal por jaula) se mantuvieron en estas mismas condiciones hasta alcanzar los 20 meses de edad (figura 17).

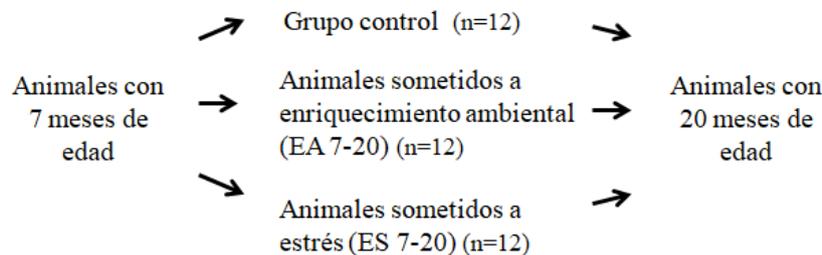


Figura 17. Grupos de animales utilizados en los programas de enriquecimiento ambiental y estrés iniciado a edades intermedias. Los animales se mantuvieron bajo el programa de enriquecimiento ambiental o estrés desde los 7 meses de edad hasta alcanzar los 20 meses. Los animales del grupo control se mantuvieron en las condiciones estándar de estabulación.

Los animales sometidos a enriquecimiento ambiental ($n=12$, 2 animales por jaula) disponían de varios objetos de diferentes formas, tamaños y materiales distribuidos por la jaula (tanto por el suelo de la jaula como en la tapa). Se siguió una pauta similar a la descrita en el apartado anterior; sin embargo, estos objetos fueron cambiados 2 veces por semana (lunes y jueves) para conseguir una mayor motivación de los animales para que explorasen los objetos, intentando no repetir el mismo objeto más de una vez seguida y procurando que hubiera variedad en el tipo de material de los objetos disponibles y en el tamaño de los mismos. En la tabla A2 del anexo A se detalla el cronograma seguido, indicando los objetos colocados en la jaula cada semana. El cambio de los objetos que se les proporcionaba a los animales se realizaban entre las 9:00 - 10:00 h de la mañana.

Los animales que formaban parte del grupo estrés crónico moderado (n=12, 1 animal por jaula) fueron sometidos a diferentes tipos de factores estresantes. Se siguió una pauta similar a la descrita en el apartado anterior, usando las mismas jaulas individuales; sin embargo, los factores estresantes fueron cambiados con más frecuencia para intensificar el estrés e intentando no repetir el mismo más de una vez seguida. Estas condiciones se mantuvieron hasta que los animales tuvieron 20 meses. En la tabla A2 del anexo A se detalla el cronograma seguido, indicando los factores estresantes utilizados cada semana, además de las jaulas pequeñas individuales en las que se mantuvieron a los animales durante todo el transcurso de la investigación. Los cambios en los factores estresantes aplicados se realizaban entre las 9:00 - 10:00 h de la mañana.

Durante cada mes a lo largo de los tratamientos (de 7 a 20 meses de edad), los animales de todos los grupos experimentales (control, estrés y enriquecimiento ambiental) realizaron diversas pruebas comportamentales para conocer los posibles efectos de los tratamientos sobre las capacidades cognitivas y motoras de los animales, especialmente durante el envejecimiento.

C) Programa de enriquecimiento ambiental en ratas a partir de 18.5 meses de edad.

Para este grupo de tratamientos se usaron ratas macho *Wistar* (18.5 meses al inicio de tratamiento, peso de 570 ± 10 g, n=13, 2 animales por jaula). Hasta que los animales alcanzaron los 18.5 meses de edad se mantuvieron en el estabulario en las condiciones estándar descritas anteriormente (ver apartado “3.1.1 Animales de experimentación”). Los animales que formaban el grupo control (n=6, 2 animal por jaula) se mantuvieron en estas mismas condiciones hasta alcanzar la edad de 20 meses.

Los animales sometidos a enriquecimiento ambiental (n=7, 2 animales por jaula) disponían de diferentes objetos de diferentes formas, tamaños y materiales distribuidos por la jaula (tanto por el suelo de la jaula como en la tapa). En este programa, los objetos que se proporcionaban a los animales fueron cambiados 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) para conseguir una mayor motivación de los animales, intentando no repetir el mismo objeto más de una vez seguida y procurando que hubiera variedad tanto en el tipo de material de los objetos disponibles como en el tamaño de los mismos. En la tabla A3 del anexo A se detalla el cronograma seguido, indicando los objetos colocados en la jaula cada semana, los cambios de los cuales se realizaban entre las 9:00 - 10:00 h de la mañana.

Tanto al inicio como al final del programa de enriquecimiento, los animales de los dos grupos experimentales (control y enriquecimiento ambiental) realizaron diversas pruebas comportamentales para conocer los posibles efectos sobre las capacidades cognitivas y motoras de los animales.

3.2.2 Pruebas comportamentales

Las pruebas comportamentales se llevaron a cabo entre las 9:30 y las 13:00h, ajustándose a este periodo de tiempo para evitar diferencias entre los animales debido al nivel de actividad basal (alternando cada vez un animal de cada grupo experimental). Las ratas fueron colocadas en la habitación en la que se desarrollaría el experimento 30 minutos antes de empezar las pruebas. Estas pruebas comportamentales se realizaron justo antes de empezar los tratamientos, a lo largo de los mismos (cada 15 días o cada mes en función de la duración del experimento), así como al finalizar los experimentos. En la figura 18 se detalla el orden seguido para la realización de las diferentes pruebas comportamentales.

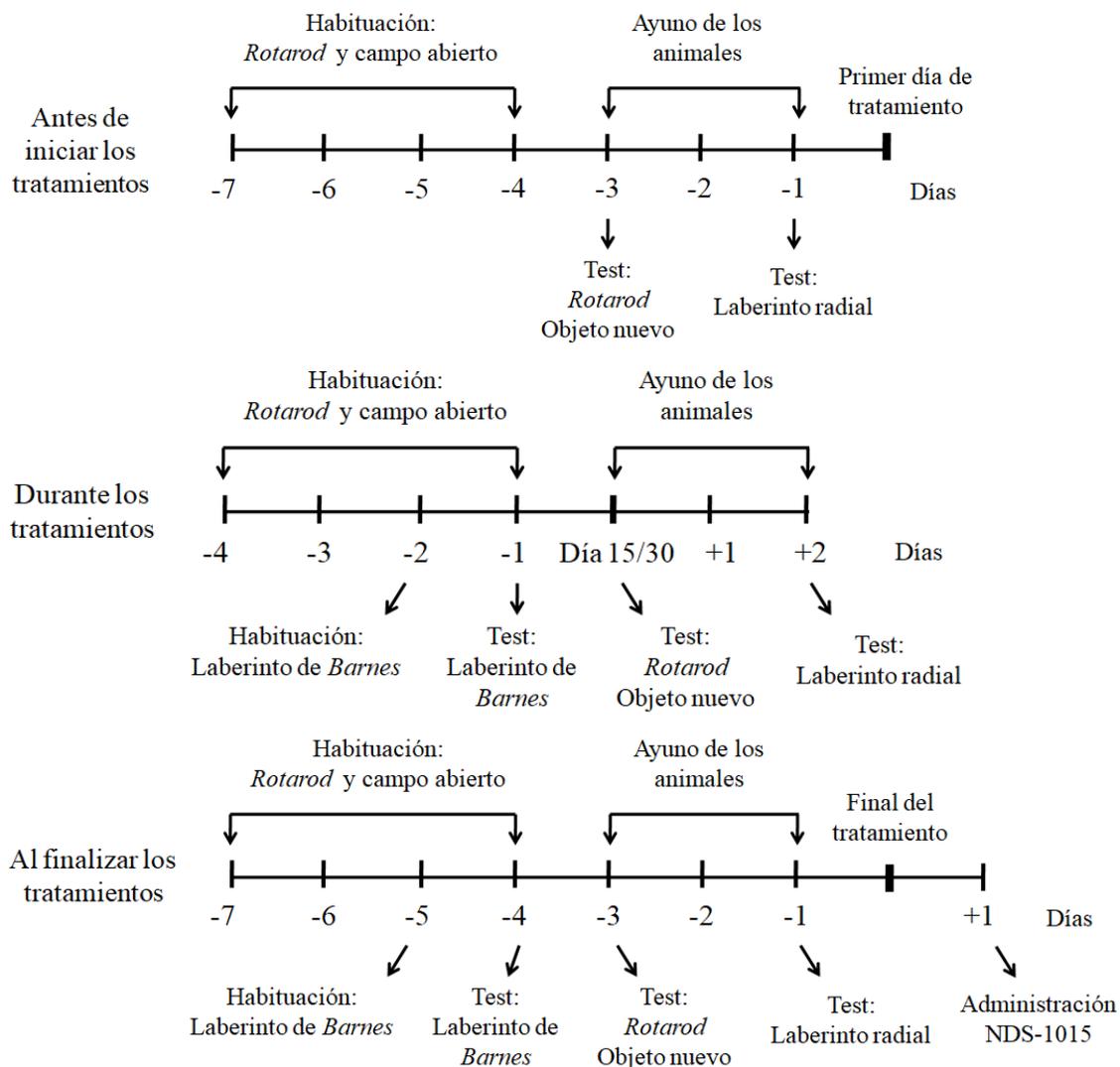


Figura 18. Diseño experimental de la realización de las pruebas comportamentales. Antes de iniciarse los tratamientos, los animales realizaban varias pruebas para dividir a los animales en grupos homogéneos. Durante los tratamientos, cada 15 días (en las estrategias basadas en la aplicación de antioxidantes o de ejercicio físico) o cada 30 días (en los programas de enriquecimiento ambiental, dieta y estrés) también se realizaban dichas pruebas para analizar la evolución de los tratamientos. Al finalizar los mismos, se repitieron las pruebas comportamentales, justo antes del sacrificio de los animales (momento en el cual se procedió a la administración del fármaco NDS-1015).

Las pruebas utilizadas para analizar las capacidades cognitivas y motoras han sido:

- Test del laberinto radial para analizar la memoria de trabajo espacial.
- Test del laberinto de Barnes para evaluar el aprendizaje visoespacial.
- Test de reconocimiento de objeto nuevo para analizar la memoria episódica.
- Test del *rotarod* para evaluar la coordinación motora.

A continuación, se especifica el procedimiento utilizado en cada una de estas pruebas.

3.2.2.1 Test del laberinto radial

El test del laberinto radial (figura 19) ha sido utilizado para analizar la memoria de trabajo espacial en roedores. Este test fue desarrollado por Olton y Samuelson (1976) y ha sido ampliamente usado para evaluar el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento en diversos modelos de experimentación (Bernstein et al., 1985; Esteban et al., 2010a, b; Krazem et al., 2003; Lebrun et al., 1990; Lohmann y Riepe, 2007; Marighetto et al., 2000; Noguès et al., 1996; Ramis et al., 2013, 2016, 2020, 2021a, b; Sarubbo et al., 2015, 2018; Sharma et al., 2010; Takahashi et al., 2009; Touyarot et al., 2002; Touzani et al., 2003).

El laberinto radial de 8 brazos utilizado (Panlab) consta de una plataforma central octogonal (30 cm de diámetro), con 8 brazos radiales equidistantes (70 cm de largo, 10 cm de ancho), elevado 75 cm sobre el suelo. El laberinto estaba colocado en una habitación experimental en la que había diferentes pistas visuales (figuras con diferentes formas y colores), tanto en las paredes de la habitación como en la plataforma central del dispositivo. Estas pistas se mantuvieron en la misma posición a lo largo de la realización de la prueba ya que eran usadas por el animal como puntos de referencia.

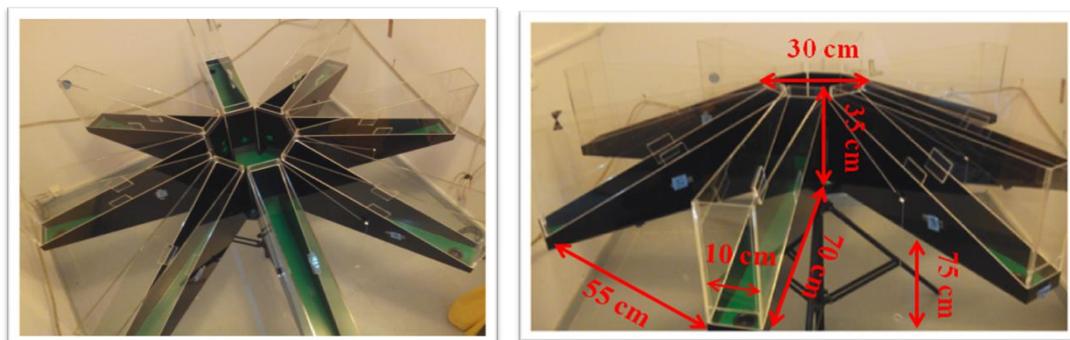


Figura 19. Dispositivo del laberinto radial, junto con sus medidas, utilizado para analizar la memoria de trabajo espacial en roedores.

En este test, el animal se colocaba en el centro del dispositivo y justo después se le permitía visitar libremente los brazos del laberinto para obtener un pequeño trozo de pellet situado al final de cada uno de los brazos (pocillo negro de 4 cm de diámetro, situado a 3 cm del final del

brazo). Para conseguir el suficiente nivel motivacional, los animales jóvenes (menores de 6 meses) fueron sometidos previamente a un ayuno de 24 horas, mientras que en los animales adultos y de edad avanzada el ayuno realizado fue de 48 horas. Al finalizar cada prueba, el dispositivo se lavaba con una solución de etanol 70% para eliminar el posible rastro presente. El recorrido seguido por los animales fue grabado mediante un sistema de vídeo (LE 8300 con software *SEDACOM v1.3*, Panlab) y analizado mediante el programa *Smart v2.5* (Panlab). El test finalizaba cuando la rata visitaba cada uno de los 8 brazos (tiempo total, minutos) o cuando transcurría un tiempo máximo de 20 minutos. La suma de las re-entradas en los diferentes brazos, así como los brazos no visitados, fueron considerados como errores. En este test también se analizó la distancia (cm) recorrida por los animales.

3.2.2.2 Test del laberinto de Barnes

El test del laberinto de *Barnes* (figura 20) permite analizar el aprendizaje visoespacial (Deacon y Rawlins, 2002; Harrison et al., 2006, 2009; Pompl et al., 1999; Ramis et al., 2016, 2021a, b; Sarubbo et al., 2018). Para evitar el estrés inducido por la natación que se produce en el *Morris water maze*, Carol Barnes desarrolló un laberinto equivalente en seco (Barnes, 1979) para poder analizar la memoria de trabajo y la memoria de referencia espacial (Patil et al., 2009).

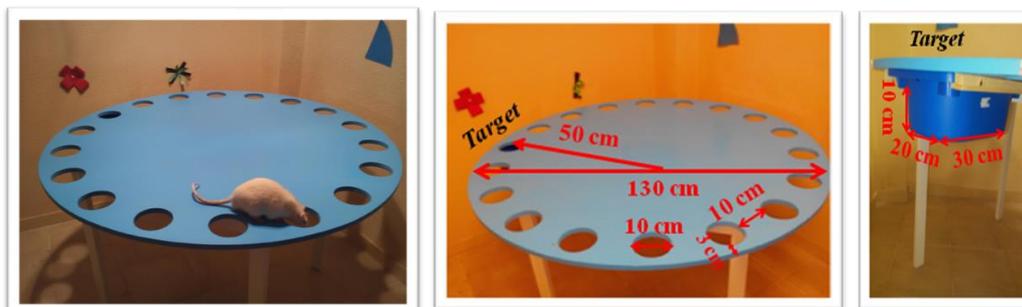


Figura 20. Dispositivo del laberinto de *Barnes* utilizado para analizar el aprendizaje visoespacial, junto con sus medidas y detalle de la caja de escape.

El laberinto (modificado a partir de Barnes, 1979 y Rueda-Orozco et al., 2008) consiste en una plataforma de madera circular (diámetro de 130 cm), elevado 75 cm sobre el suelo, con 18 agujeros (con un diámetro de 10 cm) localizados alrededor del perímetro del círculo y centrados 3 cm desde el borde. Bajo uno de los agujeros hay una caja de plástico oscura llamada caja de escape o *target* (30×20×10 cm). La caja fue mantenida en la misma posición a lo largo de la realización del test. Desde el centro del laberinto todos los agujeros parecían idénticos y la caja de escape no se podía discriminar de los otros agujeros. Para la realización del test se encendía una luz brillante potente, usándola como estímulo negativo para acentuar la agorafobia natural de los roedores y su preferencia natural por los ambientes oscuros (Bach et al., 1995; Barrett et

al., 2009), consiguiendo así la motivación suficiente para que el animal se desplazara a lo largo del laberinto en busca de un escape (Ingram et al., 1994; Moscovitch et al., 2005). El dispositivo estaba colocado en una habitación experimental que disponía de diversas pistas visuales alrededor del laberinto, las cuales no fueron movidas a lo largo de la realización de la prueba para servir como puntos de referencia para la localización de la caja de escape (Barrett et al., 2009).

El día previo a la realización del test cada animal fue habituado a explorar libremente el laberinto (fase de familiarización). Cada rata se colocada en el centro del dispositivo cubierta por un cilindro opaco durante 10 segundos. Transcurrido ese tiempo, el cilindro se retiraba, la luz se encendía y el animal tenía 3 minutos para encontrar la caja de escape y esconderse dentro de ella. Si el animal no encontraba la caja era dirigido manualmente hacia ella y se le hacía entrar; una vez dentro de la caja el animal permanecía allí durante 2 minutos a oscuras.

El día del test cada animal realizó 4 pruebas, con un intervalo de tiempo entre ellos de 10 minutos. Las tres primeras corresponden a los entrenamientos (fase de entreno), mientras que la última corresponde a la fase de test. En cada entrenamiento el animal era colocado en el centro del dispositivo cubierto por un cilindro opaco durante 10 segundos, transcurridos los cuales el cilindro se retiraba y la luz se encendía como estímulo negativo para fomentar la exploración. El entreno finalizaba cuando el animal entraba en la caja de escape. Si el animal no entraba en la caja después de 3 minutos, era dirigido manualmente hacia la caja y se le hacía entrar dentro, donde permanecía durante 1 minuto a oscuras. En la fase de test, el tiempo máximo del que disponía el animal para localizar la caja de escape era de 90 segundos. Entre cada prueba el animal era retornado a su jaula, y tras un periodo de 10 minutos empezaba el siguiente trial. La superficie del dispositivo y la caja fueron lavados con una solución de etanol 70% entre cada animal y entre cada prueba para eliminar el posible rastro presente, evitando así que el animal pudiera resolver el test con la ayuda de estas pistas.

En cada prueba se evaluó el tiempo que el animal pasaba explorando el laberinto hasta encontrar la caja de escape (latencia, en segundos); además, la exploración de un agujero diferente al *target* fue contabilizado como un error. También se registró la estrategia seguida por el animal para localizar el *target*, pudiéndose observar tres estrategias diferentes (Rueda-Orozco et al., 2008): la estrategia directa, en la que la rata va directamente al *target* o a uno de los agujeros de al lado; la estrategia seriada, en la que el animal explora los agujeros siguiendo una secuencia en una dirección (visita de agujeros adyacentes); y la estrategia aleatoria, en la que el animal no sigue ningún patrón sino que explora agujeros al azar.

En el caso de los tratamientos con antioxidantes, el uso de la dieta y el ejercicio físico, el test del laberinto de *Barnes* sólo se realizó al final de los tratamientos para evitar un posible

aprendizaje producido por los entrenamientos seguidos que implica la realización del test usando los mismos animales. En el caso del EA y el ES, cuya duración es de varios meses, este test se realizó a los 6, 12 y 19 meses de edad de los animales.

3.2.2.3 Test de reconocimiento de objeto nuevo

El test de reconocimiento de objeto nuevo es un método para medir la memoria episódica en ratas y ratones, basado en la capacidad exploratoria espontánea de estos animales (Eacott y Norman, 2004; Okamura et al., 2011). Este test evalúa la habilidad natural de los roedores para explorar los objetos nuevos gracias a su tendencia natural a la novedad (Antunes y Biala, 2012), sin la necesidad de recompensas, motivación externa o castigo. Este test fue llevado a cabo en el dispositivo del campo abierto (cilindro con un diámetro de 78 cm y con una altura de las paredes de 60 cm) (figura 21).

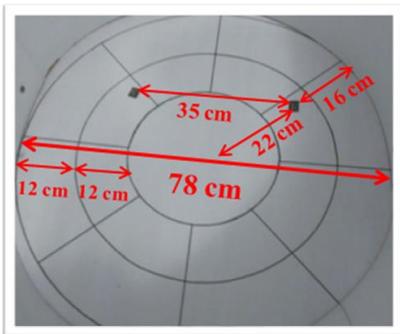


Figura 21. Dispositivo del campo abierto, junto con sus medidas, utilizado para la realización del test de reconocimiento de objeto nuevo.

El procedimiento consta de tres fases: habituación, familiarización y test (figura 22) (Ramis et al., 2013, 2016, 2020, 2021a, b; Sarubbo et al., 2015, 2018).



Figura 22. Ejemplo de las tres fases de las que consta el test de reconocimiento de objeto nuevo utilizado para analizar la memoria episódica: habituación (izquierda), familiarización (centro) y test (derecha).

En la fase de habituación se pretende que el animal se acostumbre al lugar en el que se va a realizar la prueba. Para ello se colocó a cada animal individualmente en el centro del aparato (sin la presencia de los objetos a utilizar en las siguientes fases), y se dejó que explorara libremente el dispositivo durante 10 minutos. Este proceso se repitió una vez al día en los cuatro

días previos a la prueba. En el quinto día cada animal fue colocado en el aparato durante 1 minuto, permitiéndole explorar libremente para reconocer el ambiente (re-habitación).

Justo después de la re-habitación se procedió a realizar la fase de familiarización. En esta fase se situaron dos objetos de las mismas características (cubos de plástico de 6x6 cm y del mismo color), colocados de forma equidistante al centro del campo abierto, localizados 16 cm de las paredes del dispositivo y con una distancia de 35 cm entre ellos, sujetos al campo abierto por la base con la ayuda de velcro para asegurar la posición de los objetos. A continuación, se colocó la rata en el centro del dispositivo, permitiéndole la exploración de los objetos hasta alcanzar los 30 segundos de exploración entre los dos objetos o un tiempo máximo de 10 minutos en el dispositivo. En esta fase se anotó el tiempo que el animal había estado explorando cada uno de los objetos y se registró el recorrido que había seguido. La exploración de los objetos fue registrada de tal forma que se consideró exploración cuando la nariz o la boca del animal estaba en contacto con el objeto, mientras que correr alrededor del objeto, sentarse o escalar sobre él no fue considerado como exploración. Cabe destacar que los objetos no tenían un significado para las ratas, sin poder asociarse con un refuerzo positivo o negativo.

Transcurrida esta fase el animal era devuelto a su jaula y tras un periodo de retraso de 10 minutos se procedía a realizar la fase de test. En esta fase, en la cual se refleja la preferencia por la novedad de los roedores, se colocaron también dos objetos en la misma posición que en la fase de familiarización: un objeto era exactamente igual que en la fase anterior (misma forma y color) y el otro objeto era totalmente diferente, tanto en forma como en color (en este caso bolos de plástico de 8x5 cm). Seguidamente, se colocó a cada rata en el centro del dispositivo y se le dejó explorar de nuevo los dos objetos durante un tiempo máximo de 10 minutos. En esta fase también se anotó el tiempo que el animal había estado explorando cada uno de los objetos y se registró el recorrido que había seguido.

Entre cada una de las fases, así como entre cada animal, tanto el dispositivo como los objetos utilizados se limpiaron con etanol 70%.

3.2.2.4 *Test del rotarod*

La coordinación motora tradicionalmente se ha evaluado en ratones y ratas mediante la prueba de *rotarod* (Deacon, 2013; Esteban et al., 2010a, b; Pitozzi et al., 2012; Ramis et al., 2016, 2020, 2021a, b; Sarubo et al., 2018; Subash et al., 2015; Vachon et al., 2013; Zhou et al., 2013). Así, el test del *rotarod* fue usado para examinar los efectos de los diferentes tratamientos sobre las habilidades motoras.

El aparato del *rotarod* (Panlab) consiste en una barra horizontal (diámetro de 8 cm) que gira alrededor de su eje largo, colocada a una altura de 42 cm y cuya velocidad de giro puede ir cambiando (figura 23).

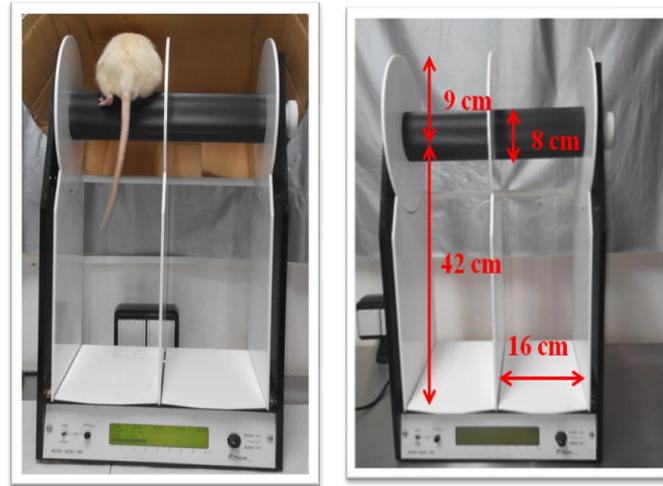


Figura 23. Dispositivo del *rotarod*, junto con sus medidas, utilizado para analizar la coordinación motora.

En este test, el animal se colocaba en la barra y debía caminar hacia adelante para permanecer en posición horizontal y no caerse. Para ello, los animales fueron sometidos a varias sesiones de entreno durante los 4 días previos al test. En cada sesión, de unos 5 minutos por animal y por día, el animal se colocaba sobre la rueda a una velocidad de mantenimiento de 4 revoluciones por minuto (rpm) hasta conseguir que el animal se mantuviera estable caminando sobre la rueda. El día del test la rata se colocaba sobre la rueda, pero en este caso la velocidad iba incrementándose gradualmente, pasando de 4 a 40 rpm en un minuto. Cada rata realizó el test 5 veces, con un intervalo entre cada test de unos 3 minutos. En esta prueba se evaluó el tiempo de permanencia (en segundos) sobre el aparato antes de caer, así como la velocidad alcanzada; el promedio para cada animal fue tomado como medida de coordinación motora.

3.2.3 Sacrificio y obtención de las muestras cerebrales

Al finalizar los tratamientos todos los animales fueron sacrificados mediante decapitación entre las 8:00 y las 9:00 h. Para poder testar la actividad *in vivo* de las enzimas limitantes en la síntesis de monoaminas (uno de los objetivos de la presente tesis doctoral), todos los animales recibieron una dosis efectiva máxima de NSD-1015 (100 mg/kg, i.p., disuelto en suero salino) 30 minutos antes del sacrificio (Esteban et al., 2010a, b; Moranta et al., 2014; Ramis et al., 2016, 2020, 2021a, b; Sarubbo et al., 2015, 2018).

Tras decapitar a las ratas se les extrajo rápidamente el cerebro y se diseccionaron distintas regiones cerebrales sobre un cilindro de aluminio a 4 °C, incluyendo hipocampo, estriado,

corteza y glándula pineal (figura 24). Una vez diseccionadas las diferentes regiones se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su procesamiento. En la presente investigación nos hemos centrado principalmente en el hipocampo y en el estriado para la realización de las posteriores pruebas moleculares por ser regiones implicadas en los test comportamentales descritos previamente. Además, también se obtuvieron muestras de cerebelo, hipotálamo, corteza prefrontal, una porción de tronco encefálico y otras regiones del cuerpo (riñón, hígado, corazón, plasma y músculo pectoral) que pueden resultar útiles para futuros estudios moleculares.

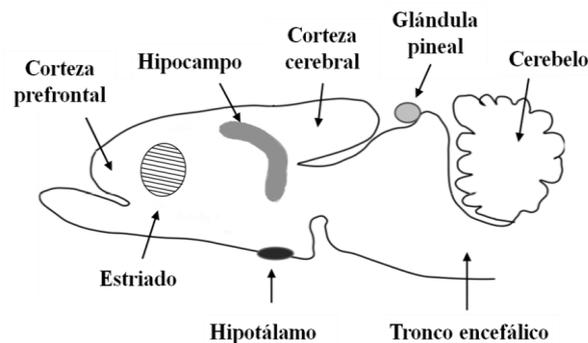


Figura 24. Esquema de las diferentes regiones cerebrales recogidas durante la disección del cerebro.

Las pruebas moleculares que se han utilizado han sido:

- Determinación cromatográfica electroquímica para evaluar la actividad tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) *in vivo* en hipocampo, estriado y glándula pineal.
- Técnica del *western blot* para la detección y cuantificación de la inmunoreactividad de las proteínas SIRT1, NF- κ B total y RbAp48 hipocampales.
- Determinación cromatográfica fluorimétrica para determinar los niveles de α -tocoferol en corteza cerebral.
- Ensayo colorimétrico de los niveles de malondialdehído en corteza cerebral para evaluar la peroxidación lipídica.

A continuación, se detalla el procedimiento seguido en cada una de estas pruebas.

3.2.4 Determinación cromatográfica de la actividad tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) *in vivo*

La actividad *in vivo* de las enzimas tirosina hidroxilasa (TH; tirosina-3-monooxigenasa, EC 1.14.16.2) y triptófano hidroxilasa (TPH; triptófano-5-monooxigenasa, EC1.14.16.4), enzimas limitantes de la síntesis de catecolaminas (dopamina y noradrenalina) y serotonina respectivamente, fue determinada midiendo de forma simultánea la acumulación de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y 5-hidroxitriptófano (5-HTP) en los 30 minutos siguientes a la

inhibición de la enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (figura 25) con una dosis efectiva máxima de NSD-1015 (100 mg/kg, i.p.). Este método de acumulación de precursores de la síntesis de monoaminas es el que se utiliza más comúnmente para valorar la hidroxilación de la tirosina y el triptófano *in vivo* (Carlsson et al., 1972; Nissbrandt et al., 1988).

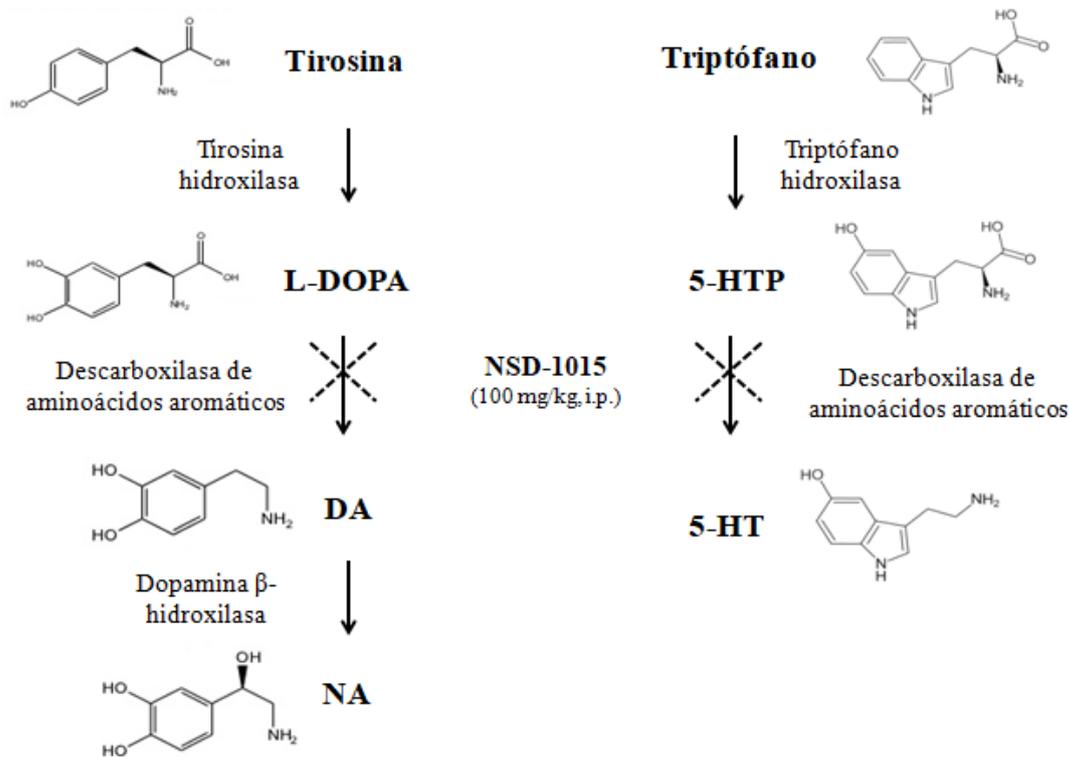


Figura 25. Esquema de la inhibición de la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos mediante el fármaco NSD-1015.

La cantidad de DOPA y 5-HTP formada a partir de la hidroxilación de las enzimas endógenas TH y TPH fueron medidas mediante un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección electroquímica. De esta forma, se determinó la síntesis de DOPA/NA en el hipocampo (región rica en terminales noradrenérgicos) y la síntesis de DOPA/DA en el estriado (región rica en terminales dopaminérgicos). Se analizó también la síntesis de 5-HTP/5-HT mediada por la isoforma TPH-2 en el hipocampo y en el estriado, y la mediada por la TPH-1 en la glándula pineal, para comparar la modulación de ambas isoformas. Además, se cuantificaron simultáneamente la cantidad de los neurotransmisores NA, DA y 5-HT en el tejido, así como los niveles de DOPAC y HVA (los cuales nos informan sobre el metabolismo de la DA en estriado) y los niveles de 5-HIAA (el cual nos proporciona información del metabolismo de la 5-HT en estriado, hipocampo y glándula pineal); sin embargo, este método cromatográfico no permitió determinar metabolitos de la NA.

3.2.4.1 Preparación de las muestras

Para el procesamiento de las regiones de hipocampo y estriado, las muestras fueron pesadas (73.8 ± 1.4 mg y 31.6 ± 2.4 mg respectivamente) y colocadas individualmente en tubos de cristal fríos que contenían 1 ml de tampón de homogenización (HClO_4 0.4 M, K_2EDTA 0.01%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0.1%). A continuación, se utilizó un homogenizador de aspas Ultraturrax (tipo Tp 18/10) a velocidad máxima durante 30 segundos. El homogenado se centrifugó a 40000 g durante 15 minutos a 4 °C (centrífuga refrigerada Biocen 22R) y el sobrenadante se filtró con un filtro de jeringa de teflón de 0.45 μm de diámetro de poro (Millex®-LH; PTFE Hydrophilic) (Esteban et al., 2010a, b; Ramis et al., 2016, 2020, 2021a, b; Sarubbo et al., 2015, 2018).

Para el procesamiento de las glándulas pineales, cada una de las muestras fue colocada individualmente en tubos *ependorf* fríos que contenían 120 μl del mismo tampón de homogenización. A continuación, fueron sonicadas (sonicador Vibra Cell 75185 130 Watt Ultrasonic Processor) durante 10 segundos, a una amplitud del 30%. El homogenado se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos a 4 °C (centrífuga refrigerada Biocen 22R) y el sobrenadante se filtró con un filtro de jeringa de teflón de 0.45 μm de diámetro de poro (Millex®-LH; PTFE Hydrophilic) (Moranta et al., 2014).

Los sobrenadantes filtrados se congelaron a -80 °C hasta el momento de su cuantificación por HPLC con detección electroquímica.

3.2.4.2 Análisis cromatográfico

El HPLC es un tipo de cromatografía en columna utilizada con fines analíticos cuantitativos. En el equipo de HPLC con elución isocrática, la muestra es inyectada en el seno de la fase móvil (eluyente de composición constante durante toda la cromatografía), donde es soluble, y es transportada a través de una fase estacionaria (columna) por el flujo continuo de la fase móvil a alta presión (Hernández, 2005) (figura 26). Así, los distintos componentes de la muestra van a ir interactuando tanto con la fase móvil como con la fase estacionaria y van a ir separándose en función de su polaridad mostrando diferentes tiempos de retención (tiempo transcurrido desde que el compuesto es inyectado hasta que alcanza el detector). En el HPLC en fase reversa, usado en el presente estudio, la fase estacionaria consiste en una matriz de sílica empaquetada que lleva unida covalentemente una cadena alquílica de carbonos. La fase más hidrofóbica es, en este caso, la fase estacionaria (apolar), eluyendo los compuestos hidrofílicos más rápidamente que los hidrofóbicos, que interactúan con la fase estacionaria. A la salida de la columna se encuentra el detector que permite la identificación y la cuantificación de los diferentes componentes de la muestra separados en la columna. El detector electroquímico es un dispositivo que aplica un voltaje determinado con el que se consigue la oxidación de los

diferentes compuestos conforme salen de la columna. La corriente generada a partir de la oxidación es registrada y mediante un procesador de datos se representa la señal obtenida en un gráfico conocido como cromatograma. Cada uno de los componentes oxidados se representa gráficamente como una serie de picos que pueden identificarse gracias al tiempo de retención en la columna; además, cada uno de los picos puede cuantificarse por su altura o área con la ayuda de curvas de calibración realizadas previamente para cada compuesto.

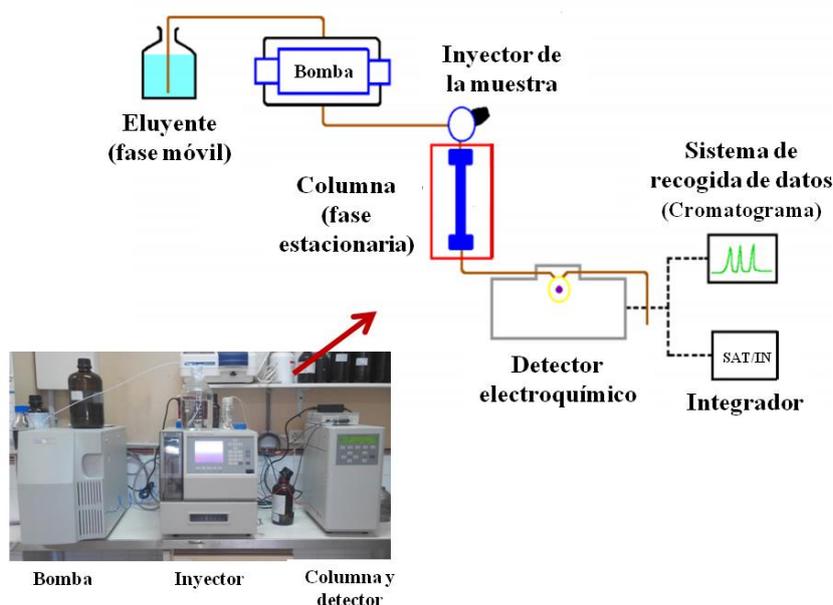


Figura 26. Esquema de los diferentes componentes del equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

En esta investigación, los niveles de los precursores (DOPA y 5-HTP), las monoaminas (DA, NA, 5-HT) y sus metabolitos (HVA, DOPAC, 5-HIAA) fueron determinados por HPLC en fase reversa con detector electroquímico (Waters). Para ello se inyectaron diferentes alícuotas de los sobrenadantes de los homogenados de las muestras cerebrales de estriado (alícuotas de 10 μl), hipocampo (alícuotas de 30 μl) y glándula pineal (alícuotas de 20 μl). Para separar los compuestos anteriormente citados se utilizó una columna en fase reversa Spherisorb S3 ODS1 C18 (3 μm de tamaño de partícula, 4.6 mm x 10 cm; Waters) acoplada a una precolumna Tracer ODS2 C18 (2-5 μm de tamaño de partícula; Teknokroma). La fase móvil (KH_2PO_4 0.1 M, ácido octano sulfónico 2.1 M, K_2EDTA 0.1 M, metanol 10-12% (v/v), pH ajustado a un rango de 2.72-2.76 con H_3PO_4 85%) fue impulsada a un flujo de 0.8 ml/min por una bomba de doble pistón (*Waters 1515 Isocratic HPLC pump*). Los compuestos fueron detectados electroquímicamente manteniendo un potencial aplicado de +0.75 V frente al electrodo de referencia *in situ* (Ag/AgCl) (*Waters 2465 electrochemical detector*). La corriente producida era monitorizada utilizando una interfase tipo *Waters busSAT/IN Module* conectada a un ordenador en

el cual, gracias al software *Empower Pro* (Waters, Barcelona), se pudieron analizar las concentraciones de los diferentes compuestos (figura 27).

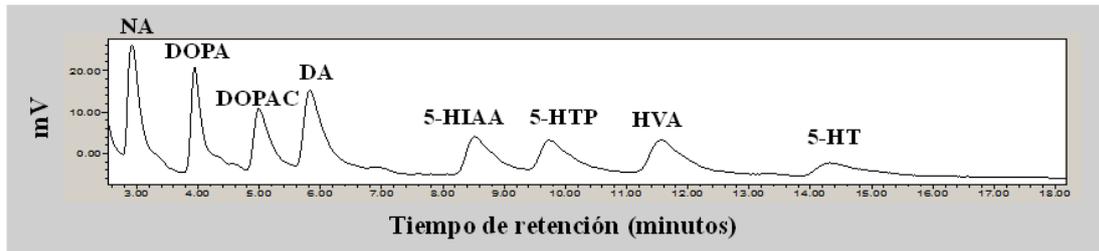


Figura 27. Análisis cromatográfico representativo de uno de los estándares utilizados para la cuantificación de los picos obtenidos para cada uno de los componentes de estudio. En este cromatograma se identifican los siguientes compuestos por orden de aparición: NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HIAA, 5-HTP, HVA y 5-HT (de menor a mayor tiempo de retención en columna).

Las concentraciones de cada uno de los compuestos de estudio en las muestras fueron calculadas interpolando la altura del pico correspondiente con una curva estándar realizada diariamente para cada compuesto con patrones externos, usando el software *Empower Pro* (Waters). Los valores de los compuestos fueron corregidos en función del volumen inyectado en el HPLC para cada región, la dilución de las muestras (ocurrido durante el proceso de homogenización), así como el peso de cada una de las muestras homogenizadas. Los valores de los compuestos se expresaron en nanogramos por gramo de tejido húmedo (ng/g) para hipocampo y estriado; en el caso de las glándulas pineales, los valores de cada compuesto se expresaron como nanogramos por pineal (ng/ pineal) (Esteban et al., 2010a, b; Moranta et al., 2014; Ramis et al., 2016, 2020, 2021a, b; Sarubbo et al., 2015, 2018).

3.2.5 Detección y cuantificación de la inmunoreactividad de proteínas mediante la técnica de western blot.

La técnica del *western blot* es una técnica ampliamente utilizada para la detección e identificación de proteínas usando anticuerpos (figura 28). El proceso se realiza en varios pasos: separación electroforética de las proteínas presentes en la muestra según su peso molecular en geles de poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2=\text{SO}_3^-\text{Na}^+$), técnica conocida como SDS-PAGE (del inglés *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) (Laemmli, 1970); transferencia de las proteínas desde el gel a membranas de nitrocelulosa, soporte que une e inmoviliza las proteínas con el mismo patrón que presentaba el gel original; y la exposición de las membranas con una solución que contiene los anticuerpos que reconocen y se unen a la proteína de interés. Todo el proceso se llevó a cabo tal y como se describe en estudios previos (Álvaro-Bartolomé et al., 2010; García-Fuster et al., 2007, 2008; Keller y García-Sevilla, 2015).



Figura 28. Fotografía del material utilizado para la realización del *western blot*.

3.2.5.1 Preparación de las muestras

Para la detección y cuantificación de las distintas proteínas de estudio se procesaron los hipocampos de los animales sometidos a los diversos tratamientos con el protocolo descrito a continuación. También se procesaron cortezas cerebrales (zona parieto-occipital) de animales de 4 meses para la caracterización de los anticuerpos utilizados.

Las muestras de tejido (hipocampo o corteza) fueron pesadas (aproximadamente 80 mg - 150 mg respectivamente), colocadas individualmente en tubos de cristal y homogenizadas con un homogenizador de aspas Ultraturax (tipo Tp 18/10) en dos ciclos de 10 segundos al 80% de la velocidad máxima, en una proporción 1:15 peso/volumen de tampón de homogenización (50 mM Tris-HCl con pH 6.8, 1 mM EDTA potásico, 2% SDS, con agua bidestilada) que contenía los siguientes inhibidores de proteasas (1%, *Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich P8340): ABESF (1.04 mM), leupeptina (20 μ M), E64 (14 μ M), pepstatina A (15 μ M), bestatina (40 μ M) y aprotinina (0.8 μ M); y los siguientes inhibidores de fosfatasas (1%, *Phosphatase inhibitor cocktail 3*, Sigma-Aldrich P0044, en concentración final 1% v/v): cantaridina, (-)-p-bromolevamisole oxalato y caliculina A. Seguidamente las muestras se sometieron a sonicación (Sonifier 250) por pulsos (dos ciclos de 10 segundos) en frío y, tras agitarlas con vórtex, se separaron 50 μ l del homogenado para realizar la determinación de proteínas de las muestras por el método del ácido bicinonínico (ver apartado “3.2.5.2 Determinación del contenido proteico de las muestras”); el resto del homogenizado se almacenó a -80 °C hasta conocer su concentración proteica. Una vez conocida la concentración de proteínas, cada una de las muestras fue diluida con tampón de homogenización a fin de obtener una concentración de proteínas de 6 μ g/ μ l. De este modo, al diluir 1:1 cada una de las muestras con el tampón de carga 2x (tampón de *Laemmli*; 100 mM Tris-HCl con pH 6.8, 3% SDS, 20% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol, con agua bidestilada), se obtiene una concentración de proteínas final igual a 3 μ g/ μ l. Una vez ajustada la concentración de proteínas de las muestras, se desnaturalizaron calentándolas durante 4 minutos a 95 °C y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

3.2.5.2 Determinación del contenido proteico de las muestras. Método del ácido bicinconínico (BCA)

Se trata de un método para la cuantificación de proteínas sencillo, rápido y muy sensible, el cuál además presenta una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos. Así, debido a la presencia del detergente aniónico SDS en las muestras, la determinación del contenido proteico se llevó a cabo utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA, *Protein Assay Reagent*) que es compatible con una concentración de hasta un 1% de SDS (Smith et al., 1985).

En este método las proteínas reaccionan a través del enlace peptídico con el ión cobre Cu_2^+ reduciéndolo, en medio alcalino, a Cu^+ (reacción de *Biuret*). Dos moléculas de ácido bicinconínico reaccionan con una molécula de Cu^+ para dar una coloración púrpura intensa al medio. Este complejo soluble en agua posee un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm, por lo que la cantidad de proteína de cada muestra vendrá determinada por la intensidad de color púrpura emitida a 562 nm.

Para conocer las concentraciones de proteínas de cada muestra, estos valores se determinaron frente a unos estándares de proteína albúmina bovina sérica (BSA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Para ello se construyó una curva patrón a partir de diferentes diluciones de BSA de concentraciones conocidas en un rango de 0 a 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Por otro lado, en tubos de ensayo se diluyeron 5 μl de muestra con agua bidestilada hasta completar un volumen de 100 μl . Las muestras se procesaron por triplicado y la recta patrón por duplicado. A continuación, se añadieron 2 ml del reactivo BCA compuesto por 50 volúmenes de reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en solución de 0.2N NaOH) y un volumen de B (sulfato de cobre al 4%). Tras la agitación de los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en agitación constante y, posteriormente, se dejaron reposar a temperatura ambiente unos 5 minutos. Finalmente, se midieron los valores de absorbancia en un espectrofotómetro (BioPhotometer) a 562 nm frente a un blanco de reactivo. El espectrofotómetro proporciona automáticamente los valores proteicos de las muestras al extrapolar sus absorbancias con las de la curva patrón mediante regresión no lineal.

3.2.5.3 Electroforesis

Para la separación de las proteínas se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE.

Los geles de poliacrilamida son soportes restrictivos que evitan la convección y minimizan la difusión, además de participar directamente en el proceso de separación de las muestras. Se preparan de modo que sus poros sean de un tamaño comparable al de las proteínas de manera que produzcan un efecto de tamizado molecular. Además, el SDS (presente tanto en el gel de

poliacrilamida como en el tampón de electroforesis) interacciona con la gran mayoría de las proteínas por absorción no específica, formando complejos con características comunes independientemente de la proteína que se trate (aproximadamente una molécula de SDS se une a cada dos residuos de aminoácidos; unos 1.4 g SDS/ g proteína). Como las moléculas de SDS proporcionan una carga negativa (debido a su grupo SO_4^-), las cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas, con lo que los complejos proteína/SDS están cargados negativamente de forma uniforme. Asimismo, mediante el efecto del detergente SDS y del agente reductor β -mercaptoetanol, las proteínas quedan desnaturalizadas permitiendo la separación efectiva de las proteínas ya que se elimina el posible efecto de la conformación molecular en el desplazamiento de las proteínas por el gel. Así, las proteínas solo difieren en su longitud (acorde con el tamaño de cada proteína). De esta forma, en estas condiciones desnaturalizantes, la movilidad electroforética estará en función de la masa molecular de cada proteína ya que la carga es uniforme para todos los complejos proteína/SDS que, además, tienen la misma forma. La separación ocurre principalmente como resultado del tamizado molecular a través del gel, por lo que la concentración de acrilamida en el gel determinará el rango de separación de las proteínas (cuanto menor sea la masa mayor será su recorrido). El campo eléctrico al que se someten las proteínas durante la electroforesis suministra, sencillamente, la fuerza impulsora a través del tamizado molecular. El peso molecular de la proteína en estudio se determina comparando su movilidad electroforética con estándares de peso molecular conocido.

Se utilizaron geles discontinuos de poliacrilamida en los que se pueden diferenciar dos zonas: un gel concentrador de muestras (*stacking gel*), no restrictivo, compuesto por 4% acrilamida/bisacrilamida, 166 mM Tris-HCl con pH 6.8, 0.1% SDS, 0.2% persulfato amónico y 0.08% N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED); y un gel de resolución o separación (*running gel* o *resolving gel*) compuesto por un 10% de acrilamida/bisacrilamida, 0.75 M Tris-HCl con pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% persulfato amónico y 0.05% TEMED (figura 29). Las muestras fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 10% ya que las proteínas de interés de este estudio presentaban un peso molecular comprendido entre 42 y 110 kDa. Los geles tenían un tamaño de 7x10 cm con 1 mm de espesor. En el gel concentrador se introdujeron unos peines de teflón que formaron los 15 carriles donde se cargaron las distintas muestras. Excepto que se indique lo contrario en cada uno de los carriles se cargaron 13.5 μl de muestra (40 μg de proteína). Se reservó al menos uno de los carriles para cargar un marcador estándar coloreado (alícuotas de 3 μl), con unos pesos moleculares adecuados para la determinación e identificación de la banda electroforética correspondiente a la proteína de estudio. Se usó el marcador *Prestained SDS-PAGE standard-broad-range* (*Precision Plus protein standards, all blue*, Bio-Rad) constituido por 8 proteínas preteñidas con azul de bromofenol que abarca un rango de pesos moleculares comprendidos entre 6 y 200 kDa aproximadamente.

Una vez las muestras fueron cargadas en el gel de concentración se sometieron a una corriente continua de 80 voltios durante 20 minutos, y una vez dentro del gel de resolución la intensidad de la corriente se aumentó hasta 120 voltios. El tiempo aproximado de electroforesis fue de unos 90 min, dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar. El tampón de electroforesis en el que estaban inmersos los geles estaba compuesto por: 25 mM Tris base, 0.2 M glicina y 0.1% de SDS, con un pH de 8.5-8.6.

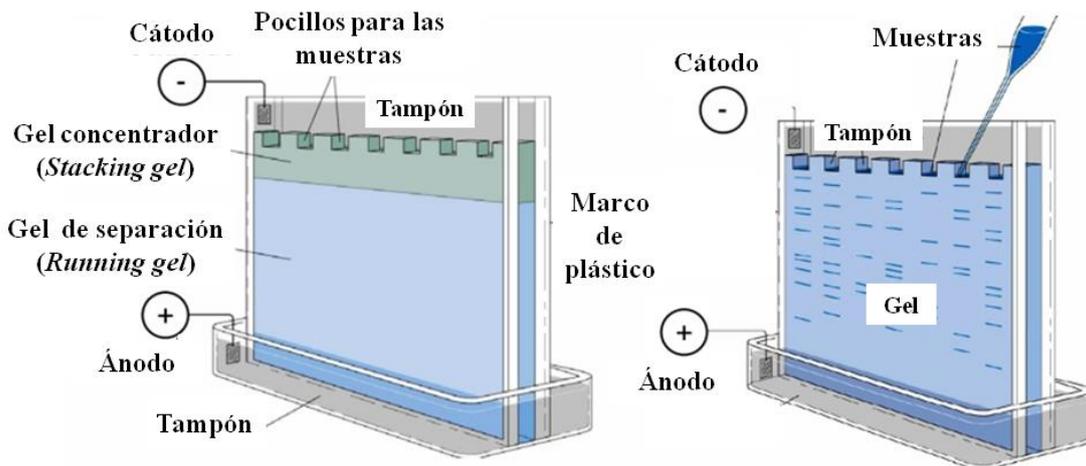


Figura 29. Esquema de un dispositivo para SDS-PAGE, en el aparece el gel concentrador de la muestra (*stacking gel*) y el gel de resolución o separación (*running gel* o *resolving gel*).

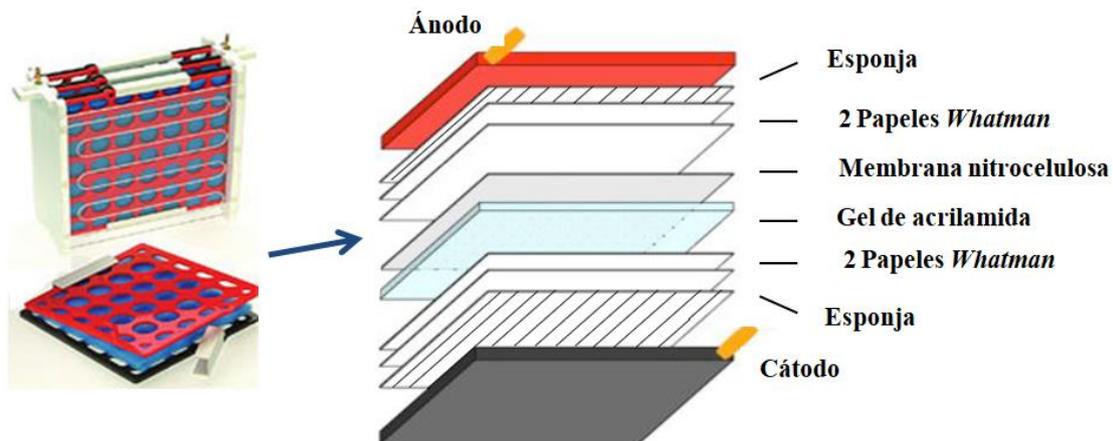


Figura 30. Esquema representativo de los elementos de la electrotransferencia. Se ponen en contacto el gel de poliacrilamida con la membrana de nitrocelulosa, emparedados entre 2-3 filtros *Whatman* y esponjas compresoras, todo ello sujeto por un armazón de plástico.

3.2.5.4 Electrotransferencia (*western blot*) e inmunodetección de las proteínas diana

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.45 μm (Amersham), un medio más estable y rígido que replicará el

patrón de separación de proteínas del gel. El proceso de transferencia del gel a la membrana se realiza aplicando un campo eléctrico perpendicular al plano del gel, proceso conocido como *western blot*. Una vez en la membrana, las proteínas están accesibles (lo que no ocurre en el gel) para interactuar con otras moléculas que permitan su identificación tales como los anticuerpos, técnica que recibe el nombre de *immunoblotting*. Esta técnica se basa en la capacidad que poseen los anticuerpos en reconocer de forma específica determinadas proteínas que actúan como antígenos. Es necesario poseer anticuerpos monoclonales o policlonales capaces de reconocer epítomos de antígenos desnaturalizados. Los anticuerpos se unen al epítomo mediante fuerzas de atracción no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de *Van der Waals*, interacciones iónicas e hidrofóbicas), de modo que el complejo antígeno-anticuerpo está en constante equilibrio con formas libres de ambos componentes.

Para realizar la electrotransferencia, el gel y la membrana de nitrocelulosa se colocan emparedados entre un conjunto de hojas de papel de filtro *Whatman* (3 mm) y en la parte más externa unas esponjas, sujeto por un armazón de plástico, y sumergido en el tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl con pH 8.4, 60 mM glicina, 20% metanol) (figura 30). Hay que garantizar el correcto contacto entre el gel y la membrana de nitrocelulosa para eliminar cualquier burbuja que pueda haberse formado, la cual impediría el correcto proceso de transferencia. La transferencia se realizó a 110 voltios durante dos horas y media aproximadamente, manteniendo la cubeta de transferencia a unos 4 °C durante todo el proceso.

Al finalizar la transferencia, se extrajeron las membranas del *cassette* de transferencia y se lavaron para eliminar el exceso de metanol durante 5 minutos con un tampón TBS (compuesto por: 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, pH 7.6). Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución bloqueadora que consistió en tampón TBS que contenía un 10% de leche en polvo desnatada y 0.1% Tween-20 (monolaurato de polioxietileno(20)-sorbitano, detergente que ayuda a eliminar el ruido de fondo de la membrana). Las proteínas inertes de la solución bloqueadora se unen inespecíficamente a todas las porciones de membrana que no han adsorbido proteínas procedentes del gel tras la electrotransferencia. Este bloqueo evita la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana e incrementa la probabilidad de que solo se unan a sus respectivos antígenos. Tras el bloqueo, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos en tampón TBS-Tween (TBS con 0.1% de Tween-20).

El método de detección utilizado en estos experimentos es el método indirecto. Tras el bloqueo de las uniones inespecíficas, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con el anticuerpo primario de cada proteína a analizar. Para ello, las membranas, una vez lavadas, se incubaron toda la noche a 4 °C con una suave y continua agitación con una solución

bloqueadora (5% leche en polvo y 0.5% BSA en tampón TBS-Tween) que contenía el correspondiente anticuerpo primario (ver apartado “3.1.3 Anticuerpos”).

Tras tres lavados de 5 minutos en agitación con TBS-Tween, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado para que reconozca de forma específica el anticuerpo primario utilizado. Este anticuerpo secundario se obtiene contra inmunoglobulinas de la especie animal en la cual se ha obtenido el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios utilizados en estos experimentos reconocen inmunoglobulinas de conejo o de ratón (en función del primario utilizado). Además, los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados covalentemente a un sistema de detección que en este caso fue un sistema enzimático (concretamente a la peroxidasa de rábano, HRP), el cual al reaccionar con un sustrato específico produce una señal cuantificable (señal quimioluminiscente). Nuevamente se lavaron las membranas 3 veces con TBS-Tween (5 min/lavado), tras lo que se procedió a la detección y cuantificación de la inmunoreactividad mediante un sistema de electroquimioluminiscencia amplificada.

En el caso del control de carga en cada experimento, evaluado mediante la cuantificación del contenido de β -actina, se usaron las mismas membranas que las utilizadas para los otros anticuerpos. Para poder usar las mismas membranas se utilizó la técnica conocida con el nombre de *stripping immunoblot* (Boronat et al., 2001), la cual permite eliminar el sistema de detección inmunológico utilizado previamente (eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios fijados a las proteínas de la membrana) y así poder reutilizar las membranas para la detección de otras proteínas. Para ello, las membranas se rehidrataron y lavaron con tampón TBS-Tween (3 lavados de unos 8 minutos/lavado) y a continuación se pusieron durante 30 minutos a 50 °C en agitación (Unitronic OR) en el tampón de *stripping* (62.5 mM Tris-HCl con pH 6.8, 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS). Tras sucesivos lavados con tampón TBS-Tween, unos 5 lavados de unos 8 minutos hasta eliminar completamente el tampón de *stripping*, se continuó con el bloqueo de uniones inespecíficas mediante una solución bloqueadora (10% leche en polvo desnatada en tampón TBS-Tween). Seguidamente se procedió a re-incubar las membranas (*reprobing*) con los anticuerpos primarios y secundarios adecuados (ver apartado “3.1.3 Anticuerpos”) para conseguir la inmunodetección de la proteína de interés.

3.2.5.5 Sistema de detección

La inmunoreactividad de las proteínas fue detectada mediante un sistema de quimioluminiscencia amplificada (ECL, *Enhanced chemiluminescence*, Amersham). Es un sistema de elevada sensibilidad y resolución basado en la emisión de luz no radioactiva para la detección de antígenos específicos inmovilizados, directa o indirectamente, en una membrana de nitrocelulosa, con anticuerpos secundarios marcados con HRP. Uno de los principales

componentes de estos reactivos es el luminol ($C_8H_7N_3O_2$). La enzima HRP que lleva unido el anticuerpo secundario cataliza la reacción de oxidación del luminol (diacilhidracida cíclica) en presencia de peróxido de hidrógeno (figura 31). Tras esta reacción de oxidación el luminol pasa a un estado de alta energía que es inestable y para volver a su estado basal libera la energía sobrante en forma de luz. La presencia de ciertos productos químicos llamados potenciadores (como por ejemplo los fenoles), incluidos en los reactivos ECL, son capaces de amplificar más de cien veces la intensidad de esta luz emitida y además aumentan el tiempo de emisión de ésta.

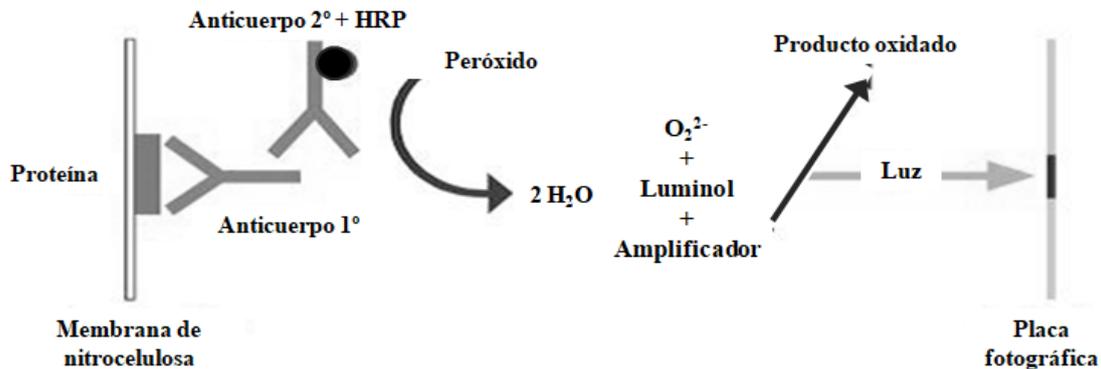


Figura 31. Sistema de detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL. Las membranas de nitrocelulosa son incubadas primero con el anticuerpo primario y seguidamente con el anticuerpo secundario, el cual tiene conjugado la enzima peroxidasa de rábano (HRP). La luz emitida por quimioluminiscencia es detectada al incubar las membranas con los reactivos ECL y exponerlas a una película fotográfica.

Para ello, las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente con los reactivos de ECL (Amersham) en proporción 1:1 en agitación constante. Posteriormente las membranas se secaron con suavidad, se envolvieron en film transparente y se colocaron en un *cassette* (HypercassetteTM, Amersham), el cual permite que las membranas estén en estrecho contacto con la película fotográfica (Hyperfilm, Amersham) donde se recogerá la imagen. La señal quimioluminiscente emitida por este sistema llega a un máximo de intensidad entre los primeros 5-20 minutos y posteriormente decae lentamente con una semivida de emisión de unos 60 minutos (figura 32). La luz emitida a 428 nm puede ser detectada al poner en contacto la membrana de nitrocelulosa (previamente incubada durante dos minutos en agitación con los reactivos de ECL) con una película fotográfica sensible a la luz azul (Hyperfilm, Amersham), durante un periodo de tiempo variable. En el caso de los experimentos presentados en este trabajo el tiempo de exposición fue distinto dependiendo de la proteína a determinar y los anticuerpos utilizados; entre 10 segundos (por ejemplo, para el caso del control de carga de β -actina) y 15 minutos (en el caso de la proteína RbAp48/46).

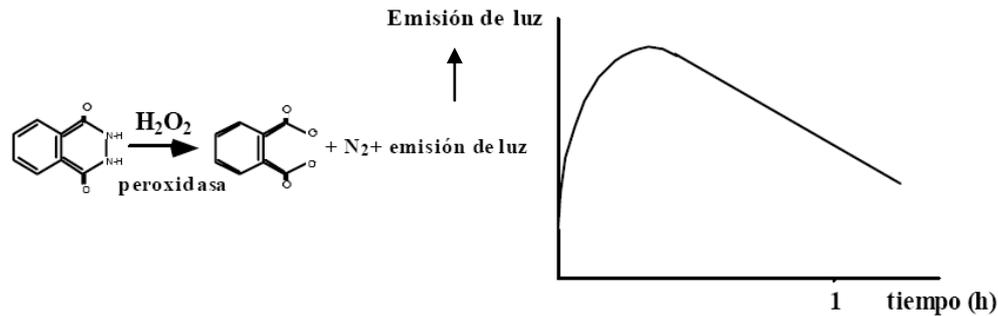


Figura 32. Reacción de oxidación del luminol por acción del peróxido de hidrógeno y catalizado por la peroxidasa de rábano. La luz producida por este sistema llega a un máximo de emisión entre los 5-20 minutos y decae lentamente con una semivida de 1 hora.

3.2.5.6 Cuantificación fotodensitométrica

Una vez revelada la película fotográfica (film), la cuantificación de los autorradiogramas se llevó a cabo mediante un escáner con densitómetro. Para ello, se digitaliza la imagen del film mediante un escáner *GS-800* (Bio-Rad), conectado a un ordenador que contiene el programa *QuantityOne* (Bio-Rad), el cual permite la cuantificación de la intensidad de cada una de las bandas, obteniendo así un valor de densidad óptica integrada (DOI) para cada muestra que resulta de la suma de píxels que forman la banda inmunoreactiva. Un píxel es un punto definido por las coordenadas (x, y, z), donde (x) e (y) son los ejes perpendiculares que sitúan al punto en un plano, y (z) el eje perpendicular a dicho plano que representa la intensidad del punto dentro de una escala de grises de 256 tonalidades.

Además, en los geles también se cargó un marcador molecular (*Prestained SDS-PAGE standard-broad-range*, Bio-Rad), que permitió determinar los pesos moleculares de las distintas bandas observadas en los autorradiogramas.

La cantidad de proteína diana en el hipocampo de ratas sometidas a los distintos tratamientos fue comparada en el mismo gel con el de ratas de su respectivo grupo control. Los experimentos se realizaron cargando alrededor de 40 μ g de proteína que entraba en el rango de linealidad para la inmunodetección de las diferentes proteínas. La cuantificación de cada muestra se realizó al menos 3 veces en diferentes geles, cada gel cargado con muestras cerebrales tanto de ratas de un determinado tratamiento como de su correspondiente grupo control (incluyendo a animales jóvenes y a animales de su misma edad). Finalmente, se calculó la variación en la inmunoreactividad de cada rata (variación de la DOI de cada muestra) sometida a cada tratamiento específico respecto a las muestras control de animales jóvenes (100%) en distintos geles, usándose el valor medio como la estimación final.

En los experimentos de *western blot* se deben tener en cuenta varios factores para poder realizar los análisis cuantitativos. Por una parte debe comprobarse que la carga de proteínas en

cada uno de los pocillos del gel es equivalente. Para este fin, se debe cuantificar una proteína estructural abundante cuya densidad no se vea afectada significativamente por ningún tratamiento; en este caso la proteína de elección fue la β -actina. La segunda cuestión es relativa al propio anticuerpo de la proteína que desea cuantificarse. En la mayoría de los casos el marcaje de las membranas revela la presencia de numerosas bandas inmunorreactivas, por lo que debe identificarse correctamente la banda correspondiente a la proteína de interés. En la figura 33 se muestran dos inmunoblots representativos para β -actina y SIRT1 en muestras de corteza cerebral de rata (como referencia se han identificado las posiciones de los marcadores de peso molecular en un lateral). El anticuerpo monoclonal utilizado para la identificación de la β -actina revela la presencia de una única banda con un peso molecular compatible con los 42 kDa correspondientes a la β -actina. El anticuerpo policlonal contra la SIRT1 revela en este tejido tres bandas nítidas inmunorreactivas con pesos moleculares cercanos a 100, 75 y 50 kDa. De estas tres bandas, la correspondiente a la proteína SIRT1 sería la superior, puesto que la proteína SIRT1 tiene un peso molecular de 110 kDa, siendo esta banda la que se cuantificaría para el estudio.

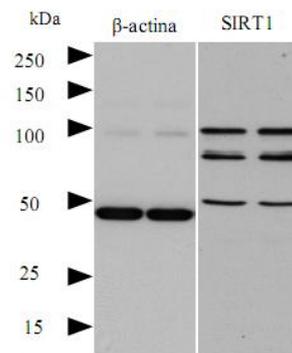


Figura 33. Inmunoblots representativos de β -actina y SIRT1. A la derecha se muestra el inmunoblot correspondiente a la SIRT1, en el que la banda que nos interesa es la de mayor peso molecular (110 kDa). A la izquierda está el inmunoblot de la β -actina, con una única banda correspondiente a la banda de interés (42 kDa). En la imagen aparecen las localizaciones de los marcadores de peso molecular, los cuales nos permiten identificar cada banda.

Además, la intensidad de la señal inmunorreactiva correspondiente a cada una de las bandas es medida en función de la DOI cuantificada sobre el film, como se ha indicado anteriormente. La película fotográfica es sensible a la luz y el grado de impresión es proporcional a la luz emitida durante la reacción quimioluminiscente dentro de un cierto rango (hace falta un mínimo de luz para que comience a impresionarse la película y llegado a un determinado punto la película se satura y no puede incrementarse más la impresión). Debido a ello, es importante utilizar una concentración de proteína que esté dentro del rango de linealidad del sistema de detección. La linealidad de la DOI de cada anticuerpo frente a la concentración de proteína total fue comprobada en un rango comprendido entre 10 y 60 μ g (usando al menos 5 puntos de diferentes contenidos proteicos) para cada anticuerpo; así se asegura poder detectar tanto

incrementos como reducciones en la concentración de la proteína de interés, sin pérdida de la proporcionalidad. En la figura 34 se muestra el resultado del análisis densitométrico del experimento en el cual se cargaron distintas concentraciones crecientes de proteína (10.4, 19.9, 29.6, 40.0, 49.5, 59.3 μg) de una misma muestra (corteza cerebral de rata). En el análisis densitométrico de las bandas, obtenidas tras el inmunoblot con cada uno de los anticuerpos específicos para las proteínas de estudio, se puede observar como existe una relación lineal entre la cantidad de proteína (μg) cargada en el gel y la DOI en todo el rango de proteína utilizado.

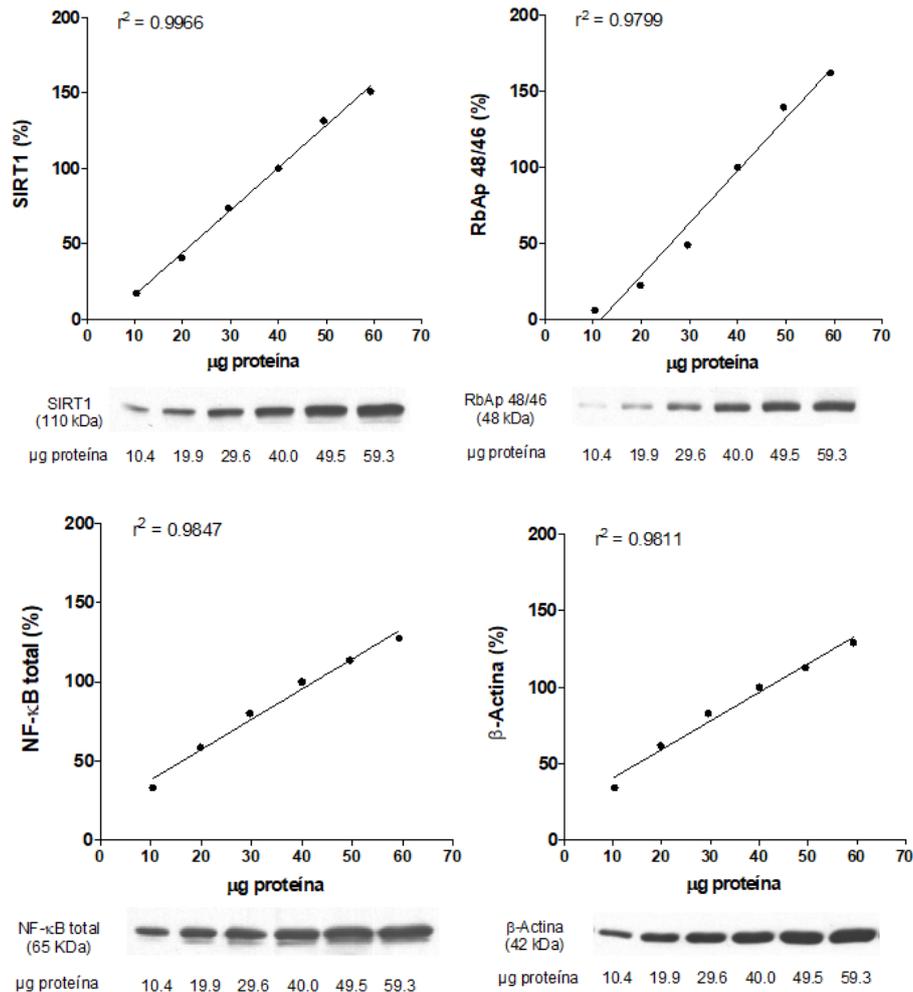


Figura 34. Representación gráfica de la densidad óptica integrada obtenida frente a la cantidad de proteína cargada en el gel para cada una de las proteínas de estudio, incluyendo SIRT1, NF- κ B total, RbAp48/46 y β -actina. Los valores fueron obtenidos mediante el análisis con el programa *Quantity One* de las bandas obtenidas en los geles. En todos los casos se puede observar un coeficiente de linealidad superior a $r^2 > 0.979$.

También se debe tener en cuenta que para poder analizar las monoaminas cerebrales todos los animales recibieron una dosis del fármaco NSD-1015 (100 mg/kg; 30 minutos antes del sacrificio). Es por ello que es necesario corroborar si este fármaco podría inducir algún cambio en la determinación y cuantificación de las proteínas de estudio. Para este fin se analizaron

muestras de hipocampo de animales jóvenes (n=6) tratados con suero salino (1 ml/kg, i.p.) o con NSD-1015 (100 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes del sacrificio. La figura 35 muestra como el fármaco NSD-1015 no indujo ninguna diferencia significativa en las diversas proteínas de interés.

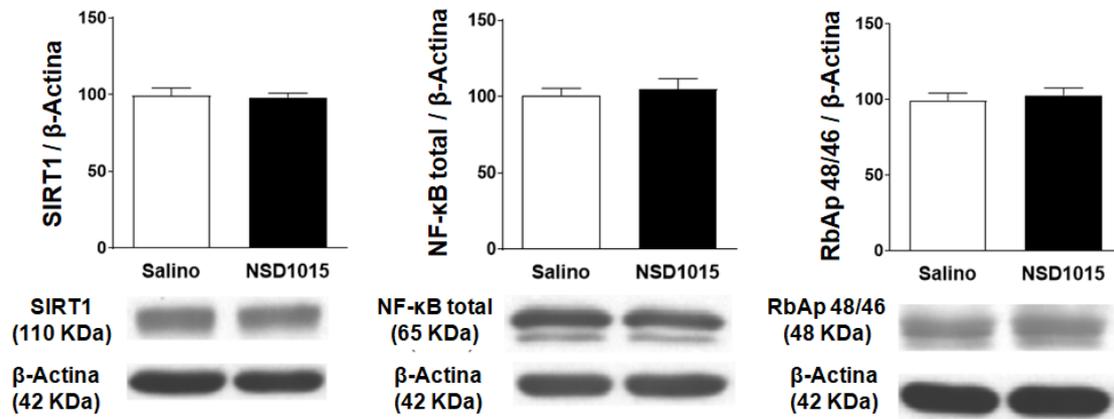


Figura 35. Efecto del fármaco NSD-1015 en cada una de las proteínas de estudio. Se analiza el efecto del fármaco NSD-1015 (100 mg/kg, i.p., n=3) frente a la administración de suero salino (1 ml/kg, i.p., n=3), administrado a animales jóvenes 30 minutos antes del sacrificio, en cada una de las proteínas incluyendo SIRT1, NF-κB total y RbAp48/46. Las barras representan el promedio \pm error estándar de los valores obtenidos mediante el análisis con el programa *Quantity One* de las bandas tras la incubación de cada proteína y el revelado de los geles (t-test de *Student* no detecta diferencias significativas entre los dos grupos).

3.2.6 Determinación de los niveles cerebrales de α -tocoferol y ensayo de peroxidación lipídica (análisis de los niveles de malondialdehído)

En los tratamientos realizados con el antioxidante α -tocoferol, además de los análisis descritos anteriormente (incluyendo la batería de pruebas comportamentales (apartado 3.2.2), el análisis de monoaminas cerebrales mediante HPLC (apartado 3.2.4) y la determinación de proteínas de interés mediante *western blot* (apartado 3.2.5)), se realizó la determinación de los niveles cerebrales de α -tocoferol y un ensayo de peroxidación lipídica analizando los niveles de malondialdehído (MDA). Los protocolos correspondientes son los siguientes:

- *Determinación de los niveles cerebrales de α -tocoferol*: las muestras cerebrales (corteza parieto-occipital) fueron pesadas (aproximadamente 60 mg) y homogenizadas en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) en una proporción 1:10 durante 20 segundos (homogenizador Ultraturrax tipo Tp 18/10, a velocidad máxima). A continuación, se sonicaron durante 10 segundos (sonicador Vibra-Cell 75185 130 Watt *Ultrasonic Processor*, amplitud 30 %). Para la extracción del α -tocoferol se cogieron 250 μ l del homogenado y se pasaron a un tubo de cristal, añadiéndose 250 μ l de H₂O miliQ, 500 μ l de etanol con BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-

methylphenol) 0.02% y 2 ml de hexano. Se agitó con vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos a 4 °C (centrífuga refrigerada Biocen 22R). Se recogió el sobrenadante y se pasó a otro tubo de cristal para evaporar el hexano con un evaporador con corriente de argón durante 10-15 minutos. Seguidamente se resuspendió el precipitado con 200 µl de etanol + BHT 0.02% agitándolo con vórtex durante 30 segundos. Finalmente se filtraron con un filtro de jeringa de teflón de 0,45 µm de diámetro de poro (Millex®-LH; PTFE Hydrophilic) y las muestras filtradas se congelaron a -80 °C hasta el momento de su cuantificación por HPLC con detección fluorimétrica (Tejada et al., 2006). Para determinar los niveles de α -tocoferol en las muestras se utilizó una columna NovaPack (C18, 3.9x150 mm, Waters), a una temperatura de 12-14 °C. La fase móvil (acetonitrilo:tetrahidrofurano:H₂O a una proporción 550:370:80 ml) fue impulsada a un flujo de 1 ml/min por una bomba de doble pistón tipo *Waters 600 controller*. Las condiciones del fluorímetro fueron: excitación a 298 nm y emisión a 328 nm, obteniéndose un tiempo de retención en columna de 3.83±0.05 minutos. El análisis de los cromatogramas se realizó mediante el programa *Empower Pro* (Waters) y el α -tocoferol fue cuantificado comparando con un estándar de concentración conocida. Los resultados fueron expresados como pmol por mg de proteína (Ramis et al., 2016).

- *Ensayo de peroxidación lipídica, análisis de los niveles de malondialdehído*: el MDA es un compuesto ampliamente usado como marcador de peroxidación lipídica, permitiendo analizar el estado de peroxidación mediante un ensayo colorimétrico gracias a la reacción de este compuesto con 1-metil-2-fenilindol. Para la realización del ensayo colorimétrico primero se preparó la dilución de 1-metil-2-fenilindol (10.3 mM) en acetonitrilo:metanol (3:1). A continuación, partiendo del mismo homogenado que en el caso de la determinación de α -tocoferol, se cogieron 350 µl del homogenado, se pasaron a un tubo *ependorf* y se centrifugaron a 9000 g durante 10 minutos a 4 °C (centrífuga Biocen 22R). Seguidamente se cogieron 200 µl del sobrenadante y se pasaron a otro tubo *ependorf*, al que también se añadió 240 µl de la dilución de 1-metil-2-fenilindol. Después de agitar con vórtex durante 3-4 segundos se añadieron 60 µl de HCL (12N), volviendo a agitar con vórtex unos segundos más, incubándose después las muestras durante 1 hora a 45 °C en agitación. Pasado este tiempo, las muestras se enfriaron en hielo durante unos 10 minutos y se volvieron a centrifugar a 15000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue usado para medir la absorbancia a 586 nm (Tejada et al., 2007). Los niveles de MDA fueron cuantificados comparando con un estándar de concentración conocida al que se realizó el mismo procedimiento que las muestras. Los resultados de MDA fueron expresados como pmol por mg de proteína (Ramis et al., 2016).

3.2.7 Análisis estadístico de los resultados

Todas las series de datos fueron analizados con el programa *GraphPad PrismTM*, versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Los resultados son expresados como promedio \pm error estándar de la media. En todos los casos se consideró como estadísticamente significativo un nivel mínimo de probabilidad (p) igual o inferior a 0.05.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante los siguientes análisis: t-test de *Student* (para comparar una misma variable en dos grupos experimentales); análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (para comparar una misma variable en más de dos grupos de animales) y de dos factores (para comparar dos variables en más de dos grupos experimentales), seguidos por un *post-test Bonferroni*. En el test de reconocimiento de objeto nuevo en algunos tratamientos se ha utilizado el test ANOVA de tres factores, debido a la participación de tres variables (objeto, tratamiento y duración), seguido por un test de *Fisher PLSD*.

4. RESULTADOS

4.1 Efectos del envejecimiento sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de rata

El proceso de envejecimiento está asociado con el deterioro de diversas habilidades cognitivas y motoras, así como con la reducción de la actividad de enzimas relacionadas con estas funciones. En este apartado se quieren mostrar los efectos del envejecimiento sobre cada una de las variables analizadas en la presente investigación. Se presentan los resultados obtenidos con animales jóvenes (3 meses), adultos (10 meses) y viejos (20 meses), a fin de poder compararlos y observar los cambios asociados a la edad. En apartados posteriores se mostrarán los efectos de diversos tratamientos sobre animales viejos, por lo que se compararán los efectos respecto a animales viejos control.

4.1.1 Efectos conductuales del envejecimiento

En esta sección aparecen los resultados del estudio del efecto del envejecimiento sobre la memoria de trabajo espacial, el aprendizaje visoespacial y la memoria episódica. Además, se analizó el efecto de la edad sobre la coordinación motora.

4.1.1.1 Memoria de trabajo espacial y aprendizaje visoespacial

La memoria de trabajo espacial, analizada mediante el test del laberinto radial en animales de distintas edades, empeoró significativamente con el envejecimiento (figura 36). Se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de animales respecto del tiempo necesario para completar la prueba ($F_{(2,27)}=22.3$, $p<0.0001$), el número de errores ($F_{(2,27)}=13.1$, $p=0.0001$) y la distancia recorrida ($F_{(2,27)}=5.38$, $p=0.0108$).

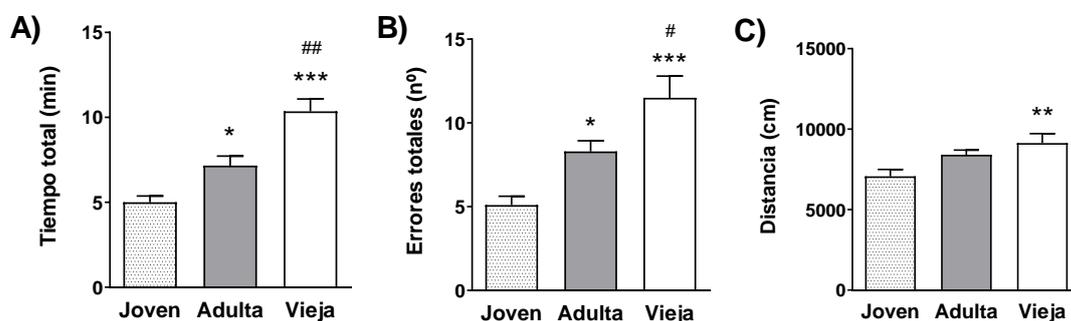


Figura 36. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A), los errores cometidos (B) y la distancia recorrida (C) de animales jóvenes ($n=10$; 3 meses), adultos ($n=10$; 10 meses) y viejos ($n=10$; 20 meses). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo de animales jóvenes; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ al comparar animales adultos con animales viejos (ANOVA de un factor, seguido del test de *Bonferroni*).

Así, los animales jóvenes realizaron el test de forma más eficiente, mientras que los animales adultos requirieron más tiempo para finalizar la prueba (incremento del 43%, $p < 0.05$; figura 36A), cometieron más errores (63%, $p < 0.05$; figura 36B) y recorrieron más distancia (19%, $p > 0.05$; figura 36C). Estas diferencias se incrementaron aún más en los animales viejos; en comparación a los jóvenes, los viejos aumentaron el tiempo (108%, $p < 0.001$), los errores (126%, $p < 0.001$) y la distancia (29%, $p < 0.01$).

El efecto del envejecimiento sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial fue analizado mediante el laberinto de *Barnes*. En estos ensayos se evaluó el tiempo necesario para que los animales localicen la caja de escape (latencia) y el número de errores cometidos (figura 37). Para cada uno de ellos se consideraron dos factores, la edad de los animales y cada uno de los entrenamientos, mediante el análisis de la varianza (ANOVA de dos factores). Los resultados indicaron que la latencia se ve afectada de forma significativa por la edad ($F_{(2,60)} = 9.71$, $p = 0.0002$) y el entrenamiento ($F_{(3,60)} = 12.9$, $p < 0.0001$), así como por la interacción de ambos factores ($F_{(6,60)} = 2.59$, $p = 0.0267$). De modo semejante, los errores cometidos durante la prueba se ven afectados por la edad ($F_{(2,60)} = 7.86$, $p = 0.0009$) y el entrenamiento ($F_{(3,60)} = 5.61$, $p = 0.0018$), pero no por su interacción ($F_{(6,60)} = 0.669$, $p = 0.6747$).

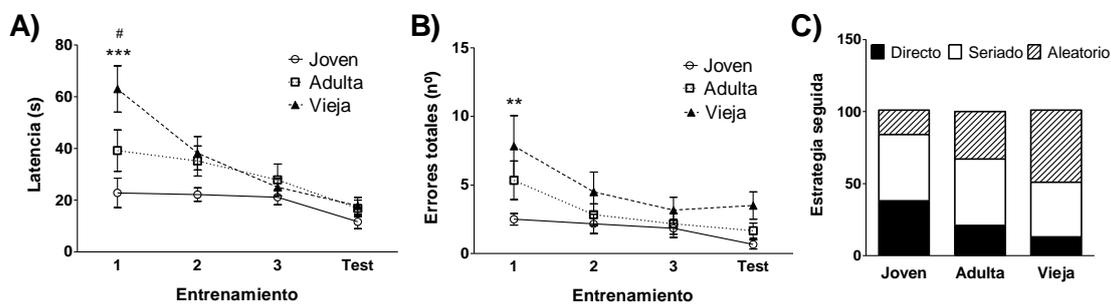


Figura 37. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de *Barnes*. Los puntos representan el valor promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo del test de *Barnes* en los distintos entrenos y el test de animales jóvenes ($n=6$; 3 meses), adultos ($n=6$, 10 meses) y viejos ($n=6$; 20 meses). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar con el grupo de animales jóvenes; # $p < 0.05$ al comparar animales adultos con animales viejos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido del test de *Bonferroni*).

En el primer entrenamiento los animales adultos tardaron más en resolver el laberinto (1.7 veces, $p > 0.05$; figura 37A) y cometieron más errores (2.13 veces, $p > 0.05$; figura 37B) que los jóvenes, lo que indica que los animales jóvenes recuerdan mejor la localización de la caja de escape o *target* aprendida el día anterior durante la fase de familiarización. En los animales viejos estas diferencias fueron más acusadas (latencia: aumento de 2.7 veces, $p < 0.001$; errores realizados: 3.13 veces, $p < 0.01$). En cuanto a las estrategias seguidas para localizar la caja de

escape, la estrategia más eficiente es la directa, seguida de la seriada y la menos eficiente es la aleatoria. Como puede observarse en la figura 37C, los animales jóvenes siguen principalmente las estrategias directa y seriada, mientras que con el envejecimiento se disminuye el uso de la estrategia directa y se incrementa la aleatoria.

4.1.1.2 Memoria episódica

La memoria episódica se analizó mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Durante la fase de familiarización (figura 38A) se contabiliza el tiempo de exploración de dos objetos idénticos. El ANOVA de dos factores no mostró diferencias significativas respecto al tiempo de exploración de ambos objetos, es decir que los animales no muestran preferencia por ninguno de ellos ($F_{(1,54)}=0.0285$, $p=0.8666$). Asimismo, el tiempo de exploración está influenciado por la edad de los animales ($F_{(2,54)}=77.2$, $p<0.0001$), mostrándose una disminución progresiva de la exploración de los objetos (figura 38A) con la edad (reducción del 42% en animales adultos ($p<0.001$) y del 61% en viejos ($p<0.001$) en comparación a los jóvenes). Por otra parte, no se detectó una interacción de los dos factores analizados ($F_{(2,54)}=0.266$, $p=0.7675$).

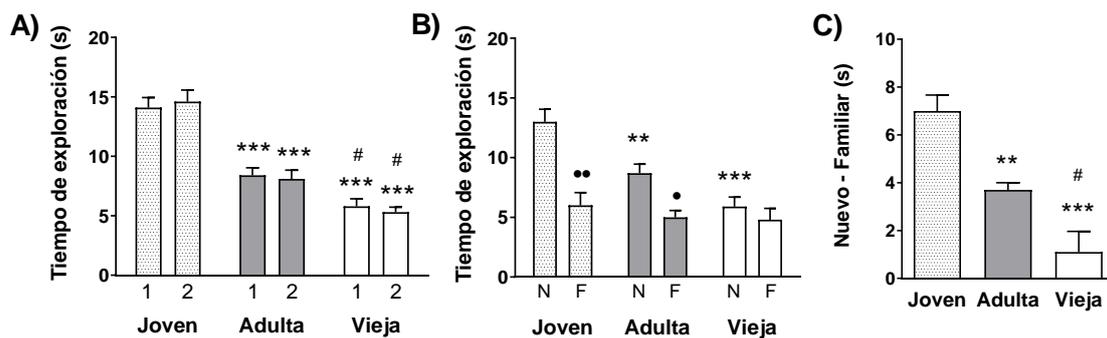


Figura 38. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (B: N, objeto nuevo; F, objeto familiar), así como la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar en la fase de test (C) de animales jóvenes ($n=10$, 3 meses), adultos ($n=10$, 10 meses) y viejos ($n=10$; 20 meses). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con animales jóvenes; # $p<0.05$ al comparar animales adultos y viejos; • $p<0.05$, •• $p<0.01$ al comparar los tiempos de los correspondientes objeto nuevo y objeto familiar (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*; C: ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

En la fase de test (figura 38B), en la cual se compara el tiempo de exploración del objeto familiar (objeto de las mismas características que en la fase de familiarización) y el objeto nuevo (objeto de características diferentes a las de la fase de familiarización), se puede observar cómo los animales mostraron una preferencia por explorar el objeto nuevo ($F_{(1,54)}=29.7$, $p<0.0001$). Asimismo, la capacidad exploratoria dependió de la edad ($F_{(2,54)}=11.3$, $p<0.0001$) y de la interacción ambos factores ($F_{(2,54)}=5.59$, $p=0.0062$). Los animales jóvenes son los que

tienen una mayor capacidad discriminativa entre el objeto nuevo y el objeto familiar (diferencia del tiempo de exploración del objeto nuevo y el objeto familiar del 54%, $p < 0.01$). Esta capacidad va disminuyendo con la edad, siendo menor en los animales adultos (diferencia del 42%, $p < 0.05$) y llegando a no detectarse ya una diferencia significativa entre el tiempo de exploración de los dos objetos en los animales viejos. En relación a lo comentado anteriormente, se detectaron cambios significativos en la diferencia del tiempo de exploración del objeto nuevo menos el del familiar en la fase de test (figura 38C) entre los 3 grupos de animales ($F_{(2,27)}=20.5$, $p < 0.0001$). Así, la diferencia del tiempo de exploración entre los objetos se reduce a la mitad ($p < 0.01$) en los animales adultos y es 6 veces inferior ($p < 0.001$) en los animales viejos en comparación a los jóvenes.

4.1.1.3 Coordinación motora

La coordinación motora se analizó mediante el test del *rotarod* (figura 39). Tras la fase de habituación a la rueda giratoria (a velocidad constante de 4 rpm), en la fase de test se aplica una aceleración (de 4 a 40 rpm en 60 segundos) y se registra el tiempo de permanencia. El análisis estadístico muestra una disminución significativa del tiempo de permanencia con la edad ($F_{(2,27)}=3.37$, $p=0.0492$). Los animales jóvenes permanecieron más tiempo sobre la rueda giratoria antes de caer (con un promedio de 40.6 ± 1.62 segundos) y alcanzaron la mayor velocidad (29.3 ± 1.03 rpm), mientras que los animales viejos redujeron el tiempo de permanencia (24%, $p < 0.05$) y alcanzaron una velocidad máxima de 22.6 ± 1.3 rpm.

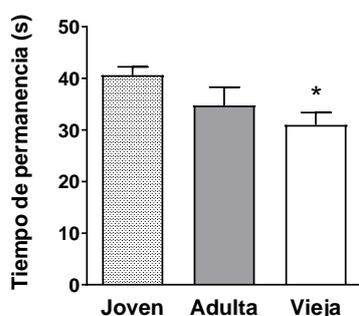


Figura 39. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la coordinación motora analizada mediante el test del *rotarod*. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de permanencia sobre la rueda giratoria de animales jóvenes ($n=10$; 3 meses) adultos ($n=10$; 10 meses) y viejos ($n=10$; 20 meses). * $p < 0.05$ al comparar con animales jóvenes (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.1.2 Efectos del envejecimiento sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo

En esta sección se muestran los efectos del envejecimiento sobre la actividad de las enzimas limitantes de la síntesis de catecolaminas (tirosina hidroxilasa, TH) e indolaminas (triptófano hidroxilasa, TPH), al cuantificar la acumulación de DOPA y 5-HTP respectivamente (como se explica en el apartado “3.2.4 Determinación cromatográfica”). También se cuantificaron los neurotransmisores DA, NA y 5-HT, así como los metabolitos HVA, DOPAC y 5-HIAA en extractos cerebrales mediante HPLC con detección electroquímica.

4.1.2.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

En el hipocampo, se pudo observar una reducción progresiva (figura 40) de la acumulación de DOPA con la edad ($F_{(2,15)}=39.6$, $p<0.0001$), lo que indica una disminución de la actividad de la enzima TH, asociándose a una reducción del contenido de NA ($F_{(2,15)}=39.1$, $p<0.0001$). Los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles de DOPA y NA hipocampal, mientras que en animales adultos se observa una reducción moderada de DOPA (19%, $p<0.05$; figura 40A) y NA (15%, $p<0.05$; figura 40B), que se hace mucho más apreciable en animales viejos (DOPA: disminución del 57%, $p<0.001$; NA: 48%, $p<0.001$).

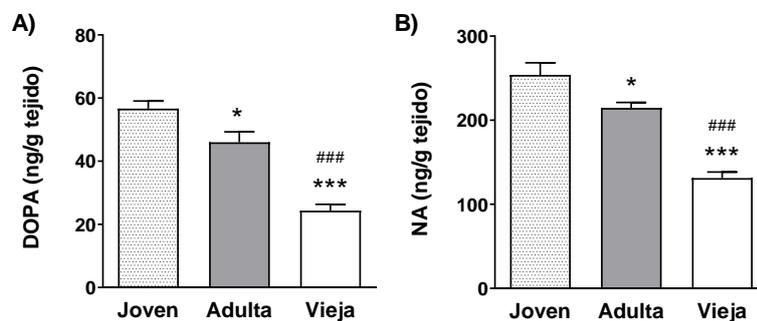


Figura 40. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (tras inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y de los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales jóvenes ($n=6$; 3 meses), adultos ($n=6$; 10 meses) y viejos ($n=6$; 20 meses). * $p<0.05$, *** $p<0.001$ al comparar con animales jóvenes; ### $p<0.001$ al comparar adultos y viejos (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

De modo semejante, en el estriado también se observó una disminución significativa de la actividad de la enzima TH con el envejecimiento (figura 41), asociado a una menor acumulación de DOPA ($F_{(2,15)}=134$, $p<0.0001$) y del contenido de DA ($F_{(2,15)}=111$, $p<0.0001$), así como de los metabolitos HVA ($F_{(2,15)}=27.5$, $p<0.0001$) y DOPAC ($F_{(2,15)}=16.9$, $p<0.0001$). Los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles, mientras que los animales adultos muestran una reducción de DOPA (30%, $p<0.001$; figura 41A), DA (20%, $p<0.001$; figura 41B) y sus correspondientes metabolitos HVA (26%, $p<0.001$; figura 41C) y DOPAC (13%, $p>0.05$; figura 41D). En animales viejos estas reducciones se hacen más patentes respecto a los jóvenes, tanto en DOPA (74%, $p<0.001$), DA (57%, $p<0.001$), HVA (41%, $p<0.001$), como en DOPAC (50%, $p<0.001$).

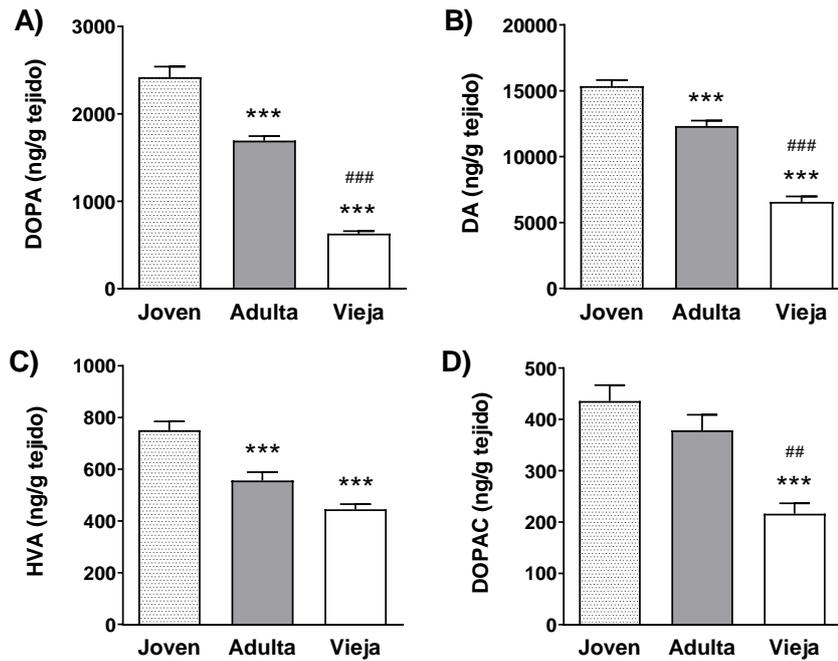


Figura 41. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la actividad de la enzima TH en el estriado. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A), los niveles de DA (B) y sus metabolitos HVA (C) y DOPAC (D) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de animales jóvenes ($n=6$; 3 meses), adultos ($n=6$, 10 meses) y viejos ($n=6$; 20 meses). *** $p<0.01$ al comparar con animales jóvenes; ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ al comparar animales adultos y viejos (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.1.2.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, el estriado y la glándula pineal

En el hipocampo, se observó una disminución significativa de la acumulación de 5-HTP con la edad ($F_{(2,15)}=36.1$, $p<0.0001$; figura 42), coherente con una reducción progresiva de la actividad de la enzima TPH-2. Como consecuencia, se produjo una disminución del contenido de 5-HT ($F_{(2,15)}=41$, $p<0.0001$) y de su metabolito 5-HIAA ($F_{(2,15)}=9.86$, $p=0.0018$). Así, en animales adultos se observa una reducción moderada del precursor 5-HTP (17%, $p<0.05$; figura 42A), el neurotransmisor 5-HT (37%, $p<0.001$; figura 42B) y su metabolito 5-HIAA (19%, $p<0.05$; figura 42C). Estas disminuciones se hacen más acusadas en animales viejos (5-HTP: 47%, $p<0.001$; 5HT: 50%, $p<0.001$; 5-HIAA: 28%, $p<0.01$).

Los resultados obtenidos a partir de extractos del cuerpo estriado también evidenciaron una disminución de la actividad de la TPH-2 con la edad (figura 43), que se reflejó en una reducción en la acumulación de 5-HTP ($F_{(2,15)}=27.5$, $p<0.0001$), del contenido de 5-HT ($F_{(2,15)}=80.4$, $p<0.0001$) y de su metabolito 5-HIAA ($F_{(2,15)}=7.56$, $p=0.0054$). Los animales jóvenes son los que presentan niveles más elevados, mientras que los adultos mostraron una disminución de 5-HTP (19%, $p<0.05$; figura 43A), 5-HT (18%, $p<0.05$; figura 43B) y su metabolito 5-HIAA

(20%, $p > 0.05$; figura 43C). La reducción fue mayor en los animales viejos en comparación a los animales jóvenes, tanto del precursor 5-HTP (48%, $p < 0.001$), como de 5-HT (65%, $p < 0.001$) y 5-HIAA (30%, $p < 0.01$).

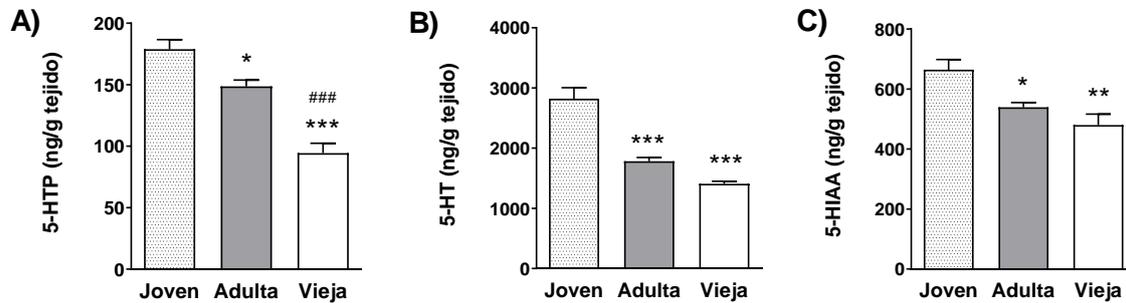


Figura 42. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (después de la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A), los niveles de 5-HT (B) y su metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales jóvenes ($n=6$; 3 meses), adultos ($n=6$; 10 meses) y viejos ($n=6$; 20 meses). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar con animales jóvenes; ### $p < 0.001$ comparando animales adultos y viejos (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

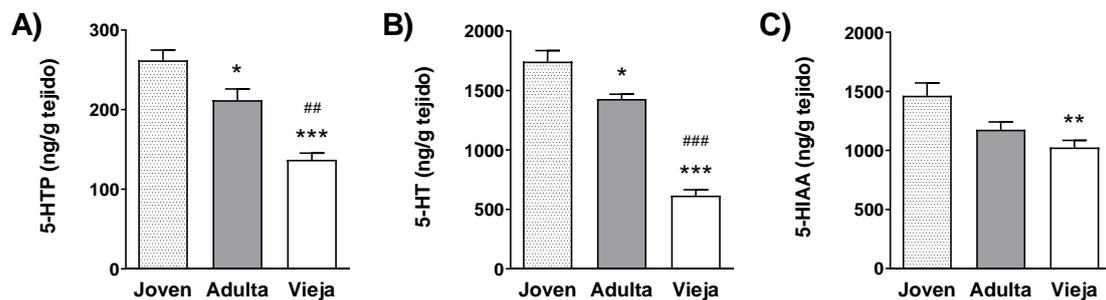


Figura 43. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y su metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de animales jóvenes ($n=6$; 3 meses), adultos ($n=6$; 10 meses) y viejos ($n=6$; 20 meses). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar con animales jóvenes; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ al comparar animales adultos y viejos (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

En la glándula pineal (figura 44), se puede apreciar una disminución de la actividad de la vía de las indolaminas por reducción de la actividad de TPH-1, con una menor disponibilidad de 5-HTP ($F_{(2,15)}=28.7$, $p < 0.0001$) y la consecuente disminución de 5-HT ($F_{(2,15)}=16.6$, $p=0.0002$) y su metabolito 5-HIAA ($F_{(2,15)}=23.1$, $p < 0.0001$). Se observan considerables reducciones en animales adultos de 5-HTP (45%, $p < 0.001$; figura 44A), 5-HT (54%, $p < 0.01$; figura 44B), y 5-HIAA (67%, $p < 0.001$; figura 44C) en comparación a los jóvenes. En animales viejos esta disminución es más evidente (5-HTP: 61%, $p < 0.001$; 5-HT: 67%, $p < 0.001$; 5-HIAA: 86%, $p < 0.001$).

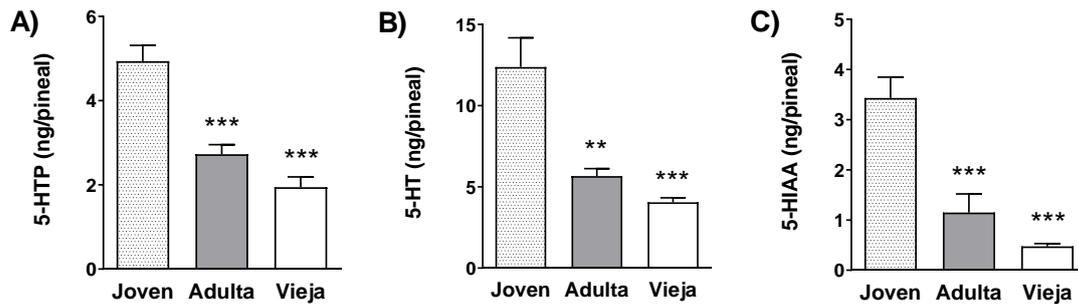


Figura 44. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y del metabolito 5-HIAA (C) en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de los animales jóvenes (n=6; 3 meses), adultos (n=6, 10 meses) y viejos (n=6; 20 meses). **p<0.01, ***p<0.001 al comparar con animales jóvenes (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.1.3 Efectos del envejecimiento sobre la inmunoreactividad de las proteínas *SIRT1*, *NF- κ B* y *RbAp48/46* en el hipocampo

Esta sección recoge los resultados del análisis de la expresión de tres proteínas claves en procesos relacionados con el envejecimiento, la inflamación y la pérdida de memoria con la edad (*SIRT1*, *NF- κ B* y *RbAp48/46*). El estudio se ha centrado en el hipocampo por ser una región íntimamente relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria. La detección y cuantificación de las proteínas diana se realizó mediante técnicas inmunológicas cuantitativas (separación electroforética seguida de *western blot*), utilizando anticuerpos específicos. En las figuras, los niveles de cada una de las proteínas se muestran normalizados respecto de los niveles de β -actina medidos en el mismo gel. Se considera como valor de referencia el obtenido en las ratas jóvenes (para más detalles consultar el apartado “3.2.5.6 Cuantificación fotodensitométrica”).

4.1.3.1 Efectos de la edad sobre la proteína *SIRT1*

La figura 45 muestra el efecto de la edad sobre la expresión de la proteína *SIRT1* (110 kDa) en el hipocampo de animales jóvenes, adultos y viejos. Los resultados indican que existen diferencias significativas a causa del envejecimiento ($F_{(2,9)}=16.59$, $p<0.0010$). Puede observarse una reducción paulatina de *SIRT1* con la edad, con una disminución del 24% ($p<0.05$) en los animales adultos y del 43% ($p<0.001$) en los viejos al comparar con los niveles de los jóvenes.

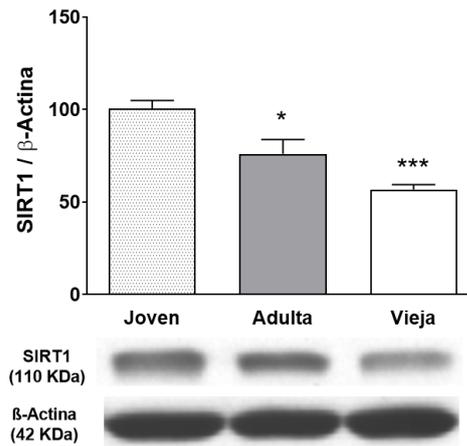


Figura 45. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en hipocampo. Se determinaron los niveles de SIRT1 en extractos procedentes de hipocampo de animales jóvenes (n=4; 3 meses), adultos (n=4, 10 meses) y viejos (n=4; 20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ al comparar con animales jóvenes (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo en el que puede observarse la disminución de SIRT1, sin cambios en la β -actina (utilizada como patrón de carga).

4.1.3.2 Efectos de la edad sobre la proteína NF- κ B p65 total

La determinación de NF- κ B en el hipocampo de animales de los tres grupos de edad (figura 46) no mostró diferencias significativas respecto de la inmunoreactividad de la proteína NF- κ B total ($F_{(2,9)}=0.779$, $p=0.4777$), de modo que, con la metodología seguida en este estudio, no se observaron variaciones apreciables de esta proteína con la edad.

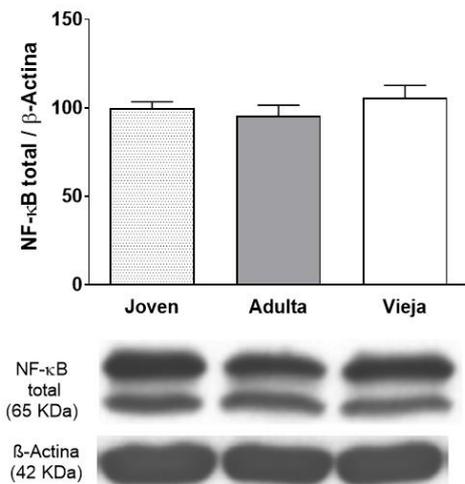


Figura 46. Efecto del envejecimiento en ratas sobre la expresión de la proteína NF- κ B total (65 kDa) en hipocampo. Se determinaron los niveles de NF- κ B total en extractos procedentes de hipocampo de animales jóvenes (n=4; 3 meses), adultos (n=4, 10 meses) y viejos (n=4; 20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes. No se observan cambios significativos en ninguno de los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo de NF- κ B total, sin cambios en la β -actina (utilizada como patrón de carga).

4.1.3.3 Efectos de la edad sobre la proteína RbAp48/46

La expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en el hipocampo (figura 47) de animales jóvenes, adultos y viejos mostró niveles de inmunoreactividad significativamente distintos considerando los tres grupos de edad ($F_{(2,9)}=7.013$, $p < 0.0146$). Los animales jóvenes presentaron los mayores niveles de esta proteína, los animales adultos mostraron una ligera reducción en los niveles de inmunoreactividad de RbAp48/46 (19%, $p > 0.05$), y los animales viejos mostraron una disminución significativa (37%, $p < 0.05$) respecto a los animales jóvenes.

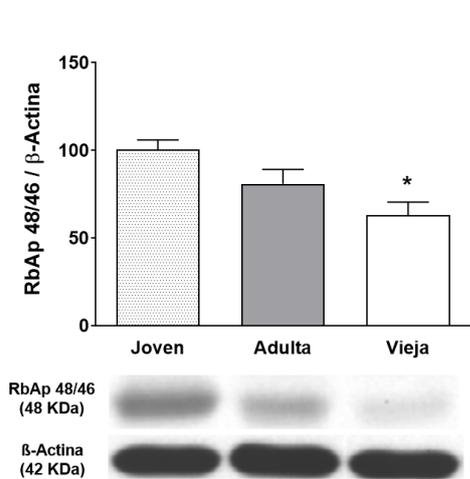


Figura 47. Efecto progresivo del envejecimiento en ratas sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en hipocampo. Se determinaron los niveles de RbAp48/46 en extractos procedentes de hipocampo de animales jóvenes ($n=4$; 3 meses), adultos ($n=4$, 10 meses) y viejos ($n=4$; 20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de n experimentos por grupo (realizados por cuadruplicado) y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes. * $p<0.05$ al comparar con animales jóvenes (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo en el que puede observarse la disminución de RbAp48/46, sin cambios en la β -actina (utilizada como patrón de carga).

4.2 Efectos del tratamiento con antioxidantes y de la restricción calórica en ratas adultas

Numerosos estudios han mostrado cómo el tratamiento con antioxidantes puede ayudar a retrasar la aparición de algunos efectos adversos asociados al envejecimiento. En este capítulo se pretenden analizar los posibles efectos beneficiosos del tratamiento con el antioxidante resveratrol sobre las habilidades cognitivas de animales adultos (10 meses), en los cuales ya se puede apreciar un cierto deterioro de las capacidades cognitivas (tal y como se ha observado en el apartado 4.1), y su comparación con la restricción calórica (intervención no farmacológica que ha mostrado efectos beneficiosos incrementando la esperanza de vida y amortiguando los efectos del envejecimiento sobre la salud).

4.2.1 Efectos de los tratamientos agudos con los antioxidantes *trans-resveratrol*, *α -tocoferol*, *catequina* y *poliphenon 60* sobre las habilidades cognitivas en ratas adultas

En primer lugar, se analizó si los tratamientos agudos con diversos antioxidantes (*trans-resveratrol*, *α -tocoferol*, *catequina* y *poliphenon 60*) eran capaces de producir mejoras sobre las habilidades cognitivas de animales adultos, de la misma manera que se observó previamente con algunos fármacos administrados de forma aguda, como la hormona de crecimiento (GH, 1mg/kg, i.p.) que mostró una mayor eficiencia en la ejecución de diversas pruebas respecto al grupo control (Ramis et al., 2013). En el caso de los antioxidantes, se ha utilizado el test del laberinto radial para evaluar los posibles efectos del tratamiento agudo con varios antioxidantes (cada uno administrado a una dosis de 20 mg/kg, i.p., disuelto en aceite de maíz, 1 hora antes de la realización del test, $n=5$) frente a animales control (a los que se administró aceite de maíz, 1 ml/kg, i.p., $n=6$) sobre la memoria de trabajo espacial en ratas adultas (10 meses). La figura 48 muestra los resultados obtenidos, no apreciándose cambios significativos en ninguno de los tratamientos agudos en el tiempo ($F_{(4,21)}=0.824$, $p=0.5238$), los errores cometidos ($F_{(4,21)}=0.417$,

$p=0.7945$) o la distancia recorrida ($F_{(4,21)}=0.705$, $p=0.5971$), lo que descarta efectos agudos debido a la última dosis recibida en los tratamientos crónicos.

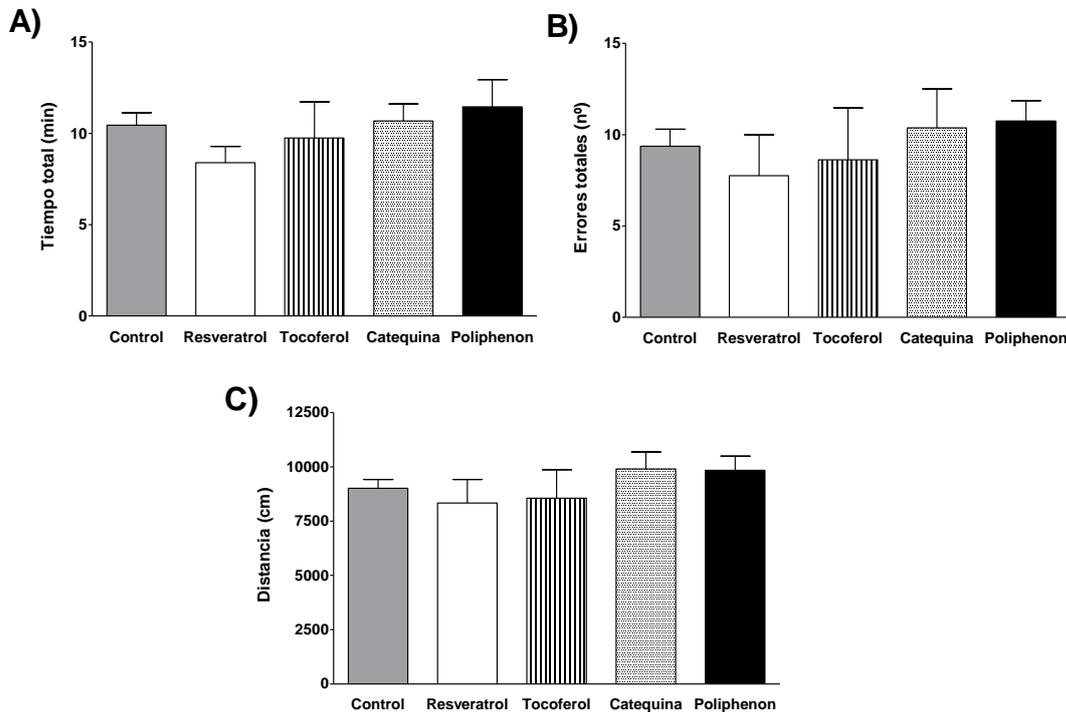


Figura 48. Efecto del tratamiento agudo con los antioxidantes *trans*-resveratrol, α -tocoferol, catequina y poliphenon 60 sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial en animales adultos (10 meses). Cada uno de los antioxidantes fue administrado 1 hora antes de la ejecución del test, a una dosis de 20 mg/kg (i.p., disueltos en aceite de maíz, $n=5$ por tratamiento). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo (A), los errores (B) y la distancia recorrida (C) de los animales tratados con los antioxidantes y el grupo control ($n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

4.2.2 Efectos de la restricción calórica y del tratamiento con resveratrol en las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas adultas

En la sección anterior se observa cómo la administración de una dosis aguda con varios antioxidantes en animales adultos no es suficiente para producir cambios a nivel conductual (memoria de trabajo espacial). En este apartado se pretende analizar el efecto de un tratamiento administrado durante más tiempo (15 días) a ratas adultas. En este caso el antioxidante seleccionado es el polifenol *trans*-resveratrol (RES) (20 mg/kg/día), antioxidante que ha mostrado efectos beneficiosos en animales de edades avanzadas (Sarubbo et al., 2015), y que ha sido clasificado como un mimético de la restricción calórica (RC). Por ello, se quiso comparar el efecto del polifenol RES con una terapia de RC (metodología detallada en el apartado 3.2.1.1).

4.2.2.1 Efectos de la restricción calórica y el resveratrol en el peso y la temperatura corporal

La RC está asociada a una disminución del peso corporal, tal y como se puede observar en la figura 49. El grupo de animales adultos sujetos a RC fue sometido a una disminución de la ingesta de calorías del 80% durante los primeros 25 días (ingiriendo 4.5 ± 0.5 g pellet/día), consiguiendo así una reducción del 25% del peso corporal. En los 15 días siguientes la reducción de la ingesta calórica fue del 40% (ingiriendo 11.5 ± 2.5 g pellet/día), manteniendo el porcentaje del peso corporal en torno al 75%.

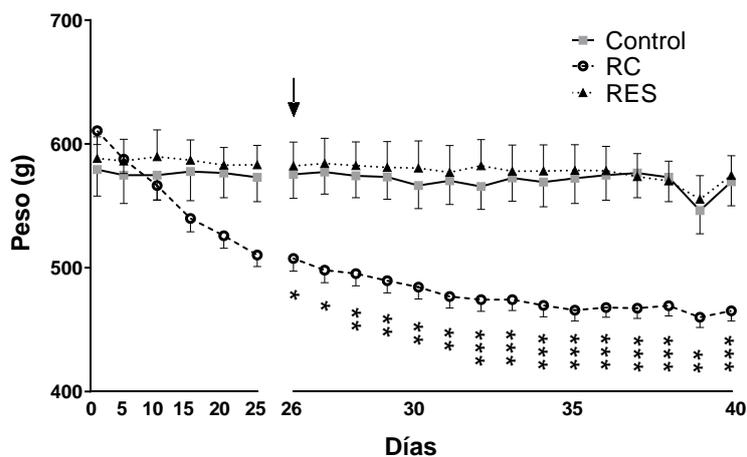


Figura 49. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol en el peso corporal de animales adultos (10 meses). Los puntos representan el promedio \pm error estándar del peso corporal (g) de los animales sometidos a restricción calórica (RC; n=7; reducción de la ingesta calórica del 80% durante los primeros 25 días y del 40% los siguientes 15 días) y los animales tratados con el antioxidante *trans*-resveratrol (RES; n=6; 20 mg/kg, i.p., disuelto en aceite de maíz) junto a los animales control (n=6; aceite de maíz, 1 ml/kg, i.p.). La flecha indica el inicio del tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol. La disminución de peso de los grupos en el día 39 se debe al ayuno al que son sometidos los animales para realizar el test del laberinto radial. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar con los animales del grupo control (ANOVA de dos factores, seguido del test de *Bonferroni*).

Los animales tratados con el antioxidante RES (20 mg/kg, i.p., disuelto en aceite de maíz) y los animales del grupo control (a los que se les administró el vehículo aceite de maíz, 1 ml/kg/día, i.p.) tuvieron siempre acceso a la comida y no mostraron diferencias significativas en el peso corporal (variación de 8.2 ± 3.1 g en el grupo control y 7.7 ± 2.4 g en las ratas tratadas con RES comparando el primer y el último día de tratamiento) ni en la cantidad de comida ingerida (con un consumo de 20.55 ± 1.25 g pellet/día) a lo largo del tratamiento. El análisis estadístico mostró que los resultados están condicionados por el tratamiento ($F_{(2,336)}=153$, $p < 0.0001$) y por la duración ($F_{(20,336)}=3.47$, $p < 0.0001$), así como por su interacción ($F_{(40,336)}=1.96$, $p=0.0008$). Además, en la figura 49 puede apreciarse una disminución del peso el día previo a la realización del test del laberinto radial debido al ayuno al que son sometidos para aumentar la motivación en la prueba.

Los resultados obtenidos de la temperatura corporal muestran que todos los animales presentan una regulación circadiana de la temperatura (figura 50A). Además, los animales tratados con RES y los controles no mostraron cambios significativos a lo largo del tratamiento en los valores mesor diarios de temperatura corporal (37.15 ± 0.06 °C; figura 50B). Sin embargo, en los animales sujetos a RC existió una reducción significativa, alcanzando valores mesor de temperatura de 36.5 ± 0.07 °C.

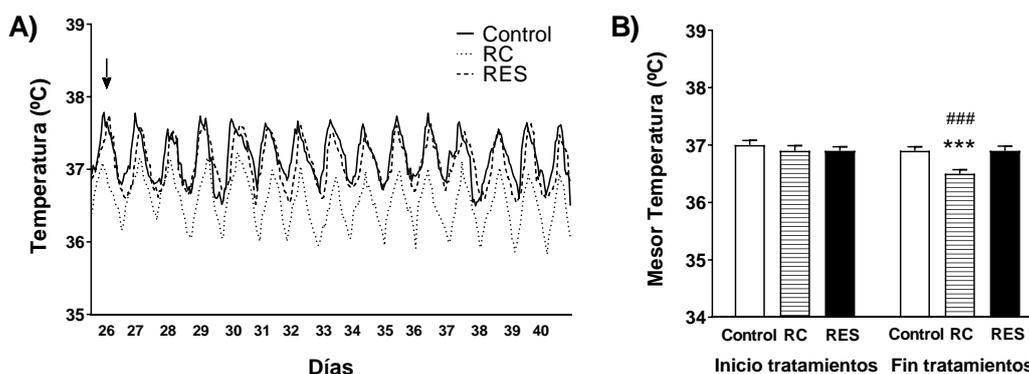


Figura 50. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la temperatura corporal (°C) de animales adultos (10 meses). En la izquierda (A) se muestran los valores obtenidos de la temperatura corporal, registrando una muestra cada 15 minutos mediante un sensor *iButton* colocado en la cavidad abdominal de los animales sometidos a restricción calórica (RC; n=7) y los tratados con *trans*-resveratrol (RES; n=6; 20 mg/kg) junto a los controles (n=6). La flecha indica el inicio del tratamiento con RES, correspondiente al día 26 del tratamiento con RC. En la derecha (B) aparecen los valores promedio \pm error estándar de la temperatura corporal. ***p<0.001 al comparar con los animales control; ###p<0.001 al comparar con los animales tratados con RES (ANOVA de un factor, seguido por *Bonferroni*).

4.2.2.2 Efectos conductuales producidos por la restricción calórica y el resveratrol en ratas adultas

4.2.2.2.1 Memoria de trabajo espacial

En el laberinto radial (figura 51), los resultados al finalizar los tratamientos muestran cómo tanto los animales sometidos a RC como los tratados con RES realizaron el test de forma más eficiente que los controles. En el tiempo requerido para completar la prueba, se detectaron diferencias significativas entre los grupos ($F_{(2,16)}=12.3$, $p=0.0006$), con reducciones tanto en los animales sometidos a RC (38%, $p<0.001$) como en los tratados con RES (30%, $p<0.01$) en comparación al grupo control (figura 51A). Los errores cometidos muestran resultados similares ($F_{(2,16)}=8.99$, $p=0.0024$), realizando menos errores tanto el grupo RC (48%, $p<0.01$) como el grupo RES (42%, $p<0.05$) (figura 51B). La distancia recorrida sigue el mismo patrón ($F_{(2,16)}=11.0$, $p=0.0010$), con reducciones significativas en ambos grupos (RC: 31%, $p<0.001$; RES: 24%, $p<0.05$) en comparación al grupo control (figura 51C).

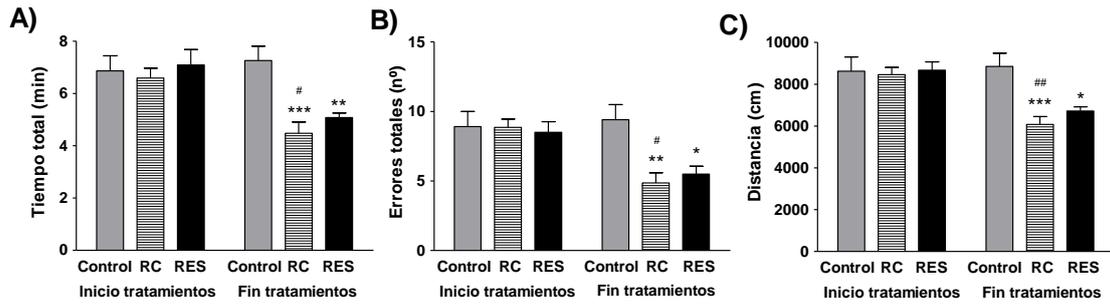


Figura 51. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial en animales adultos (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A), los errores cometidos (B) y la distancia recorrida (C) de los animales sometidos a restricción calórica (RC; n=7) y los animales tratados con el antioxidante *trans*-resveratrol (RES; n=6; 20 mg/kg), junto a los animales control (n=6). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 al comparar con el grupo control; #p<0.05, ##p<0.01 al comparar los valores obtenidos antes y después de realizar los tratamientos en cada grupo (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.2.2.2.2 Memoria episódica

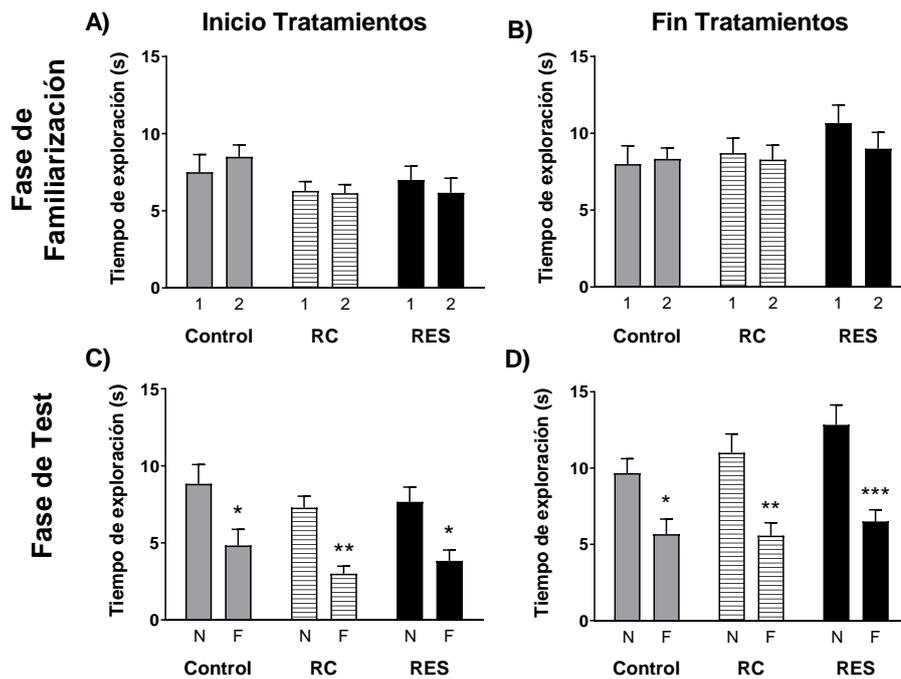


Figura 52. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en ratas adultas (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A, B: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (C, D: N, objeto nuevo; F, objeto familiar) de los animales sometidos a restricción calórica (RC; n=7) y los animales tratados con el antioxidante *trans*-resveratrol (RES; n=6; 20 mg/kg), junto a los animales control (n=6). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 comparando los valores obtenidos entre el objeto nuevo (N) y el familiar (F) (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

En la fase de familiarización (figura 52A, B), los animales no presentaron una preferencia por la localización de los dos objetos iguales situados en el campo abierto. Así, durante esta fase no se detectaron diferencias significativas en el tiempo de exploración de los objetos en los diferentes grupos de animales, ni al inicio de los tratamientos ni al final de los mismos.

En la fase de test (figura 52C, D), antes del inicio de los tratamientos, al comparar el tiempo de exploración del objeto nuevo y el familiar se puede observar cómo todos los animales adultos mostraron una preferencia por explorar el objeto nuevo ($F_{(1,32)}=31.8$, $p<0.0001$; figura 52C), sin cambios entre grupos de animales ($F_{(2,32)}=1.93$, $p=0.1619$) ni en la interacción de ambos factores ($F_{(2,32)}=0.0353$, $p=0.9653$). Al finalizar los tratamientos se mantiene esta capacidad de exploración del objeto nuevo ($F_{(1,32)}=38.2$, $p<0.0001$; figura 52D), no habiendo diferencias entre los grupos ($F_{(2,32)}=1.85$, $p=0.1737$) ni en su interacción ($F_{(2,32)}=0.609$, $p=0.5503$).

Al analizar el tiempo de exploración del objeto nuevo menos el tiempo del objeto familiar (figura 53) se observa un aumento de la exploración y una mayor discriminación entre los objetos al finalizar los tratamientos ($F_{(2,16)}=5.77$, $p=0.0129$). Así, la RC supuso un incremento del 36% ($p>0.05$), mientras que en el tratamiento con RES fue del 58% ($p<0.01$) en comparación al grupo control.

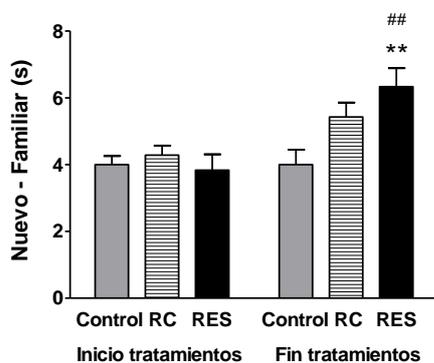


Figura 53. Efecto de la restricción y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en ratas adultas (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la diferencia entre el tiempo de exploración del objeto nuevo y el familiar en la fase de test en animales sometidos a restricción calórica (RC; $n=7$) y en animales tratados con *trans*-resveratrol (RES; $n=6$; 20 mg/kg), junto a los controles ($n=6$). $**p<0.01$ al comparar con el grupo control; $##p<0.01$ al comparar los valores obtenidos antes y después de realizar los tratamientos en cada grupo (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

4.2.2.2.3 Coordinación motora

La coordinación motora mostró cambios significativos al finalizar los tratamientos ($F_{(2,16)}=4.65$, $p=0.0268$; figura 54). Los animales sometidos a RC fueron los que ejecutaron la prueba más eficientemente, permaneciendo más tiempo sobre la rueda giratoria antes de caer (58%, $p<0.05$) en comparación al grupo control. Cabe indicar que estos resultados también podrían relacionarse no sólo a los posibles efectos beneficiosos de la RC sobre las habilidades motoras sino también a la disminución significativa del peso corporal que conlleva dicho tratamiento (figura 49). Por el contrario, los animales tratados con RES no presentaron cambios significativos en las habilidades motoras.

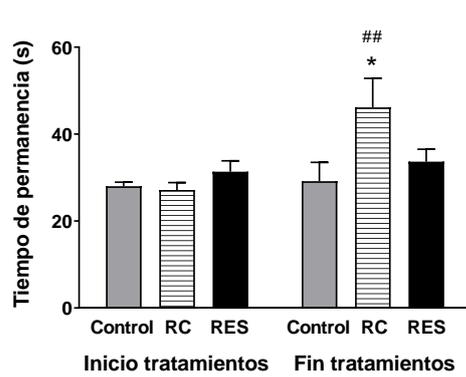


Figura 54. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la coordinación motora mediante el test del *rotarod* en animales adultos (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de permanencia sobre la rueda giratoria de los animales sometidos a restricción calórica (RC; n=7) y los animales tratados con *trans*-resveratrol (RES; n=6; 20 mg/kg), junto a los animales control (n=6). *p<0.05 al comparar con el grupo control; ##p<0.01 comparando los valores obtenidos por cada grupo antes y después de realizar los tratamientos (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.2.2.3 Efectos de la restricción calórica y el resveratrol sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales *in vivo*

4.2.2.3.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

En el hipocampo (figura 55), los dos tratamientos son capaces de incrementar la acumulación de DOPA ($F_{(2,16)}=19.1$, $p<0.0001$; figura 55A) y la cantidad de NA disponible ($F_{(2,16)}=41.5$, $p<0.0001$; figura 55B) en comparación al control. La RC incrementó de forma significativa los niveles de DOPA (51%, $p<0.001$), asociado a un aumento del contenido de NA (37%, $p<0.001$). El tratamiento con RES sigue un patrón similar, con un incremento significativo en la acumulación de DOPA (40%, $p<0.01$) y en los niveles de NA (27%, $p<0.001$).

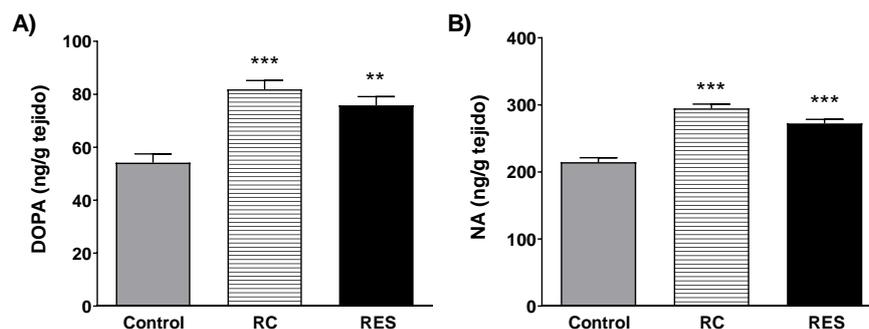


Figura 55. Efecto de la restricción y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas adultas (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (tras la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de los animales sometidos a restricción calórica (RC; n=7) y los animales tratados con el antioxidante *trans*-resveratrol (RES; n=6; 20 mg/kg), junto a los animales control (n=6). **p<0.01, ***p<0.001 al comparar con los animales del grupo control (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

De modo similar, en el estriado se observó un aumento de la actividad de la enzima TH, asociado a una mayor acumulación de DOPA ($F_{(2,16)}=22.4$, $p<0.0001$; figura 56A) y al aumento de la cantidad de DA disponible ($F_{(2,16)}=12.6$, $p=0.0005$; figura 56B), así como de sus correspondientes metabolitos HVA ($F_{(2,16)}=5.54$, $p=0.0149$; figura 56D) y DOPAC ($F_{(2,16)}=13.4$, $p=0.0004$; figura 56D). La RC incrementó de forma significativa los niveles de DOPA (29%, $p<0.001$), DA (del 19%, $p<0.001$), HVA (del 19%, $p<0.05$) y DOPAC (del 43%, $p<0.001$). Tras el tratamiento con RES los valores presentan un patrón similar, con un incremento significativo en la acumulación de DOPA (19%, $p<0.01$), DA (14%, $p<0.05$) y del metabolito DOPAC (28%, $p<0.05$), aunque no de HVA.

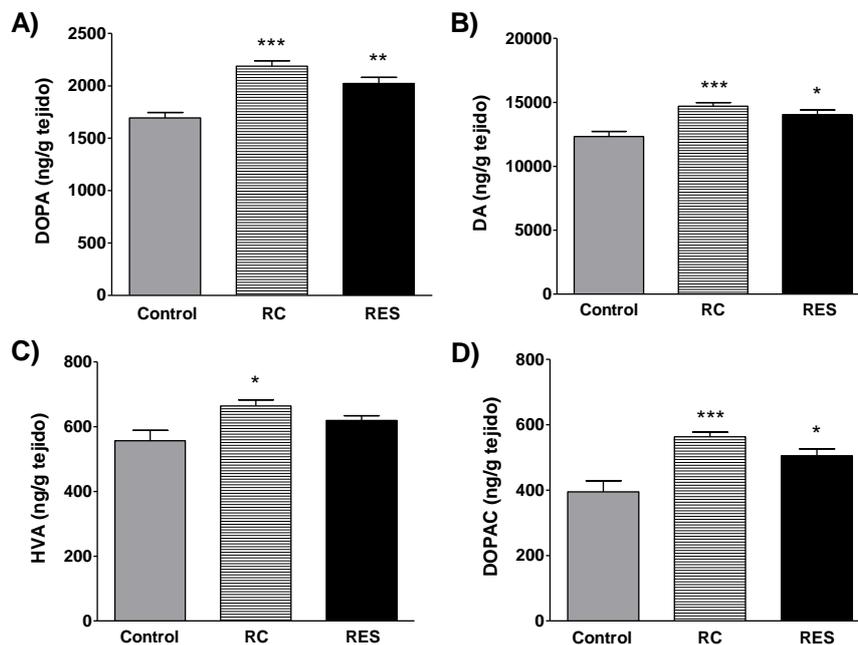


Figura 56. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas adultas (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A), los niveles de DA (B) y sus metabolitos HVA (C) y DOPAC (D) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales sometidos a restricción calórica (RC; $n=7$) y los animales tratados con el antioxidante *trans*-resveratrol (RES; $n=6$; 20 mg/kg), junto a los animales control ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con los animales del grupo control (ANOVA de un factor, seguido del test de *Bonferroni*).

4.2.2.3.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, el estriado y la glándula pineal

En el hipocampo (figura 57), se observó una modificación de la actividad de la enzima TPH-2 tras la aplicación de RC y RES, asociado a la variación de la acumulación de 5-HTP ($F_{(2,16)}=44.1$, $p<0.0001$; figura 57A) y a cambios de 5-HT ($F_{(2,16)}=16.5$, $p=0.0001$; figura 57B) y 5-HIAA ($F_{(2,16)}=23.5$, $p<0.0001$; figura 57C). La RC disminuyó de forma significativa los niveles de 5-HTP (16%, $p<0.05$) y de 5-HT (9%, $p<0.05$) en comparación al grupo control, aunque no se observa una alteración de los niveles de 5-HIAA. Los resultados obtenidos

después del tratamiento con RES siguen un patrón inverso, con incrementos significativos en la acumulación de 5-HTP (49%, $p<0.001$), 5-HT (14%, $p<0.05$) y 5-HIAA (31%, $p<0.001$).

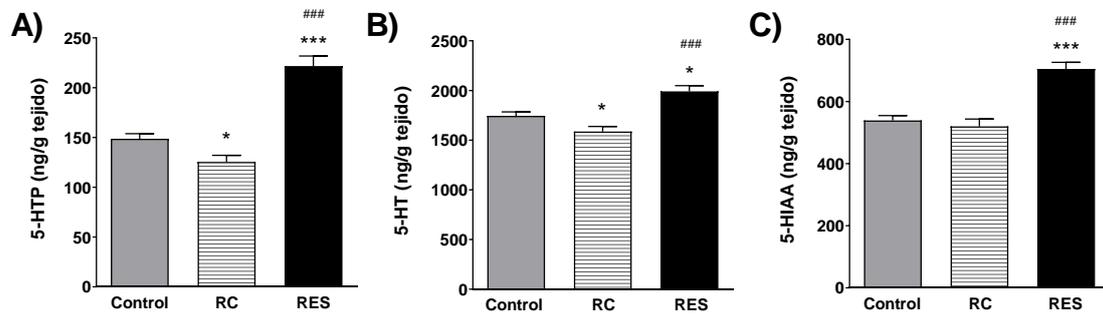


Figura 57. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas adultas (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (tras la inhibición de la descarboxilación con NSD-1015) (A), los niveles de 5-HT (B) y su metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales sometidos a restricción calórica (RC; $n=7$) y los animales tratados con *trans*-resveratrol (RES; $n=6$; 20 mg/kg), junto a los animales control ($n=6$; aceite de maíz). * $p<0.05$, *** $p<0.001$ al comparar con los de los animales del grupo control; ### $p<0.001$ al comparar los tratamientos RC y RES (ANOVA de un factor, seguido del test de *Bonferroni*).

En el estriado, se observó el mismo patrón de cambios tras la aplicación de RC y RES en el contenido de 5-HTP ($F_{(2,16)}=61.8$, $p<0.0001$; figura 58A) y 5-HT ($F_{(2,16)}=60.3$, $p<0.0001$; figura 58B), sin cambios significativos en 5-HIAA ($F_{(2,16)}=3.29$, $p=0.0635$; figura 58C). La RC redujo de forma significativa los niveles de 5-HTP (22%, $p<0.05$) y 5-HT (21%, $p<0.01$), mientras que el tratamiento con RES incrementó la acumulación de 5-HTP (54%, $p<0.001$) y 5-HT (34%, $p<0.001$) en comparación al grupo control.

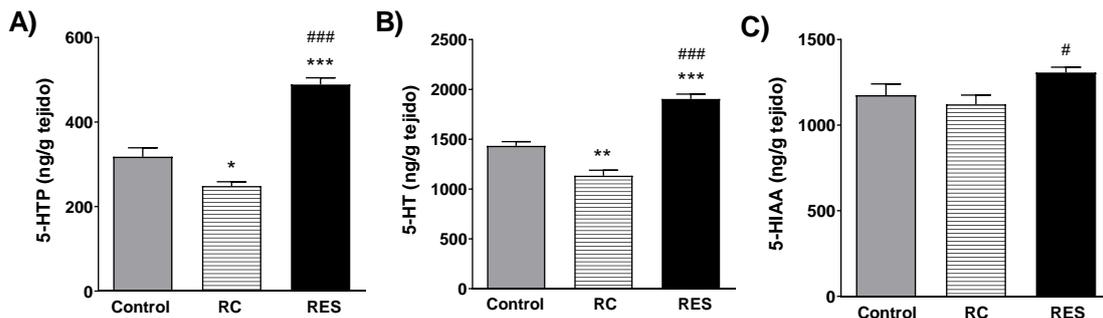


Figura 58. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas adultas (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y 5-HIAA (C) en extractos del estriado (ng/g) de los animales sometidos a restricción calórica (RC; $n=7$) y los tratados con *trans*-resveratrol (RES; $n=6$; 20 mg/kg), junto al control ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control; # $p<0.05$, ### $p<0.001$ al comparar los tratamientos RC y RES (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

En la glándula pineal (figura 59), se puede apreciar también una modificación de la actividad de la enzima TPH-1 tras la aplicación de los tratamientos RC y RES, con cambios significativos en los niveles de 5-HTP ($F_{(2,15)}=12.2$, $p=0.0007$; figura 59A) y 5-HT ($F_{(2,15)}=6.43$, $p=0.0096$; figura 59B), pero no los del metabolito 5-HIAA ($F_{(2,15)}=3.25$, $p=0.067$; figura 59C). Aunque el tratamiento con RC no indujo cambios significativos en comparación al grupo control en ningún caso, el tratamiento con RES aumentó significativamente la acumulación de 5-HTP (51%, $p<0.001$), la cantidad de 5-HT (43%, $p<0.01$) y su metabolito 5-HIAA (44%, $p<0.05$). Estos resultados también reflejan una modulación diferente de las isoformas TPH-1 y TPH-2.

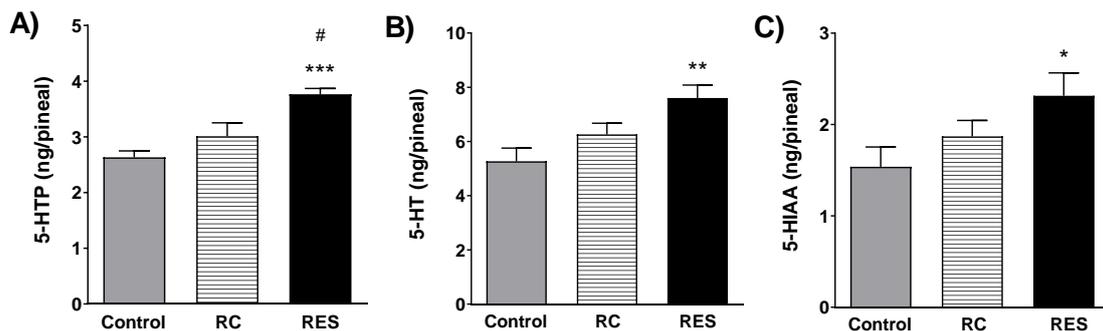


Figura 59. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas adultas (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y su metabolito 5-HIAA (C) en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de los animales sometidos a restricción calórica (RC; $n=6$) y los animales tratados con *trans*-resveratrol (RES; $n=6$; 20 mg/kg), junto a los animales control ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con los animales del grupo control; [#] $p<0.05$ comparando los valores obtenidos por RC y RES (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

4.2.2.4 Efectos de la restricción calórica y el resveratrol sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo

4.2.2.4.1 Efectos sobre la proteína SIRT1

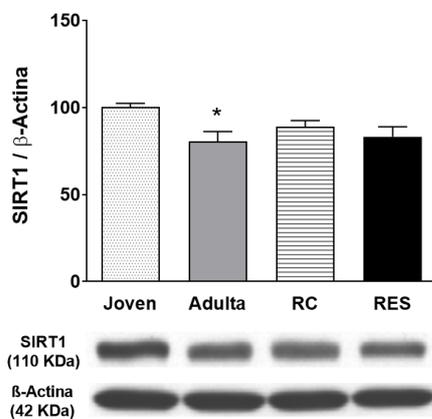


Figura 60. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en hipocampo de ratas adultas (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (restricción calórica, RC, $n=6$; *trans*-resveratrol, RES, 20 mg/kg, $n=6$; control adulto, $n=6$) de experimentos realizados por cuadruplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). * $p<0.05$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la gráfica se muestra un inmunoblot representativo de los cambios obtenidos en SIRT1, sin cambios en la β -actina (patrón de carga).

La expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo (figura 60) se ve significativamente modificada por la edad ($F_{(3,20)}=3.65$, $p=0.0301$). Los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles, mientras que los animales adultos ya muestran una menor proporción de SIRT1 (19.6%, $p < 0.05$). Los resultados obtenidos tras la aplicación de la RC y del tratamiento con RES muestran una menor reducción en la proporción de SIRT1 (11% y del 17% respectivamente) en comparación a los animales jóvenes, disminución que no resultó significativa.

4.2.2.4.2 Efectos sobre la proteína NF- κ B p65 total

La determinación de NF- κ B en el hipocampo de animales de los cuatro grupos no mostró diferencias significativas respecto de la inmunoreactividad de la proteína NF- κ B total ($F_{(3,20)}=2.008$, $p=0.1453$) (figura 61).

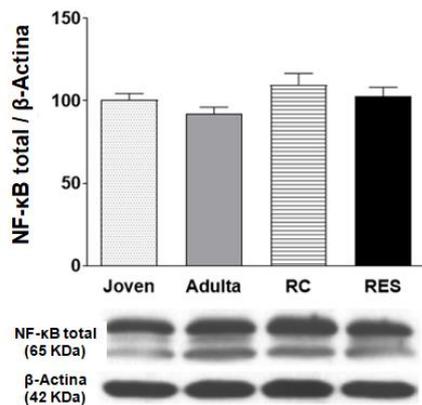


Figura 61. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la expresión de la proteína NF- κ B total (65 kDa) en hipocampo de ratas adultas (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a restricción calórica, RC, $n=6$; animales tratados con *trans*-resveratrol 20 mg/kg, RES, $n=6$; animales adultos del grupo control, Adulta, $n=6$) de experimentos realizados por cuadruplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la gráfica se muestra un inmunoblot representativo.

4.2.2.4.3 Efectos sobre la proteína RpAp48/46

La expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en el hipocampo no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos de animales ($F_{(3,20)}=2.74$, $p=0.0703$), aunque los jóvenes son los que presentaron mayor inmunoreactividad de esta proteína (figura 62).

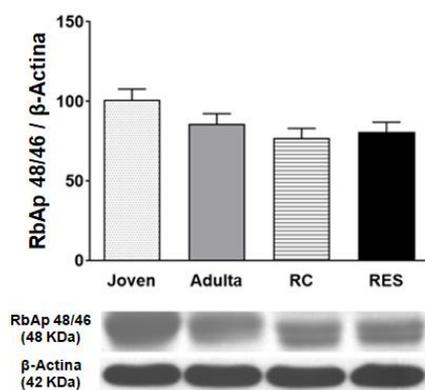


Figura 62. Efecto de la restricción calórica y el tratamiento con el antioxidante *trans*-resveratrol sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en hipocampo de ratas adultas (10 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales con restricción calórica, RC, $n=6$; animales tratados con *trans*-resveratrol 20 mg/kg, RES, $n=6$; animales adultos del grupo control, Adulta, $n=6$) de experimentos realizados por cuadruplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido por *Bonferroni*). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la gráfica.

A partir de este punto, los diferentes estudios se centran en la aplicación de diversas estrategias dirigidas a paliar los efectos adversos del envejecimiento en animales viejos.

4.3 Efectos de los tratamientos con α -tocoferol sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas viejas

En este apartado se muestran los efectos producidos por el antioxidante α -tocoferol sobre el proceso de envejecimiento, tanto a nivel comportamental como a nivel neuroquímico de animales viejos (18-20 meses). Para ello se han realizado dos tratamientos diferentes: Toc 20 (α -tocoferol a una dosis de 20 mg/kg, i.p., disuelto en aceite de maíz, durante 28 días) y Toc 40-60 (α -tocoferol a una dosis de 40 mg/kg, i.p., durante 28 días, seguido por otra dosis de 60 mg/kg, i.p., durante 28 días más), comparándolos con sus respectivos grupos control (a los que se administró durante 28 días o 56 días aceite de maíz, 1 ml/kg/día, i.p.).

4.3.1 Efectos conductuales producidos por los tratamientos con α -tocoferol en ratas viejas

4.3.1.1 Memoria de trabajo espacial y aprendizaje visoespacial

En la memoria espacial, analizada mediante el laberinto radial, el tratamiento Toc 20 (figura 63A, C, E) no indujo cambios significativos frente a los animales control en el tiempo necesario para finalizar el test, el número de errores cometidos o la distancia recorrida. Sin embargo, el grupo Toc 40-60 mejoró significativamente la ejecución del test (figura 63B, D, F). El tiempo de ejecución está influenciado de forma significativa por el tratamiento ($F_{(1,60)}=11.7$, $p=0.0012$), pero no por la duración ($F_{(4,60)}=2.30$, $p=0.0699$) ni la interacción de ambos factores ($F_{(4,60)}=1.19$, $p=0.327$). En los animales del grupo control se incrementó significativamente el tiempo necesario para completar la prueba en comparación al inicio del experimento (76%), mientras que en el grupo Toc 40-60 no se detectaron cambios. El número de errores también está condicionado por el tratamiento ($F_{(1,60)}=19.2$, $p<0.0001$), pero no por la duración ($F_{(4,60)}=1.81$, $p=0.1384$) ni su interacción ($F_{(4,60)}=1.82$, $p=0.1373$). Los animales del grupo Toc 40-60 realizaron menos errores (50%) en comparación al inicio del tratamiento, no habiendo cambios significativos en los controles. Finalmente, la distancia recorrida también está condicionada por el tratamiento ($F_{(1,60)}=7.08$, $p=0.0100$), pero no por la duración ($F_{(4,60)}=0.549$, $p=0.7007$) ni su interacción ($F_{(4,60)}=1.40$, $p=0.2454$), observándose una disminución al final del tratamiento Toc 40-60.

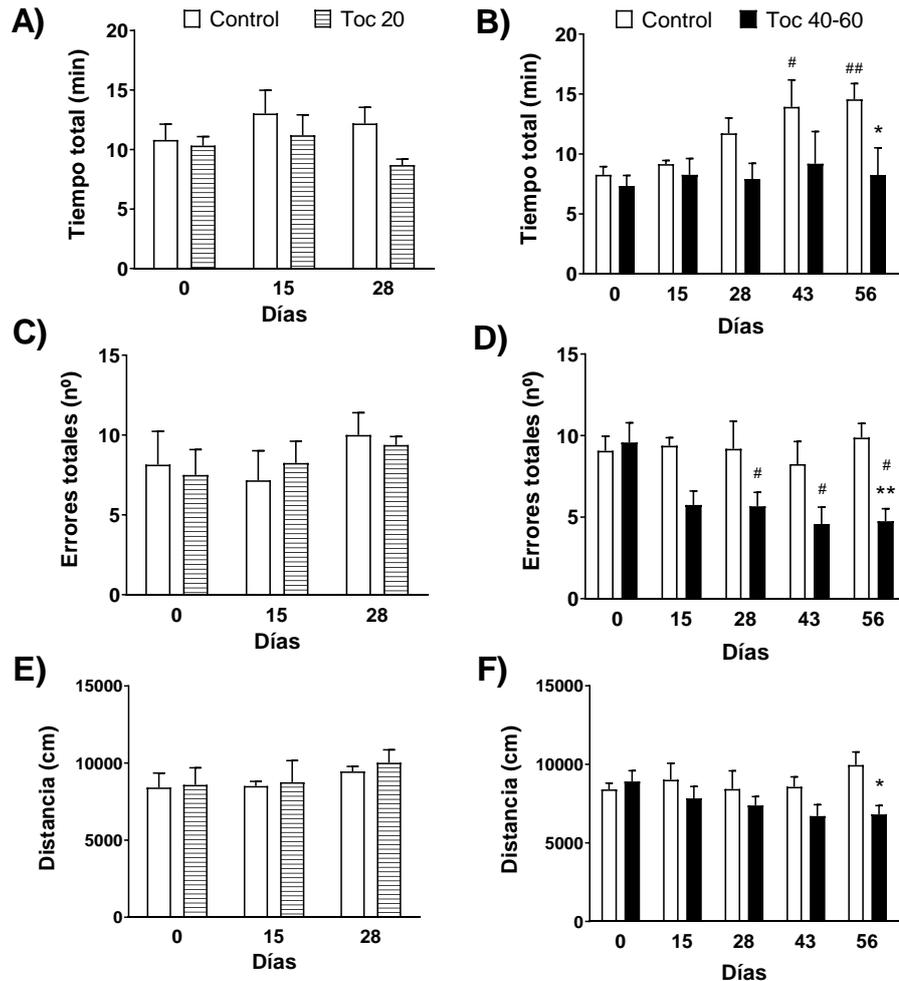


Figura 63. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial en ratas viejas (18-20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A, B), los errores cometidos (C, D) y la distancia recorrida (E, F) de los animales tratados con α -tocoferol (Toc 20 mg/kg, n=8; Toc 40-60 mg/kg, n=6) frente a sus respectivos grupos control (durante 28 días (n=7) o 56 días (n=8)). *p<0.05, **p<0.01 al comparar con su respectivo control; #p<0.05, ##p<0.01 al comparar los valores obtenidos antes y después de realizar los tratamientos en cada grupo (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

Dados los resultados positivos del α -tocoferol Toc 40-60 en la memoria de trabajo espacial, se decidió utilizar el test del laberinto de *Barnes* para analizar el aprendizaje visoespacial al finalizar el tratamiento (figura 64). Los resultados indicaron que los animales tratados con Toc 40-60 ejecutan el test de forma más eficaz. Así, la latencia (figura 64A) se ve afectada de forma significativa por el tratamiento ($F_{(1,40)}=17.4$, $p=0.0002$) y el entrenamiento ($F_{(3,40)}=12.5$, $p<0.0001$), pero no por la interacción ($F_{(3,40)}=1.32$, $p=0.28526$). De forma similar, los errores (figura 64B) están condicionados por el tratamiento ($F_{(1,40)}=7.06$, $p=0.0113$) y el entrenamiento ($F_{(3,40)}=2.88$, $p=0.0480$), pero no por su interacción ($F_{(3,56)}=0.392$, $p=0.7593$). En la latencia, el test de *Bonferroni* detectó diferencias significativas en el primer entrenamiento, indicando que los animales viejos tratados con Toc 40-60 recuerdan mejor la localización del *target* aprendida

el día anterior en la fase de familiarización que los controles. En cuanto a los errores cometidos, el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas. Asimismo, se pudo observar que los animales tratados con Toc 40-60 utilizaron una mejor estrategia de búsqueda, siguiendo la estrategia directa y seriada en mayor número de casos que los controles, en los que predominó la búsqueda aleatoria (figura 64C).

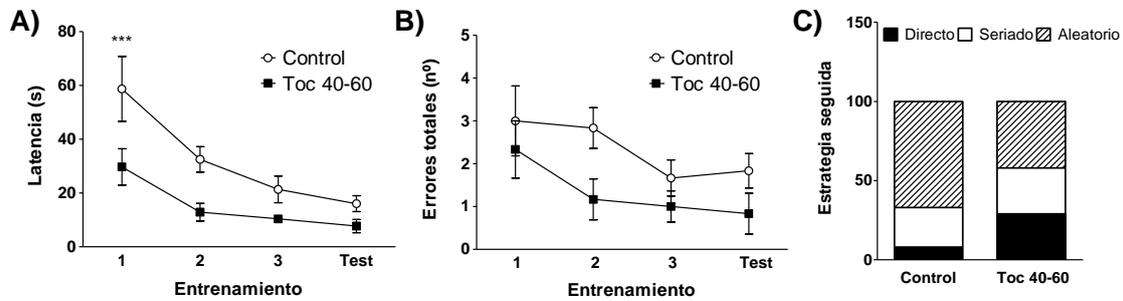


Figura 64. Efecto del tratamiento con α -tocoferol Toc 40-60 sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de Barnes en ratas viejas (20 meses). Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo del test de Barnes de los animales tratados con α -tocoferol Toc 40-60 (40-60 mg/kg, n=6) frente a los animales viejos del grupo control (n=6). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). *** $p < 0.001$ al comparar con el grupo control (A, B: ANOVA de dos factores, seguido del test de *Bonferroni*).

4.3.1.2 Memoria episódica

En la fase de familiarización (figura 65A, B) del test de reconocimiento de objeto nuevo, los animales de los diferentes grupos no presentan preferencia por ninguno de los dos objetos. No obstante, al final del tratamiento los animales tratados con α -tocoferol (Toc 20 y Toc 40-60) exploraron durante más tiempo los objetos (50% y 71% respectivamente) en relación a su grupo control.

En la fase de test, los resultados obtenidos tras el tratamiento Toc 20 (figura 65C), analizados mediante ANOVA de tres factores, revelaron cómo los valores se ven afectados por el objeto ($F_{(1,78)}=31.191$, $p < 0.0001$) y por el tratamiento ($F_{(1,78)}=5.654$, $p=0.0198$), pero no por la duración ($F_{(2,78)}=0.849$, $p=0.4316$) ni por las interacciones de los parámetros analizados. En el tratamiento Toc 40-60 (figura 65D) los resultados están condicionados por el objeto ($F_{(1,120)}=59.148$, $p < 0.0001$) y por el tratamiento ($F_{(1,120)}=8.069$, $p=0.0054$), pero no por la duración ($F_{(4,120)}=0.238$, $p=0.9162$) ni por las interacciones. Así, los animales tratados con α -tocoferol tienden a explorar más los objetos (Toc 20: incremento del 27% en el objeto nuevo y 17% en el familiar al comparar con los controles; Toc 40-60: 54% en el nuevo y 23% en el familiar), mostrando también una mayor capacidad de discriminación por el objeto nuevo.

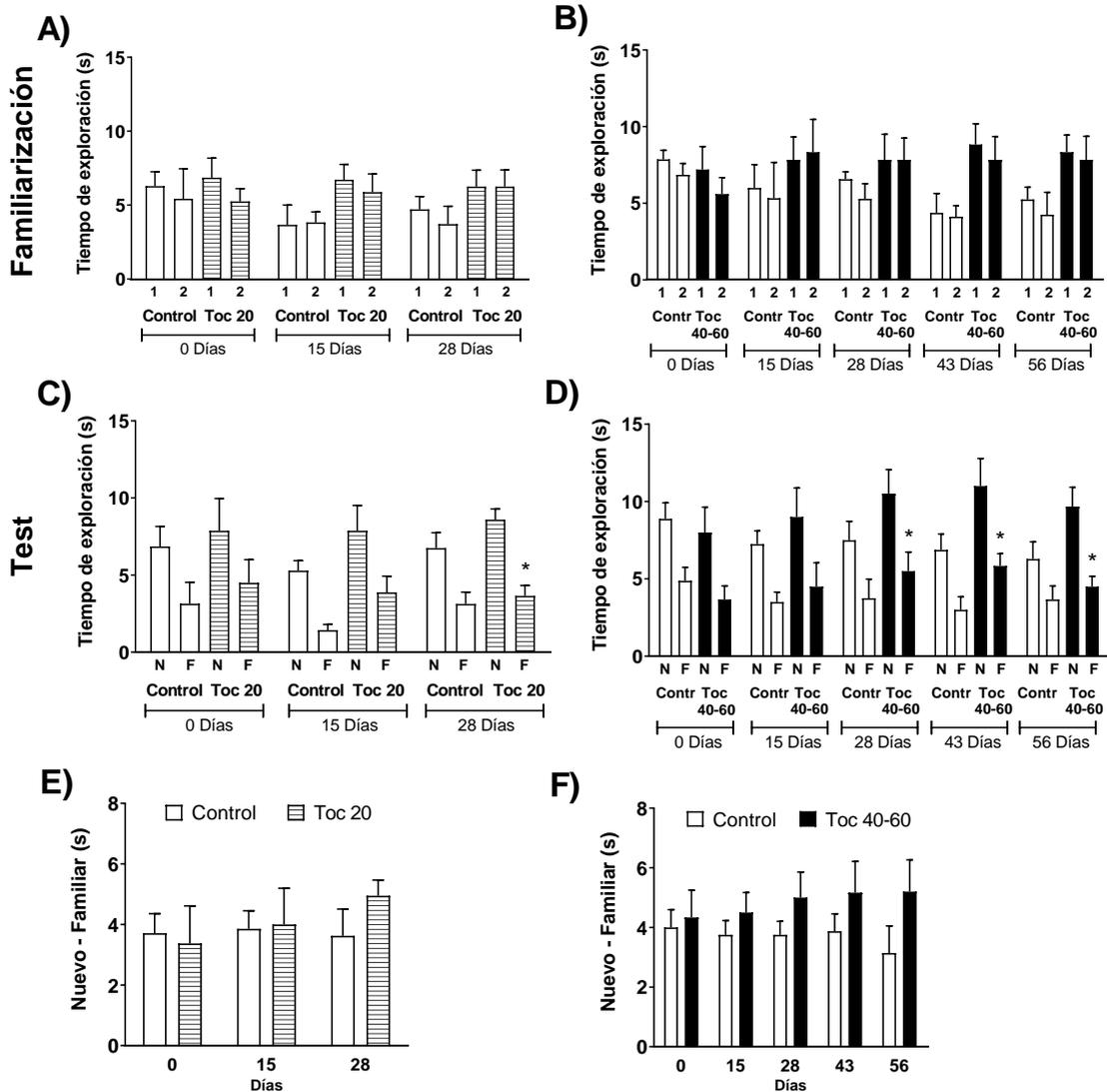


Figura 65. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en animales viejos (18-20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A, B: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (C, D: N, objeto nuevo; F, objeto familiar), así como la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar en la fase de test (E, F) de los animales tratados con α -tocoferol (Toc 20 mg/kg, n=8; Toc 40-60 mg/kg, n=6) frente a los animales de los grupos control (durante 28 días (n=7) o 56 días (n=8)). * $p < 0.05$ comparando los valores entre el objeto nuevo y el familiar (A, B, C, D: ANOVA de tres factores, seguido por el test de Fisher PLSD; E, F: ANOVA de dos factores, seguido por el test de Bonferroni).

Finalmente, en el tratamiento Toc 20 no se detectaron cambios estadísticamente significativos en la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el objeto familiar (figura 65E). Sin embargo, en el grupo Toc 40-60 la diferencia entre la exploración del objeto nuevo y el familiar (figura 65F) está condicionada por el tratamiento ($F_{(1,60)}=5.22$, $p=0.0263$), pero no por la duración ($F_{(4,60)}=0.0965$, $p=0.983$) ni la interacción de ambos factores ($F_{(4,60)}=0.341$, $p=0.849$).

4.3.1.3 Coordinación motora

La coordinación motora, analizada mediante el dispositivo del *rotarod*, no mostró cambios tras el tratamiento Toc 20 (figura 66A). Sin embargo, en el tratamiento Toc 40-60 (figura 66B) el tiempo que los animales permanecen sobre la rueda giratoria está significativamente influenciado por el tratamiento ($F_{(1,60)}=7.14$, $p=0.0098$) y la duración del tratamiento ($F_{(4,60)}=2.99$, $p=0.0261$), pero no por su interacción ($F_{(4,60)}=0.994$, $p=0.4183$). Así, al finalizar el tratamiento los animales tratados con α -tocoferol Toc 40-60 permanecieron más tiempo sobre la rueda giratoria antes de caer que el grupo control (incremento del 44%, $p<0.05$).

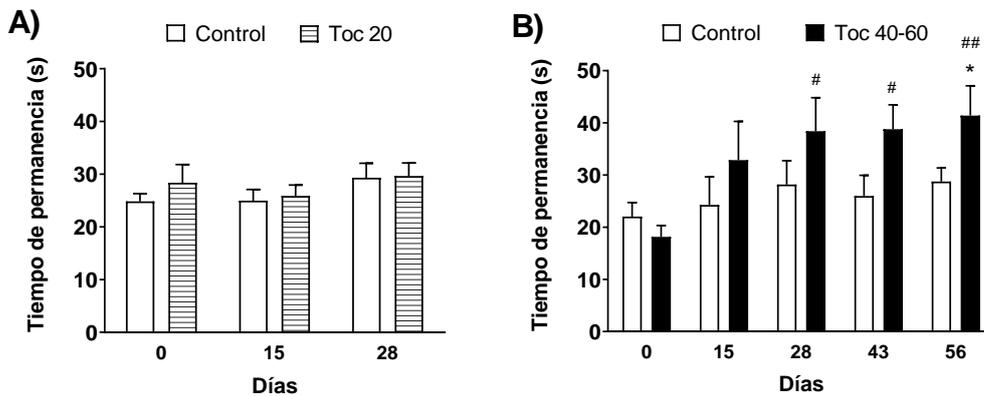


Figura 66. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la coordinación motora mediante el test del rotarod en animales viejos (18-20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de permanencia sobre la rueda giratoria de los animales tratados con α -tocoferol (A, Toc 20 mg/kg, n=8; B, Toc 40-60 mg/kg, n=6) frente a los animales de los grupos control (durante 28 días (n=7) o 56 días (n=8)). * $p<0.05$ al comparar con su grupo control; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ al comparar los valores obtenidos antes y después de realizar los tratamientos en cada grupo (ANOVA de dos factores, seguido de Bonferroni).

4.3.2 Contenido cerebral de α -tocoferol y niveles de peroxidación lipídica en ratas jóvenes y viejas sin tratar, y tras los tratamientos con α -tocoferol en ratas viejas

4.3.2.1 Determinación del contenido de α -tocoferol en la corteza cerebral

El contenido del antioxidante α -tocoferol (pmol/mg proteína) en la corteza cerebral (figura 67) se ve modificado significativamente con la edad y tras la aplicación de los tratamientos con dicho antioxidante ($F_{(3,19)}=45.68$, $p<0.0001$). El contenido de α -tocoferol en animales viejos se redujo de forma significativa (25%, $p<0.05$) en comparación a los animales jóvenes, valores de α -tocoferol similares a los descritos en otros estudios (Martin et al., 1999, 2000a). A diferencia del efecto producido por el envejecimiento, los tratamientos con α -tocoferol en ratas viejas (Toc 20 y Toc 40-60) incrementaron el contenido de dicho antioxidante de una forma dependiente de la dosis y el tiempo (70% y 132% respectivamente, $p<0.001$).

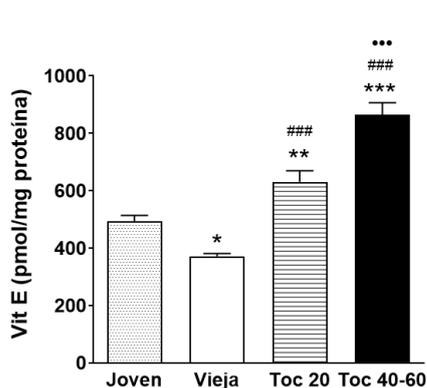


Figura 67. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre el contenido del antioxidante α -tocoferol en corteza cerebral de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de los niveles de α -tocoferol (pmol/mg proteína) en extractos procedentes de la corteza cerebral de animales tratados α -tocoferol (Toc 20 mg/kg, n=6; Toc 40-60, n=6) frente a los animales de los grupos control (jóvenes (n=5) y viejos (n=6)). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 al comparar con los jóvenes; ### p <0.001 al comparar con el grupo control de animales viejos; *** p <0.001 al comparar los dos tratamientos de α -tocoferol (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.3.2.2 Determinación de los niveles de peroxidación lipídica en la corteza cerebral

Los niveles de malondialdehído (MDA; pmol/mg proteína), indicador de la peroxidación lipídica, fueron analizados en la corteza cerebral para comprobar el posible efecto del α -tocoferol sobre el incremento de la peroxidación lipídica asociado al envejecimiento (figura 68). Con la edad se produce un aumento significativo del daño oxidativo ($F_{(3,19)}=9.83$, $p=0.0004$), con un incremento de los niveles de MDA (238%) en comparación a los animales jóvenes, valores de MDA similares a los descritos en otros estudios (Tejada et al., 2006). A diferencia, los tratamientos efectuados con α -tocoferol (Toc 20 y Toc 40-60) disminuyen la concentración de MDA hasta alcanzar un nivel similar al obtenido en los animales jóvenes.

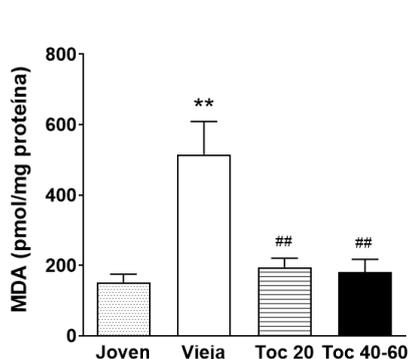


Figura 68. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre el contenido del marcador de peroxidación lipídica malondialdehído (MDA) en corteza cerebral de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de los niveles de MDA (pmol/mg proteína) en extractos procedentes de la corteza cerebral de animales tratados con α -tocoferol (Toc 20 mg/kg, n=6; Toc 40-60 mg/kg, n=6) frente a los animales de los grupos control (jóvenes (n=5) y viejos (n=6)). ** p <0.01 al comparar con los jóvenes; ## p <0.01 al comparar con el grupo control de animales viejos (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

4.3.3 Efectos del α -tocoferol sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales *in vivo*

4.3.3.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

En el hipocampo (figura 69), los resultados revelaron que los dos tratamientos (Toc 20 y Toc 40-60) incrementan la actividad de la enzima TH, asociado a una mayor acumulación de DOPA ($F_{(2,16)}=22.4$, p <0.0001; figura 69A) y al aumento de NA ($F_{(2,16)}=14.6$, $p=0.0002$; figura 69B). Este antioxidante incrementó de forma significativa los niveles de DOPA de una forma dosis-

tiempo dependiente (Toc 20: 244%, $p < 0.001$; Toc 40-60: 235%, $p < 0.001$) en comparación a los animales del grupo control, así como los valores de NA (Toc 20: 38%, $p < 0.05$; Toc 40-60: 74%, $p < 0.001$).

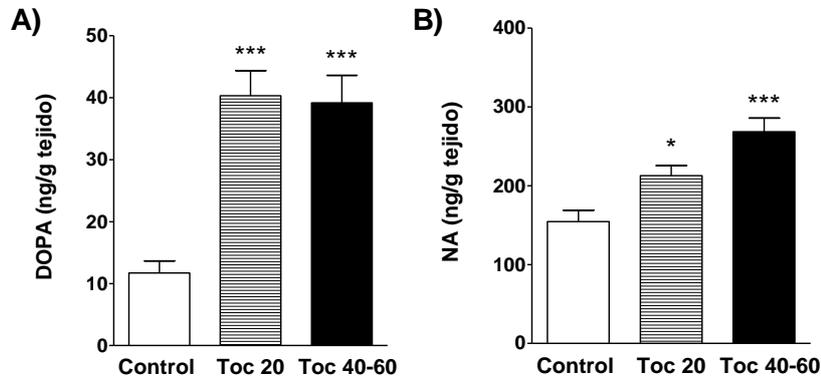


Figura 69. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (tras la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales tratados con α -tocoferol (Toc 20 mg/kg, $n=6$; Toc 40-60 mg/kg, $n=6$) frente a los animales del grupo control ($n=7$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ al comparar con el grupo control (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

En el estriado (figura 70), se observó también cómo los dos tratamientos incrementaron la acumulación de DOPA ($F_{(2,16)}=16.6$, $p < 0.0001$; figura 70A) y DA disponible ($F_{(2,16)}=16.2$, $p=0.0001$; figura 70B) en comparación al control. Así, α -tocoferol aumentó de forma significativa los niveles de DOPA de una forma dosis-tiempo dependiente (Toc 20: 54%, $p < 0.05$; Toc 40-60: 98%, $p < 0.001$), así como la cantidad de DA (Toc 20: 47%, $p < 0.05$; Toc 40-60: 95%, $p < 0.001$). Sin embargo, no se detectaron cambios significativos en el metabolito HVA ($F_{(2,16)}=0.0309$, $p=0.9696$; figura 70C), aunque no se pudo determinar el metabolito DOPAC.

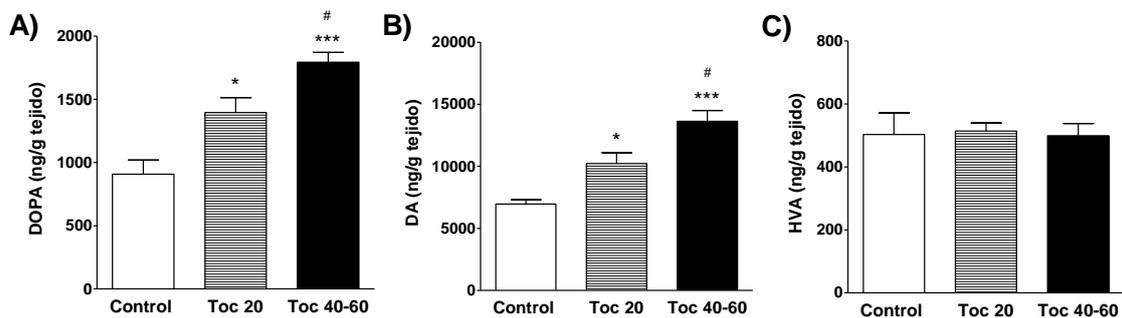


Figura 70 Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A) y los niveles de DA (B), así como de su metabolito HVA (C), en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales tratados con α -tocoferol (Toc 20 mg/kg, $n=6$; Toc 40-60 mg/kg, $n=6$) frente a los del grupo control ($n=7$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ al comparar con el grupo control; # $p < 0.05$ al comparar los animales tratados con α -tocoferol (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

4.3.3.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, en el estriado y en la glándula pineal

En el hipocampo (figura 71), se observó un aumento de la actividad de la enzima TPH-2 tras la administración de los tratamientos con α -tocoferol, con una mayor acumulación de 5-HTP ($F_{(2,16)}=16.6$, $p<0.0001$; figura 71A) y de la cantidad de 5-HT ($F_{(2,16)}=4.18$, $p=0.0347$; figura 71B), aunque no del metabolito 5-HIAA ($F_{(2,16)}=2.74$, $p=0.0968$; figura 71C). Así, se incrementaron los niveles de 5-HTP (Toc 20: 53%, $p>0.05$; Toc 40-60: 117%, $p<0.001$) y el contenido de 5-HT (Toc 20: 157%, $p<0.05$; Toc 40-60: 139%, $p<0.05$).

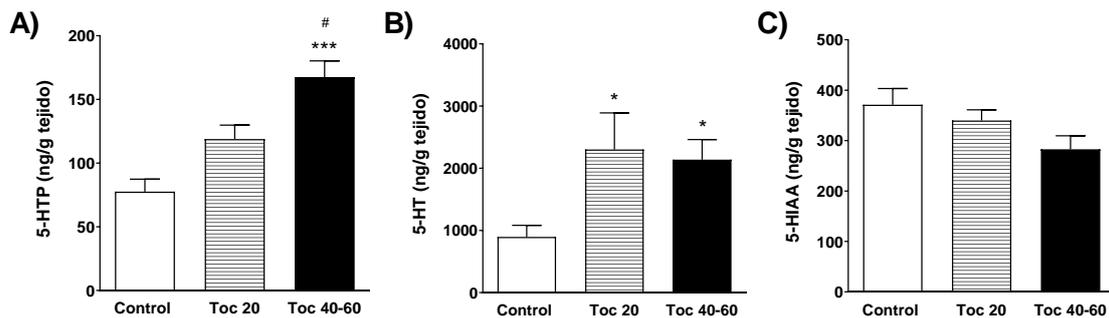


Figura 71. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (tras la inhibición de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales tratados con α -tocoferol (Toc 20 mg/kg, $n=6$; Toc 40-60 mg/kg, $n=6$) frente a los animales del grupo control ($n=7$). * $p<0.05$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control; # $p<0.05$ al comparar los dos grupos con α -tocoferol (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

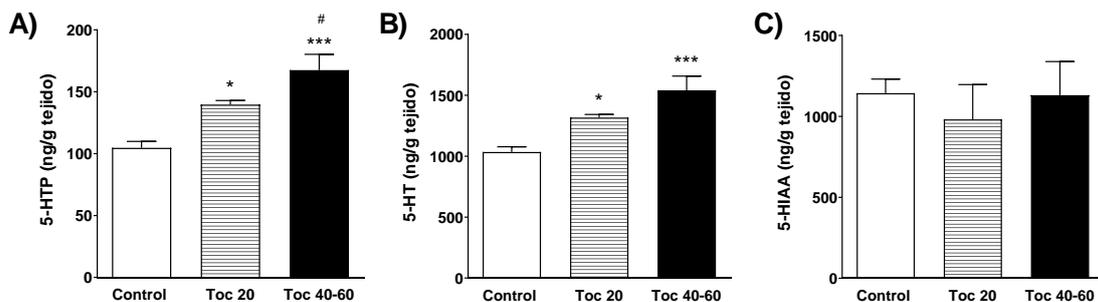


Figura 72. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de animales tratados con α -tocoferol (Toc 20 mg/kg, $n=6$; Toc 40-60 mg/kg, $n=6$) frente a los del grupo control ($n=7$). * $p<0.05$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control; # $p<0.05$ comparando los animales tratados con α -tocoferol (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

Resultados similares se observaron en el estriado tras los dos tratamientos con α -tocoferol, con una mayor acumulación de 5-HTP ($F_{(2,16)}=15.9$, $p<0.0001$; figura 72A) y de la cantidad de 5-HT ($F_{(2,16)}=12.9$, $p=0.0004$; figura 72B), aunque no de los niveles del metabolito 5-HIAA

($F_{(2,16)}=0.242$, $p=0.7878$; figura 72C). De esta forma, α -tocoferol incrementó de forma significativa los niveles de 5-HTP (Toc 20: 33%, $p<0.05$; Toc 40-60: 60%, $p<0.001$) y 5-HT (Toc 20: 27%, $p<0.05$; Toc 40-60: 49%, $p<0.001$).

En la glándula pineal (figura 73), se apreció también un incremento de la actividad de TPH-1 tras la aplicación de α -tocoferol, con un aumento significativo de la acumulación de 5-HTP ($F_{(2,16)}=16.5$, $p<0.0001$) y del contenido de 5-HT ($F_{(2,16)}=18.9$, $p<0.0001$), aunque no de su metabolito 5-HIAA ($F_{(2,16)}=2.90$, $p=0.0824$). Así, aumentaron los niveles de 5-HTP (Toc 20: 42%, $p>0.05$; Toc 40-60: 117%, $p<0.001$) y de 5-HT (Toc 20: 30%, $p>0.05$; Toc 40-60: 125%, $p<0.001$). En el caso de 5-HIAA, en el tratamiento Toc 40-60 se observó un incremento respecto al control, aunque no significativo (50%, $p>0.05$).

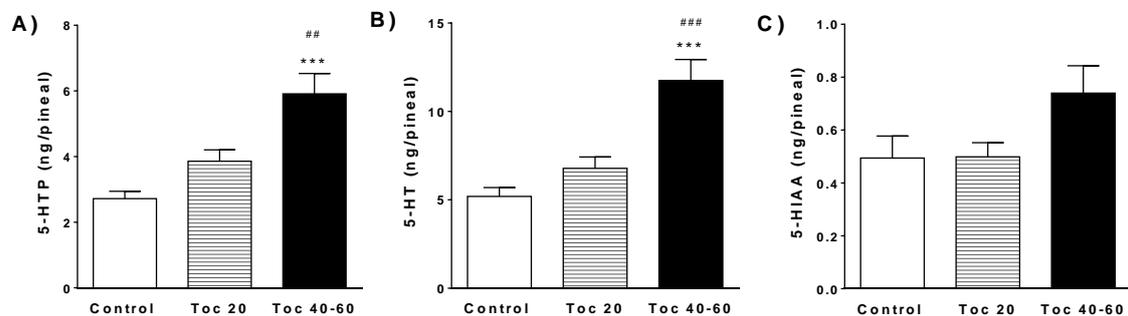


Figura 73. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de los animales tratados con α -tocoferol (Toc 20 mg/kg, n=6; Toc 40-60 mg/kg, n=6) frente a los del grupo control (n=7). *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control; ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ comparando los animales tratados con α -tocoferol (ANOVA de un factor, seguido por el test de Bonferroni).

4.3.4 Efectos del α -tocoferol sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo

4.3.4.1 Efectos sobre la proteína SIRT1

La expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo (figura 74) se ve significativamente modificada ($F_{(3,19)}=8.204$, $p=0.0010$). Los resultados tras el tratamiento con α -tocoferol Toc 20 no presentan cambios respecto a los animales viejos del grupo control (en los que se produjo una reducción en la expresión de SIRT1 del 38% en comparación a los jóvenes, $p<0.01$). Sin embargo, los niveles de SIRT1 fueron significativamente incrementados tras el tratamiento Toc 40-60 (54%, $p<0.05$) en comparación a los animales viejos del grupo control.

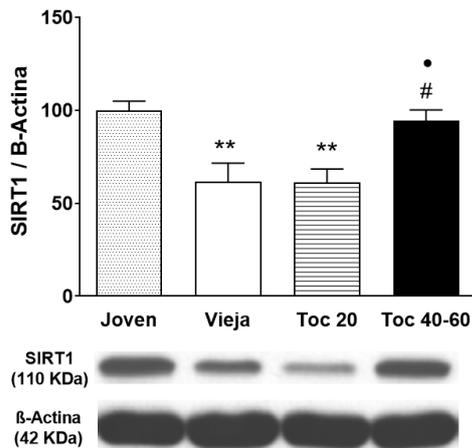


Figura 74. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales tratados con α -tocoferol 20 mg/kg, Toc 20, n=5; animales tratados con α -tocoferol 40+60 mg/kg, Toc 40-60, n=6; animales viejos del grupo control, Vieja, n=6) de experimentos realizados por cuadruplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes (n=6). **p<0.01 al comparar con los animales jóvenes del grupo control; #p<0.05 al comparar con los animales viejos del grupo control; •p<0.05 comparando los animales tratados con α -tocoferol (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la gráfica se muestra un inmunoblot representativo de los cambios obtenidos en SIRT1, sin cambios en la β -actina (patrón de carga).

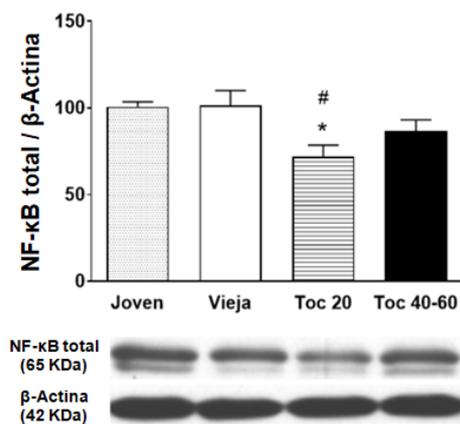


Figura 75. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la expresión de la proteína NF- κ B total (65 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales tratados con α -tocoferol 20 mg/kg, Toc 20, n=5; animales tratados con α -tocoferol 40+60 mg/kg, Toc 40-60, n=6; animales viejos del grupo control, Vieja, n=6) de experimentos realizados por cuadruplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes (n=6). *p<0.05 al comparar con los animales jóvenes del grupo control; #p<0.05 al comparar con los animales viejos del grupo control (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la gráfica.

4.3.4.2 Efectos sobre la proteína NF- κ B total

La determinación de NF- κ B en el hipocampo de animales de los cuatro grupos mostró diferencias significativas respecto de la inmunoreactividad de la proteína NF- κ B total ($F_{(3,19)}=4.278$, $p=0.0182$), con una disminución de los niveles de dicha proteína tras el tratamiento Toc 20 (29% respecto a los animales viejos del grupo control, $p<0.05$) y el tratamiento Toc 40-60 (15%, $p>0.05$) (figura 75).

4.3.4.3 Efectos sobre la proteína RbAp48/46

Los dos tratamientos con α -tocoferol no revirtieron la reducción de los niveles de Rbap48/46 en el hipocampo que se produce con la edad ($F_{(3,19)}=4.747$, $p=0.0117$) (figura 76). Los animales jóvenes son los que presentan los mayores niveles, mientras que los animales viejos muestran

una reducción del 40% ($p < 0.05$), los cuales no fueron alterados tras los tratamientos con α -tocoferol (Toc 20: 45%, $p < 0.05$; Toc 40-60: 40%, $p < 0.05$ en comparación a los jóvenes).

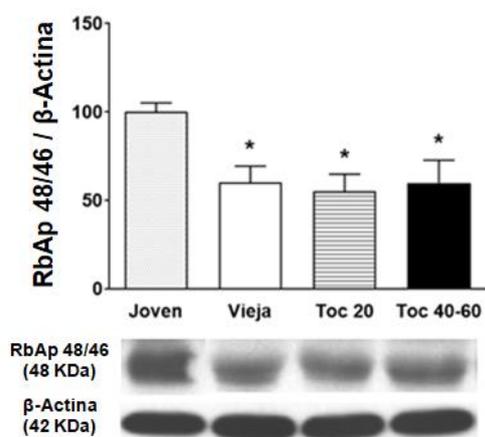


Figura 76. Efecto de los tratamientos con α -tocoferol sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales tratados con α -tocoferol 20 mg/kg, Toc 20, $n=5$; animales tratados con α -tocoferol 40+60 mg/kg, Toc 40-60, $n=6$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=6$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). * $p < 0.05$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la gráfica se muestra un inmunoblot representativo.

4.4 Efectos de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas viejas

En este apartado se muestran los efectos de los tratamientos con el antioxidante catequina y con el extracto de té verde *poliphenon 60* (ambos aplicados a una dosis de 20 mg/kg, i.p., disueltos en aceite de maíz, durante 28 días, seguido por otra dosis de 40 mg/kg durante 7 días más) sobre el proceso de envejecimiento, tanto a nivel comportamental como a nivel neuroquímico, en animales viejos. A los animales del grupo control se les administró el vehículo de dilución (aceite de maíz, 1 ml/kg/día, i.p.).

4.4.1 Efectos conductuales de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 en ratas viejas

4.4.1.1 Memoria de trabajo espacial y aprendizaje visoespacial

Los resultados en el test del laberinto radial (figura 77) muestran cómo los animales tratados con el polifenol catequina (CAT) y los tratados con *poliphenon 60* (POL 60) realizaron el test de forma más eficiente que los controles. El tiempo necesario para completar la prueba (figura 77A) está influenciado por el tratamiento ($F_{(2,64)}=5.81$, $p=0.0050$), pero no por la duración de los tratamientos ($F_{(3,64)}=0.383$, $p=0.7658$) ni por la interacción de ambos factores ($F_{(6,64)}=1.36$, $p=0.2451$). De esta forma, los tratamientos disminuyeron el tiempo en comparación al control (CAT: reducción del 49%, $p < 0.01$; POL 60, 39%, $p < 0.05$). En cuanto a los errores cometidos (figura 77B), se ven condicionados por el tratamiento ($F_{(2,64)}=9.26$, $p=0.0003$) y por la duración ($F_{(3,64)}=3.37$, $p=0.0243$), pero no por su interacción ($F_{(6,64)}=1.10$, $p=0.3749$). Los animales

tratados con los antioxidantes cometieron menos errores, tanto en el grupo CAT (36%, $p<0.05$) como en POL 60 (38%, $p<0.01$) en comparación al control. Finalmente, la distancia (figura 77C) también está condicionada por el tratamiento ($F_{(2,64)}=8.63$, $p=0.0005$) y por la duración ($F_{(3,64)}=9.82$, $p<0.0001$), pero no por su interacción ($F_{(6,64)}=1.35$, $p=0.2520$). En los animales tratados con los antioxidantes se redujo significativamente la distancia recorrida (CAT: 26%, $p<0.05$; POL 60: 30%, $p<0.01$).

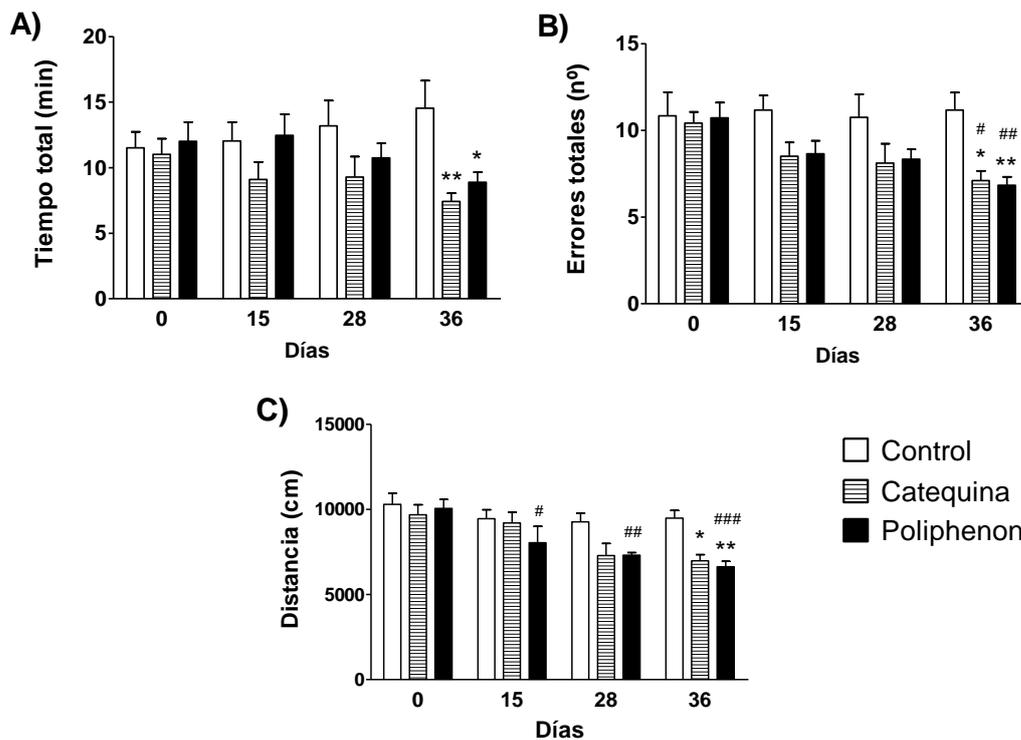


Figura 77. Efecto de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial en ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A), los errores cometidos (B) y la distancia recorrida (C) de los animales tratados con catequina (20+40 mg/kg, $n=6$) y con poliphenon 60 (20+40 mg/kg, $n=7$) frente a los animales del grupo control ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ al comparar con el grupo control; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ comparando los valores obtenidos antes y después de realizar los tratamientos en cada grupo (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

En el test del laberinto de *Barnes* (utilizado para analizar el aprendizaje visoespacial al finalizar los tratamientos), los animales tratados con los antioxidantes CAT y POL 60 ejecutan el test de forma más eficaz ya desde el primer entrenamiento, localizando el *target* en menor tiempo en comparación a los animales control y cometiendo menos errores. La latencia (figura 78A) se ve afectada de forma significativa por el tratamiento ($F_{(2,56)}=22$, $p<0.0001$) y el entrenamiento ($F_{(3,56)}=5.04$, $p=0.0037$), pero no por su interacción ($F_{(6,56)}=0.830$, $p=0.5521$). De forma similar, los errores cometidos (figura 78B) están condicionados por el tratamiento ($F_{(2,56)}=20.1$, $p<0.0001$) y el entrenamiento ($F_{(3,56)}=2.78$, $p=0.0492$), pero no por su interacción ($F_{(6,56)}=0.371$, $p=0.8943$). El test de *Bonferroni* detectó diferencias significativas desde el primer

entrenamiento en los tratamientos CAT y POL 60 al comparar con los controles, tanto en la latencia como en los errores cometidos. Además, se pudo observar que los animales tratados con los antioxidantes utilizaron una mejor estrategia de búsqueda, siguiendo la estrategia directa y seriada en mayor número de casos que los controles, en los que predominó la aleatoria (figura 78C).

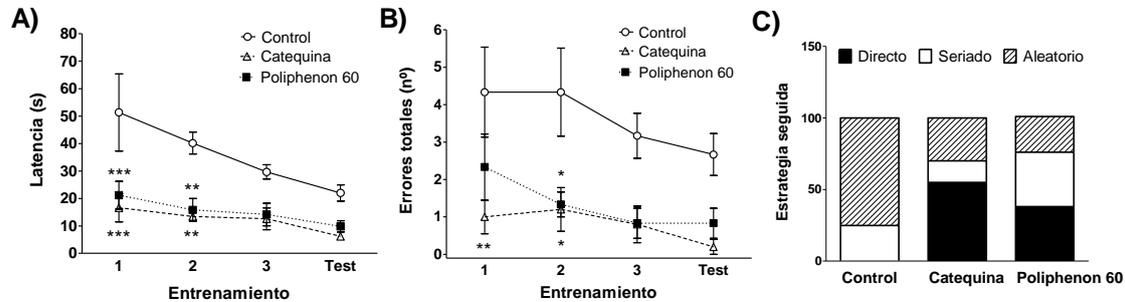


Figura 78. Efecto de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de Barnes en ratas viejas (20 meses). Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo del test de Barnes de los animales tratados con catequina (20+40 mg/kg, n=5) y con poliphenon 60 (20+40 mg/kg, n=6) frente a los animales del grupo control (n=6). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 al comparar con el grupo control (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de Bonferroni).

4.4.1.2 Memoria episódica

Los animales de los diferentes grupos no presentan preferencia por ninguno de los dos objetos en la fase de familiarización (figura 79A). No obstante, al final del estudio los animales tratados con CAT y POL 60 exploran durante más tiempo los dos objetos (64% y 37% respectivamente) en relación al grupo control.

En la fase de test (figura 79B), los resultados se ven afectados por la novedad del objeto ($F_{(1,128)}=88.297$, $p<0.0001$), por el tratamiento ($F_{(2,128)}=4.285$, $p=0.0160$) y por la duración de los tratamientos ($F_{(3,128)}=4.250$, $p=0.0069$), pero no por las interacciones de los parámetros analizados. Los animales tratados con los antioxidantes tienden a explorar más el objeto nuevo que el familiar; así, el test de Fisher detectó cambios significativos en el tiempo de exploración del objeto nuevo y el objeto familiar a partir de los 15 días en el caso de la CAT y de los 28 días en POL 60 hasta el final de los tratamientos. Al finalizar el estudio, los animales del grupo CAT exploran un 85% más el objeto nuevo y un 10% menos el familiar que los animales control, mientras que en el POL 60 se explora un 86% más el objeto nuevo y un 20% menos el familiar.

En relación a lo comentado anteriormente, la diferencia entre la exploración del objeto nuevo y el familiar (figura 79C) está condicionada por el tratamiento ($F_{(2,64)}=8.14$, $p=0.0008$), la duración $F_{(3,64)}=5.34$, $p=0.0026$ y su interacción ($F_{(6,64)}=3.21$, $p=0.0087$). La diferencia del

tiempo de exploración entre los objetos es superior en los animales tratados con los antioxidantes (CAT: 4 veces, $p < 0.001$; POL 60: 4.2 veces, $p < 0.001$) en comparación al control.

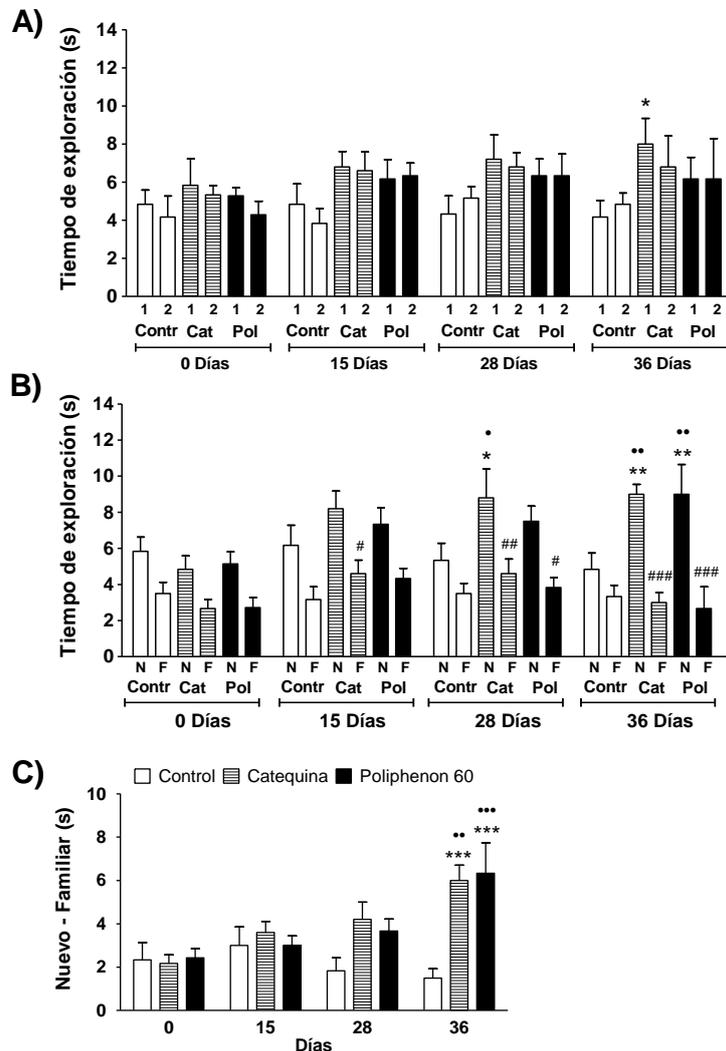


Figura 79. Efecto de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (B: N, objeto nuevo; F, objeto familiar), así como la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar en la fase de test (C) de los animales tratados con catequina (20+40 mg/kg, n=6) y poliphenon 60 (20+40 mg/kg, n=7) frente a los animales del grupo control (n=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar con grupo control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ comparando los valores entre el objeto nuevo y el objeto familiar; • $p < 0.05$, •• $p < 0.01$, ••• $p < 0.001$ al comparar los valores obtenidos antes y después de realizar los tratamientos en cada grupo (A, B: ANOVA de tres factores, seguido por el test de Fisher PLSD; C: ANOVA de dos factores, seguido por el test de Bonferroni).

4.4.1.3 Coordinación motora

La coordinación motora, analizada mediante el tiempo que los animales permanecían sobre la rueda giratoria antes de caer, no mostró cambios significativos tras los tratamientos con CAT y POL 60 (figura 80).

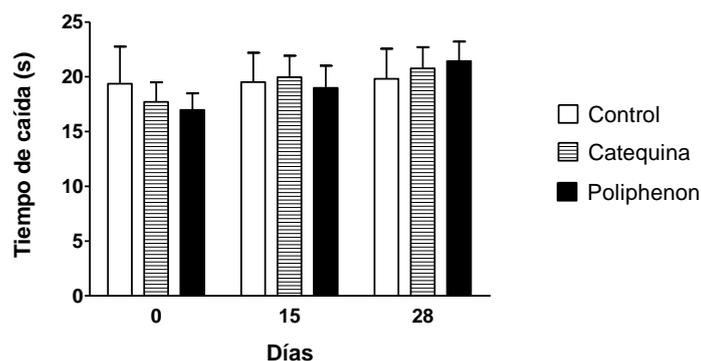


Figura 80. Efecto de los tratamientos con catequina y *poliphenon 60* sobre la coordinación motora mediante el test del *rotarod* en ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de permanencia sobre la rueda giratoria de los animales tratados con catequina (20 mg/kg, n=6) y *poliphenon 60* (20 mg/kg, n=7) frente a los animales del grupo control (n=6). No se detectan diferencias significativas entre los grupos (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.4.2 Efectos de los antioxidantes catequina y *poliphenon 60* sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales *in vivo*

4.4.2.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

En el hipocampo (figura 81), se observó que los tratamientos CAT y POL 60 incrementaron la actividad de la enzima TH, mostrando una mayor acumulación de DOPA ($F_{(2,15)}=14.8$, $p=0.0003$; figura 81A) y de la cantidad de NA ($F_{(2,15)}=11.2$, $p=0.0011$; figura 81B). Los antioxidantes incrementaron los niveles de DOPA (CAT: 158%, $p<0.001$; POL 60: 109%, $p<0.01$) en comparación a los controles, así como NA (CAT: 28%, $p<0.01$; POL 60: 31%, $p<0.01$).

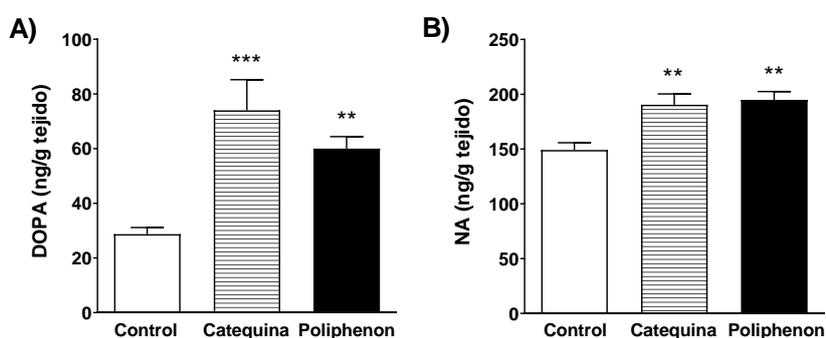


Figura 81. Efecto de los tratamientos con catequina y *poliphenon 60* sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (tras la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) del grupo catequina (20+40 mg/kg, n=5) y *poliphenon 60* (20+40 mg/kg, n=6) frente a los animales del grupo control (n=7). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

En el estriado (figura 82), la administración de los antioxidantes también incrementó significativamente la acumulación de DOPA ($F_{(2,15)}=9.08$, $p=0.0026$; figura 82A), la cantidad de DA ($F_{(2,15)}=7.60$, $p=0.0053$; figura 82B) y su metabolito DOPAC ($F_{(2,15)}=7.97$, $p=0.0044$; figura 82D), aunque no de HVA ($F_{(2,15)}=0.727$, $p=0.4996$; figura 82C). Los antioxidantes aumentaron DOPA (CAT: 32%, $p<0.05$; POL 60: 35%, $p<0.01$), DA (CAT: 26%, $p<0.05$; POL: 60: 28%, $p<0.05$) y DOPAC (CAT: 42%, cambio no significativo; POL 60: 66%, $p<0.01$).

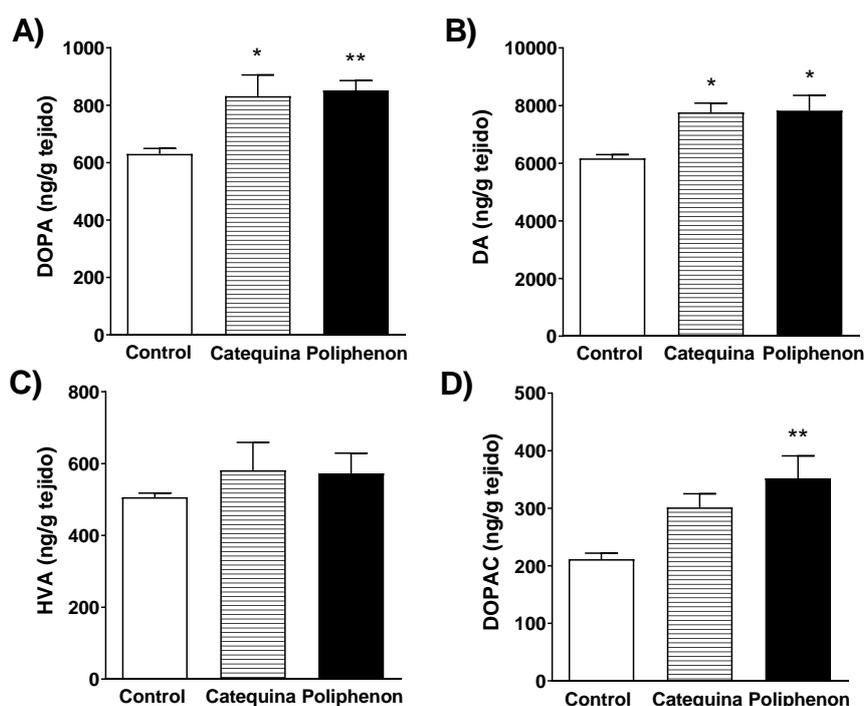


Figura 82. Efecto de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A), los niveles de DA (B) y sus metabolitos HVA (C) y DOPAC (D) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales tratados con catequina (20+40 mg/kg, $n=5$) y con poliphenon 60 (20+40 mg/kg, $n=6$) frente a los del grupo control ($n=7$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ al comparar con el grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de Bonferroni).

4.4.2.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, en el estriado y en la glándula pineal

La actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo (figura 83) tras la aplicación de los antioxidantes también aumentó, con una mayor acumulación de 5-HTP ($F_{(2,15)}=6.67$, $p=0.0085$; figura 83A) y de la cantidad de 5-HT ($F_{(2,15)}=13.6$, $p=0.0004$; figura 83B), aunque no del metabolito 5-HIAA ($F_{(2,15)}=0.249$, $p=0.7827$; figura 83C). Así, se incrementaron de forma significativa los niveles de 5-HTP (CAT: 48%, $p<0.05$; POL 60: 55%, $p<0.05$) y 5-HT (CAT: 18%, $p<0.05$; POL 60: 33%, $p<0.001$) en comparación a los animales del grupo control.

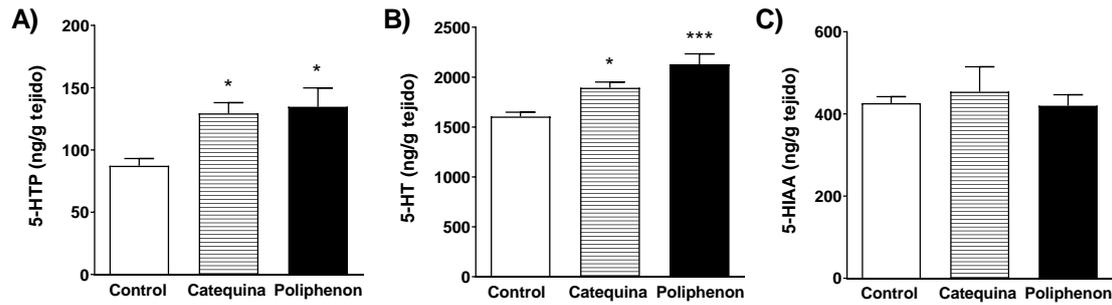


Figura 83. Efecto de los tratamientos con catequina y *poliphenon 60* sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (tras la inhibición de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales tratados con catequina (20+40 mg/kg, n=5) y *poliphenon 60* (20+40 mg/kg, n=6) frente a los animales del grupo control (n=7). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ al comparar con el grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

En el estriado, se observaron cambios significativos tras los tratamientos en la acumulación de 5-HTP ($F_{(2,15)}=13.2$, $p=0.0005$; figura 84A), la cantidad de 5-HT ($F_{(2,15)}=9.74$, $p=0.0019$; figura 84B) y su metabolito 5-HIAA ($F_{(2,15)}=6.17$, $p=0.0111$; figura 84C). La CAT incrementó de forma significativa los niveles de 5-HTP (65%, $p < 0.01$) y aumentó el contenido de 5-HT (50%, $p < 0.01$) en comparación al control, de la misma forma que POL 60 (5-HTP: 62%, $p < 0.01$; 5-HT: 54%, $p < 0.01$). En el caso de 5-HIAA se puede observar el efecto inverso, con una disminución de sus niveles (CAT: 15%, cambio no significativo; POL 60: 18%, $p < 0.05$) en comparación al control.

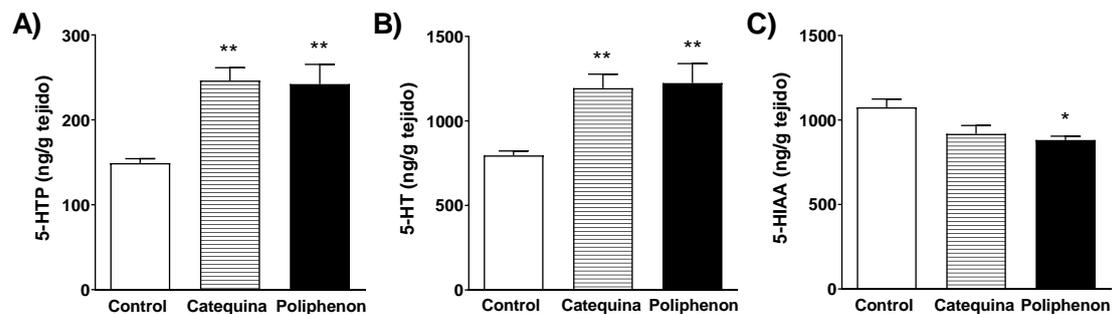


Figura 84. Efecto de los tratamientos con catequina y *poliphenon 60* sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de animales tratados con catequina (20+40 mg/kg, n=5) y *poliphenon 60* (20+40 mg/kg, n=6) frente a los animales del grupo control (n=7). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ al comparar con el grupo control (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

En la glándula pineal (figura 85) se modificó la actividad de la enzima TPH-1, incrementándose de forma significativa los niveles de 5-HTP ($F_{(2,10)}=19.2$, $p=0.0009$; figura 85A), aunque no los de 5-HT ($F_{(2,10)}=2.76$, $p=0.1224$; figura 85B) ni 5-HIAA ($F_{(2,10)}=3.75$,

$p=0.071$; figura 85C). El tratamiento con los dos antioxidantes aumentó de forma significativa los niveles de 5-HTP (CAT: 187%, $p<0.01$; POL 60: 131%, $p<0.05$) en comparación al control.

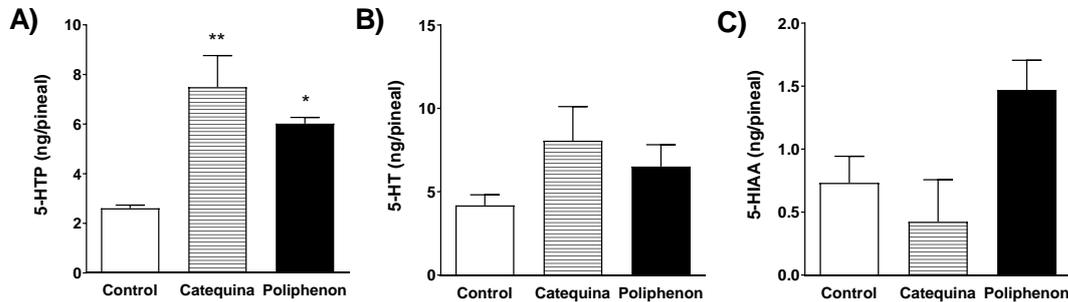


Figura 85. Efecto de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), 5-HT (B) y 5-HIAA (C) en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de animales tratados con catequina (20+40 mg/kg, $n=4$) y poliphenon 60 (20+40 mg/kg, $n=4$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ al comparar con el grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.4.3 Efectos de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo

4.4.3.1 Efectos sobre la proteína SIRT1

La expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo (figura 86) se ve significativamente modificada ($F_{(3,19)}=8.271$, $p=0.0010$). Tras la administración de CAT y POL 60 se observó un incremento significativo de los niveles de SIRT1 (59% y 61% respectivamente, $p<0.01$) respecto a los animales viejos del grupo control.

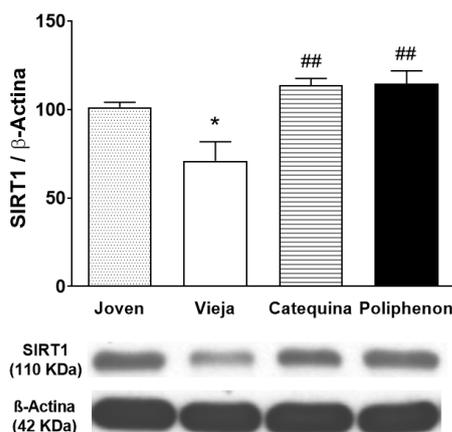


Figura 86. Efecto de los tratamientos con catequina y poliphenon 60 sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales tratados con catequina, 20+40 mg/kg, $n=5$; animales tratados con poliphenon 60, 20+40 mg/kg, $n=6$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=6$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). * $p<0.05$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control; ** $p<0.01$ al comparar con los animales viejos del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la gráfica se muestra un inmunoblot representativo de los cambios obtenidos en SIRT1, sin cambios en la β -actina (patrón de carga).

4.4.3.2 Efectos sobre la proteína NF- κ B total

La determinación de NF- κ B total en el hipocampo de los cuatro grupos no mostró diferencias significativas respecto de la inmunoreactividad de esta proteína ($F_{(3,18)}=0.7170$, $p=0.5546$), con la metodología seguida en este estudio (figura 87).

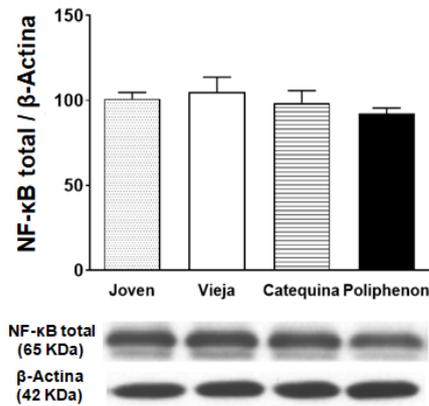


Figura 87. Efecto de los tratamientos con catequina y polifenon 60 sobre la expresión de la proteína NF- κ B total (65 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales tratados con catequina, 20+40 mg/kg, $n=5$; animales tratados con polifenon 60, 20+40 mg/kg, $n=5$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=6$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la gráfica.

4.4.3.3 Efectos sobre la proteína RbAp48/46

La expresión de la proteína RbAp48/46 en el hipocampo no se ve modificada por los tratamientos. Los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles, mientras que los animales viejos muestran significativamente una menor proporción de RbAp48/46 ($F_{(3,19)}=6.253$, $p=0.0039$), tanto los controles (40%, $p<0.05$) como los tratados con CAT (45%, $p<0.05$) y POL 60 (46%, $p<0.01$) (figura 88).

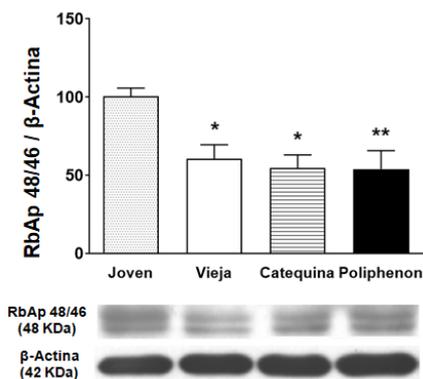


Figura 88. Efecto de los tratamientos con catequina y polifenon 60 sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales tratados con catequina, 20+40 mg/kg, $n=5$; animales tratados con polifenon 60, 20+40 mg/kg, $n=6$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=6$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la gráfica.

4.5 Efectos del ejercicio y del ejercicio más catequina sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas viejas

En este apartado se presentan los efectos del ejercicio físico durante 5 semanas (grupo Ejerc) y la combinación del ejercicio físico junto a la administración del antioxidante catequina (20

mg/kg durante 28 días, seguido por otra dosis de 40 mg/kg durante 7 días más; grupo Ejerc + Cat), tanto a nivel comportamental como a nivel neuroquímico. A los animales del grupo control se les administró el vehículo de dilución (aceite de maíz, 1 ml/kg/día, i.p.).

4.5.1 Efectos conductuales del ejercicio y del ejercicio más catequina en ratas viejas

4.5.1.1 Memoria de trabajo espacial y aprendizaje visoespacial

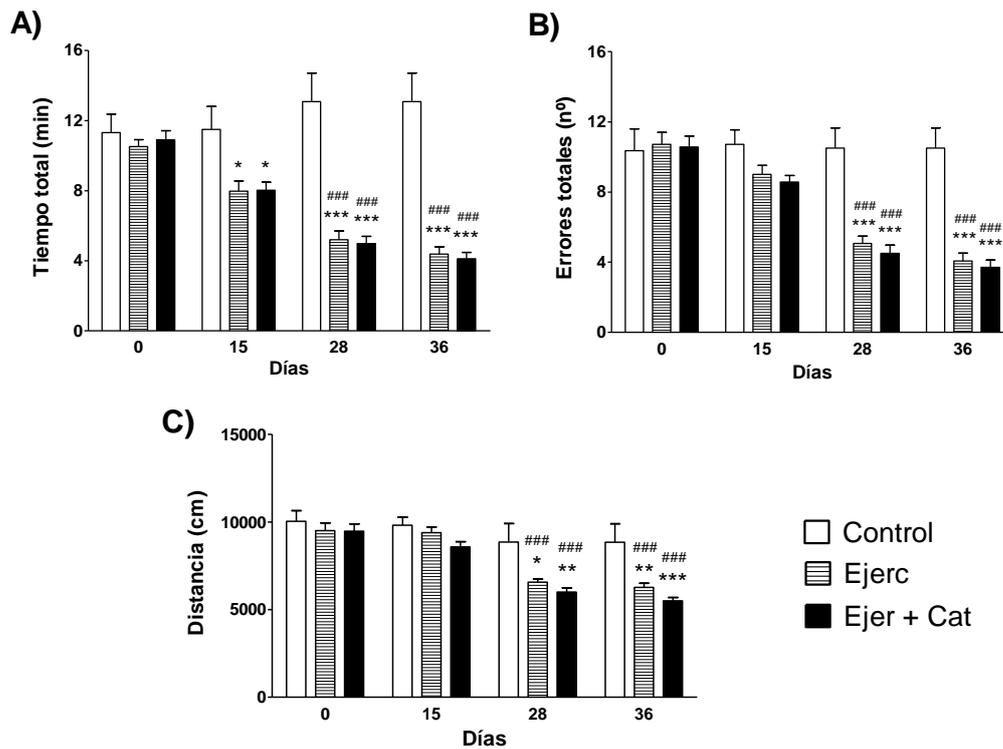


Figura 89. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial en ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A), los errores cometidos (B) y la distancia recorrida (C) de los animales sometidos a ejercicio (Ejerc, n=7) y a ejercicio junto al tratamiento con el antioxidante catequina (Ejerc + Cat, n=7) frente a los animales del grupo control (n=7). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 al comparar con el grupo control; ###p<0.001 comparando los valores obtenidos antes y después de realizar los tratamientos en cada grupo (ANOVA de dos factores, seguido por el test de Bonferroni).

Los resultados del test del laberinto radial (figura 89) indican que tanto el ejercicio físico como la acción conjunta del ejercicio físico y la catequina mejoran la ejecución del test. El tiempo necesario para completar la prueba (figura 89A) se ve significativamente influido por el tratamiento ($F_{(2,72)}=44.0$, $p<0.0001$), la duración de los tratamientos ($F_{(3,72)}=9.94$, $p<0.0001$) y su interacción ($F_{(6,72)}=6.03$, $p<0.0001$). Así, los tratamientos disminuyeron el tiempo necesario para finalizar la prueba (Ejerc: 66%, $p<0.001$; Ejerc + Cat: 69%, $p<0.001$) en comparación al control. De forma similar, los errores cometidos (figura 89B) están condicionados por el tratamiento ($F_{(2,72)}=28.4$, $p<0.0001$), la duración ($F_{(3,72)}=23.8$, $p<0.0001$) y su interacción ($F_{(6,72)}=6.06$,

$p < 0.0001$). Los animales sometidos al ejercicio cometieron menos errores de forma significativa (61%, $p < 0.001$), de igual forma que los animales del grupo Ejerc + Cat (65%, $p < 0.001$), en comparación al grupo control. Finalmente, la distancia recorrida (figura 89C) está influenciada por el tratamiento ($F_{(2,72)}=14.5$, $p < 0.0001$) y la duración del tratamiento ($F_{(3,72)}=21$, $p < 0.0001$), pero no por su interacción ($F_{(6,72)}=1.78$, $p=0.1150$). Al finalizar los tratamientos, tanto los animales del grupo Ejerc como los del grupo Ejerc + Cat recorrieron menos distancia en comparación a los animales control (29% y 38% respectivamente, $p < 0.001$).

En el test del laberinto de *Barnes*, los resultados de la latencia indican que los grupos Ejerc y Ejerc + Cat ejecutan el test de forma más eficaz ya desde el primer entrenamiento, localizando el *target* en menos tiempo que los animales control. La latencia (figura 90A) se ve afectada por el tratamiento ($F_{(2,72)}=35.1$, $p < 0.0001$) y el entrenamiento ($F_{(3,72)}=5.04$, $p=0.0037$), pero no por su interacción ($F_{(6,72)}=0.737$, $p=0.6218$). De forma similar, los errores cometidos (figura 90B) están condicionados por el tratamiento ($F_{(2,72)}=13.3$, $p < 0.0001$) y el entrenamiento ($F_{(3,72)}=9.23$, $p < 0.0001$), pero no por su interacción ($F_{(6,72)}=0.147$, $p=0.9890$). El ejercicio redujo la latencia y los errores en el test de forma significativa, sin que se observara ninguna variación significativa por la inclusión del tratamiento con catequina (figura 90A, B). Asimismo, se pudo observar como los animales del grupo Ejerc y Ejerc + Cat siguieron principalmente las estrategias seriada y directa para localizar la caja de escape, mientras que los controles siguieron mayoritariamente la aleatoria (figura 90C).

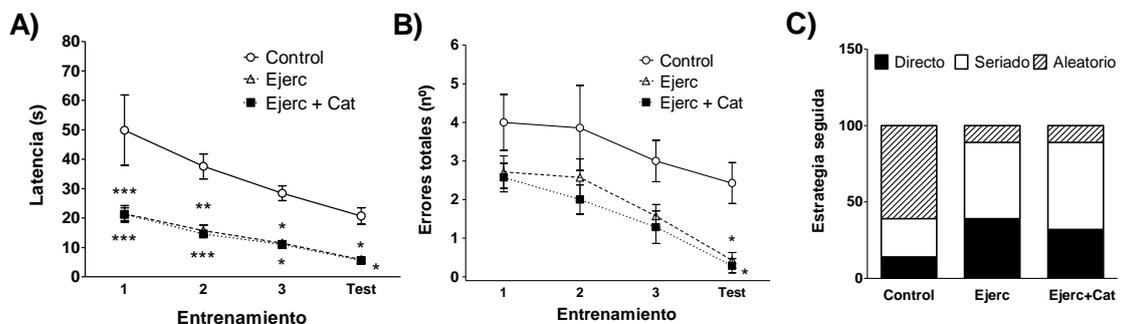


Figura 90. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de Barnes en ratas viejas (20 meses). Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo del test de Barnes de los animales sometidos a ejercicio (Ejerc, $n=7$) y a ejercicio junto al tratamiento con el antioxidante catequina (Ejerc + Cat, $n=7$) frente a los animales del grupo control ($n=7$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C) de los animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar con el grupo control (A, B: ANOVA de dos factores, seguido de *Bonferroni*).

4.5.1.2 Memoria episódica

En la fase de familiarización del test de reconocimiento de objeto nuevo (figura 91A), los animales de los diferentes grupos no presentaron preferencia por ninguno de los dos objetos situados en el campo abierto, aunque al finalizar el experimento los animales de los grupos Ejerc y Ejerc + Cat exploraron durante más tiempo los objetos (93% y 91% respectivamente) en relación al grupo control.

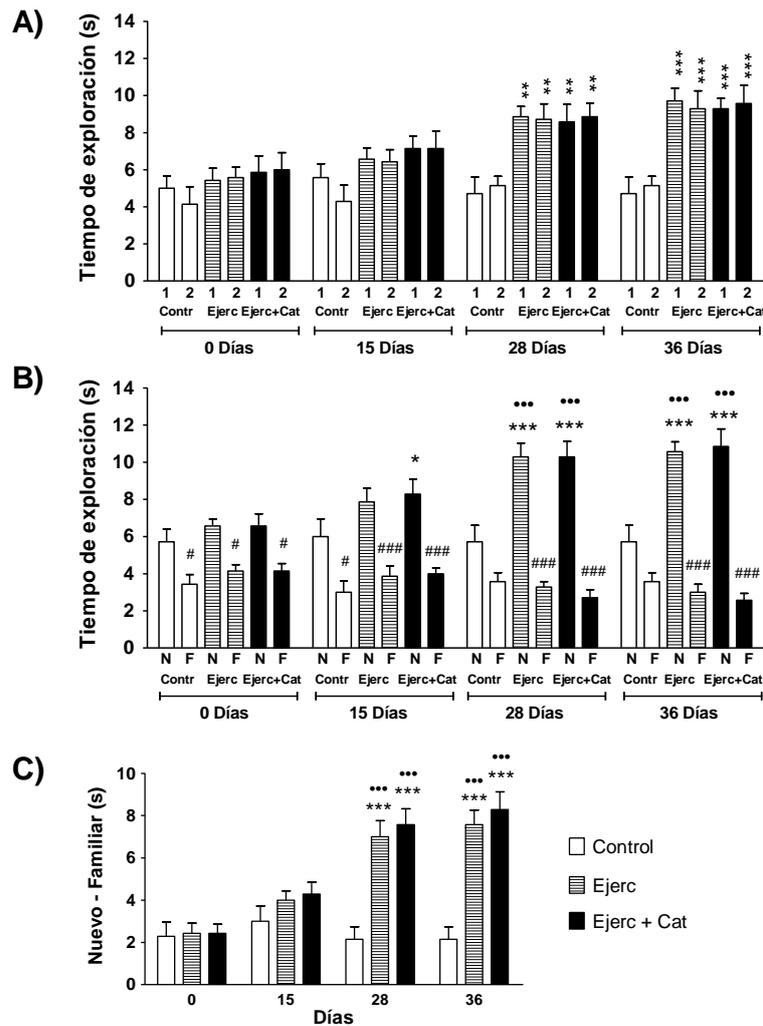


Figura 91. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (B: N, objeto nuevo; F, objeto familiar), así como la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar en la fase de test (C) de los animales sometidos a ejercicio (Ejerc, n=7) y a ejercicio junto al tratamiento con el antioxidante catequina (Ejerc + Cat, n=7) frente a los animales del grupo control (n=7). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar con el grupo control; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ comparando el tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el objeto familiar; ●●● $p < 0.001$ al comparar los valores obtenidos antes y después de realizar los tratamientos en cada grupo (A, B: ANOVA de tres factores, seguido por el test de Fisher PLSD; C: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

En la fase de test (figura 91B), ANOVA de tres factores indicó que los valores estaban condicionados por el objeto ($F_{(1,144)}=296.749$, $p<0.0001$), el tratamiento ($F_{(2,144)}=17.179$, $p=0.0327$) y la duración de los tratamientos ($F_{(3,144)}=2.999$, $p<0.0001$). Asimismo, se detectaron diferencias en la interacción entre los parámetros duración x objeto ($F_{(3,144)}=10.608$, $p<0.0001$), tratamiento x objeto ($F_{(2,144)}=15.871$, $p<0.0001$) y tratamiento x duración x objeto ($F_{(6,144)}=3.387$, $p=0.0037$). Al final del experimento, los animales del grupo Ejerc exploraron un 85% más el objeto nuevo y un 16% menos el familiar respecto a los controles, mientras que dicha exploración en el caso del grupo Ejerc + Cat fue del 90% más en el objeto nuevo y del 28% menos en el familiar.

En relación a lo comentado anteriormente, la diferencia entre el tiempo de exploración del objeto nuevo y el familiar (figura 91C) está influenciada por el tratamiento ($F_{(2,72)}=30.7$, $p<0.0001$), la duración ($F_{(3,72)}=20.5$, $p<0.0001$) y su interacción ($F_{(6,72)}=6.55$, $p<0.0001$). Así, la diferencia del tiempo de exploración entre los objetos es 3.5 veces superior en los animales del grupo Ejerc y 3.9 veces superior en los del grupo Ejerc + Cat en comparación al grupo control.

4.5.1.3 Coordinación motora

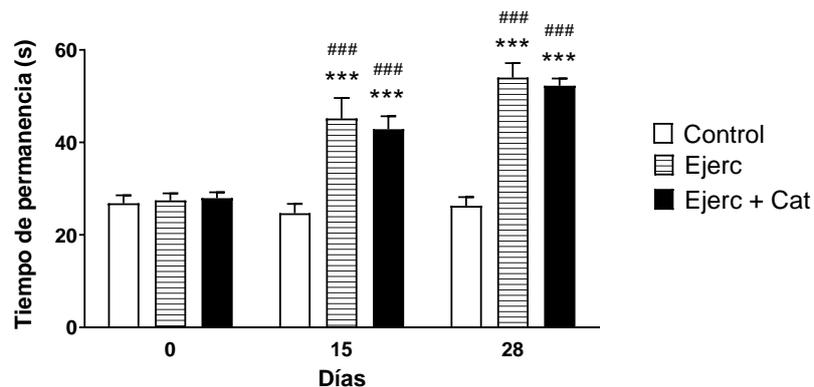


Figura 92. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la coordinación motora mediante el test del *rotarod* en ratas viejas. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de permanencia sobre la rueda giratoria de los animales sometidos a ejercicio (Ejerc, $n=7$) y a ejercicio junto al tratamiento con el antioxidante catequina (Ejerc + Cat, $n=7$) frente a los animales del grupo control ($n=7$). *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control; ### $p<0.001$ comparando los valores obtenidos por cada grupo antes y después de realizar los tratamientos (ANOVA de dos factores, seguido de *Bonferroni*).

El tiempo que los animales permanecen sobre la rueda giratoria (test de *rotarod*; figura 92) está condicionado por el tratamiento ($F_{(2,54)}=40.9$, $p<0.0001$), la duración del mismo ($F_{(2,54)}=35.5$, $p<0.0001$) y su interacción ($F_{(4,54)}=9.96$, $p<0.0001$). A partir de los 15 días ya se observó un incremento significativo del tiempo en los dos grupos que realizaron ejercicio. Cabe indicar que, aunque todos los animales fueron habituados al dispositivo del *rotarod* en la velocidad de mantenimiento (4 rpm), los animales sometidos a ejercicio utilizaban este aparato

para la realización del ejercicio físico moderado. Asimismo, se observó una ligera pérdida de peso a lo largo del estudio en los dos grupos que realizaron ejercicio (Ejerc: 13.16%, $p=0.003$; Ejerc + Cat: 13.39%, $p=0.0001$; t-test de *Student*), lo que pudo favorecer la ejecución del test. No se detectaron cambios de peso en el grupo control.

4.5.2 Efectos del ejercicio y del ejercicio más catequina sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales *in vivo*

4.5.2.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

Los resultados obtenidos en el hipocampo (figura 93) al analizar la actividad de la TH indican que la realización de ejercicio físico, así como la acción conjunta del ejercicio físico y la administración del antioxidante catequina, incrementaron la actividad de esta enzima, observándose una mayor acumulación del contenido de DOPA ($F_{(2,18)}=30.51$, $p<0.0001$; figura 93A) y de NA disponible ($F_{(2,18)}=88.83$, $p<0.0001$; figura 93B). El ejercicio produjo un incremento significativo de los niveles de DOPA (102%, $p<0.001$) en comparación al grupo control, aumento que fue aún mayor en el grupo de animales Ejerc + Cat (161%, $p<0.001$). Esta mayor disponibilidad de DOPA en el hipocampo se tradujo en un incremento de la cantidad de NA en ambos grupos (77% y 103% respectivamente, $p<0.001$).

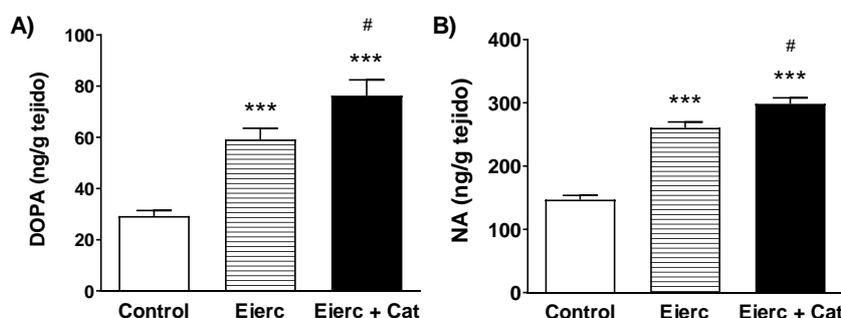


Figura 93. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (tras la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015) (A) y los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales sometidos a ejercicio (Ejerc, $n=7$) y a ejercicio junto al tratamiento con el antioxidante catequina (20 mg/kg durante 28 días, seguido por otra dosis de 40 mg/kg durante 7 días más) (Ejerc + Cat, $n=7$) frente a los animales del grupo control ($n=7$). *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control; # $p<0.05$ comparando los resultados obtenidos por el grupo Ejerc y el grupo Ejerc + Cat (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

En el estriado, se observó también un mayor contenido de DOPA ($F_{(2,18)}=41.41$, $p<0.0001$; figura 94A), de la cantidad de DA ($F_{(2,18)}=63.07$, $p<0.0001$; figura 94B), así como de sus

metabolitos HVA ($F_{(2,18)}=25.32$, $p<0.0001$; figura 94C) y DOPAC ($F_{(2,18)}=13.40$, $p=0.0002$; figura 94D). La aplicación de los tratamientos produjo un incremento significativo de DOPA (Ejerc: 25%, $p<0.01$; Ejerc + Cat: 53%, $p<0.001$), así como un aumento de DA (Ejerc: 49%, $p<0.001$; Ejerc + Cat: 60%, $p<0.001$) y de sus metabolitos HVA (Ejerc: 13%, $p<0.01$; Ejerc + Cat: 25%, $p<0.001$) y DOPAC (Ejerc: 26%, $p<0.01$; Ejerc + Cat: 33%, $p<0.001$) en comparación a los controles.

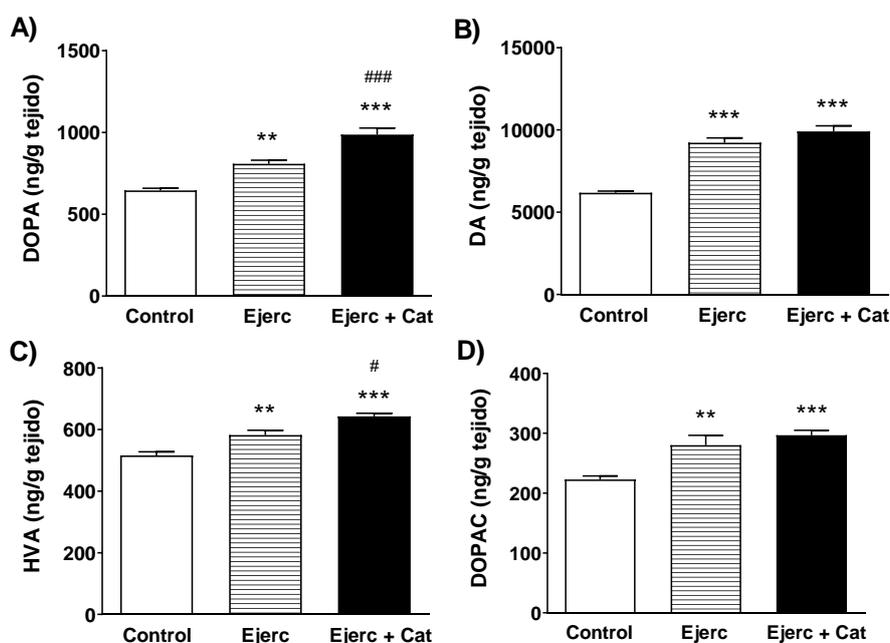


Figura 94. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A) y los niveles de DA (B), así como de sus metabolitos HVA (C) y DOPAC (D), en tejido fresco (ng/g) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales sometidos a ejercicio (Ejerc, $n=7$) y a ejercicio junto al tratamiento con catequina (Ejerc + Cat, $n=7$) frente a los animales del grupo control ($n=7$, aceite de maíz, 1 ml/kg, i.p.). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control; # $p<0.05$, ### $p<0.001$ comparando los resultados obtenidos por el grupo Ejerc y el grupo Ejerc + Cat (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*).

4.5.2.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, en el estriado y en la glándula pineal

La actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo (figura 95) aumentó tanto en el grupo Ejerc como el grupo Ejerc + Cat, asociado a una mayor acumulación de 5-HTP ($F_{(2,18)}=100.2$, $p<0.0001$; figura 95A). También aumentó la cantidad de 5-HT ($F_{(2,18)}=61.74$, $p<0.0001$; figura 95B) y de 5-HIAA ($F_{(2,18)}=3.425$, $p=0.0537$; figura 95C) en comparación al grupo control. Los niveles de 5-HTP se incrementaron en el grupo Ejerc (103%, $p<0.001$) y aún más en el grupo Ejerc + Cat (136%, $p<0.001$), que conllevó un aumento de 5-HT (36% y 72% respectivamente, $p<0.001$), sin que se observara una alteración significativa de 5-HIAA.

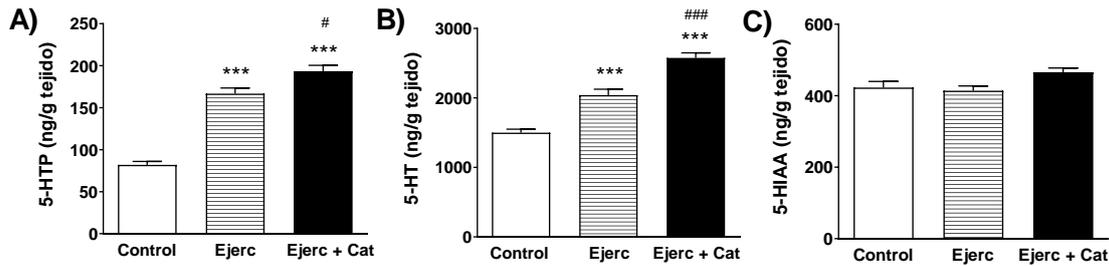


Figura 95. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (tras la inhibición de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales sometidos a ejercicio (Ejerc, n=7) y a ejercicio junto al tratamiento con el antioxidante catequina (Ejerc + Cat, n=7) frente a los animales del grupo control (n=7). ***p<0.001 comparando con el grupo control; #p<0.05, ###p<0.001 al comparar los resultados obtenidos por el grupo Ejerc y el grupo Ejerc + Cat (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

De forma similar, en el estriado los resultados evidenciaron una modificación significativa de la actividad de la TPH-2 en los dos grupos de animales tratados (Ejerc y Ejerc + Cat), asociado a un mayor contenido de 5-HTP ($F_{(2,18)}=141.2$, $p<0.0001$; figura 96A) y 5-HT ($F_{(2,18)}=48.73$, $p<0.0001$; figura 96B); sin embargo, no se observaron cambios significativos en el metabolito 5-HIAA ($F_{(2,18)}=1.232$, $p=0.3140$; figura 96C). Los valores de 5-HTP mostraron un incremento significativo tras los tratamientos (Ejerc: 65%, $p<0.001$; Ejerc + Cat: 83%, $p<0.001$), conllevando un aumento de 5-HT (87% y 132% respectivamente, $p<0.001$) en comparación al grupo control.

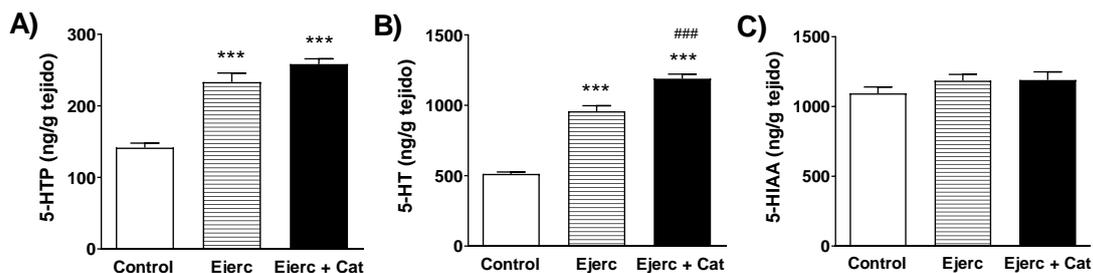


Figura 96. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de animales sometidos a ejercicio (Ejerc, n=7) y a ejercicio junto al tratamiento con catequina (Ejerc + Cat, n=7) frente a los animales del grupo control (n=7). ***p<0.001 al comparar con el grupo control; ###p<0.001 comparando los resultados obtenidos por el grupo Ejerc y el grupo Ejerc + Cat (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

La síntesis de 5-HT también se modificó en la glándula pineal (figura 97), con aumentos significativos de los niveles de 5-HTP ($F_{(2,16)}=23.6$, $p<0.0001$; figura 97A) y 5-HT ($F_{(2,16)}=14.9$,

$p=0.0003$; figura 97B), aunque no del metabolito 5-HIAA ($F_{(2,16)}=0.153$, $p=0.8595$; figura 97C). Así, se observó un incremento significativo de 5-HTP (Ejerc: 83%, $p<0.001$; Ejerc + Cat: 119%, $p<0.001$) y 5-HT (Ejerc: 131%, $p<0.001$; Ejerc + Cat 132%, $p<0.01$) en comparación al grupo control.

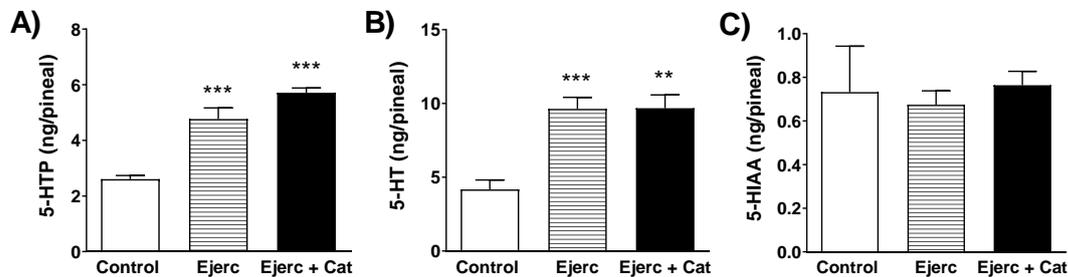


Figura 97. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) así como del metabolito 5-HIAA (C) en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de animales sometidos a ejercicio (Ejerc, $n=7$) y a ejercicio junto al tratamiento con el antioxidante catequina (Ejerc + Cat, $n=6$) frente a los animales del grupo control ($n=6$). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.5.3 Efectos del ejercicio y del ejercicio más catequina sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo

4.5.3.1 Efectos sobre la proteína SIRT1

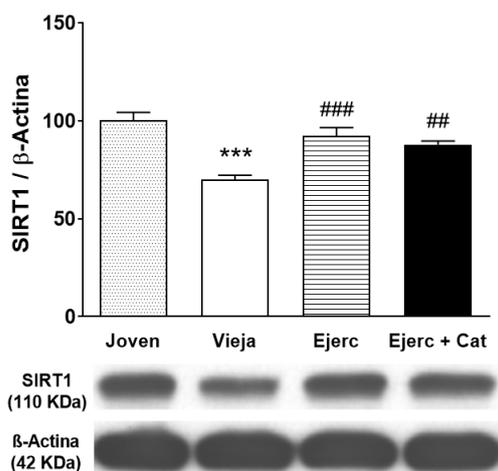


Figura 98. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a ejercicio, Ejerc, $n=7$; ejercicio junto a catequina 20+40 mg/kg, Ejerc + Cat, $n=7$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=6$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). *** $p<0.001$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control; ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ al comparar con los animales viejos del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo de los cambios obtenidos en SIRT1, sin cambios en la β -actina (patrón de carga).

La expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo (figura 98) se vio significativamente modificada ($F_{(3,22)}=17.48$, $p<0.0001$). Los resultados obtenidos en el grupo Ejerc muestran un

incremento significativo de los niveles de SIRT1 respecto a los animales viejos del grupo control (32%, $p < 0.001$), del mismo modo que los animales del grupo que practicó ejercicio y recibió catequina (26%, $p < 0.01$).

4.5.3.2 Efectos sobre la proteína NF- κ B total

Los resultados obtenidos de la inmunoreactividad de la proteína NF- κ B total en el hipocampo no muestran diferencias significativas tras la aplicación de los diferentes tratamientos ($F_{(3,22)}=1.197$, $p=0.3340$). De este modo, con el anticuerpo utilizado en este estudio, los animales jóvenes presentaron unos niveles similares a los obtenidos en los diferentes grupos de animales viejos (control, Ejerc y Ejerc + Cat) (figura 99).

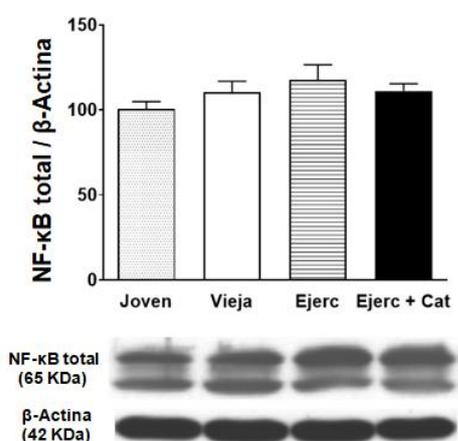


Figura 99. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la expresión de la proteína total (65 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a ejercicio, Ejerc, $n=7$; ejercicio junto a catequina 20+40 mg/kg, Ejerc + Cat, $n=7$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=6$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido de *Bonferroni*). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la gráfica.

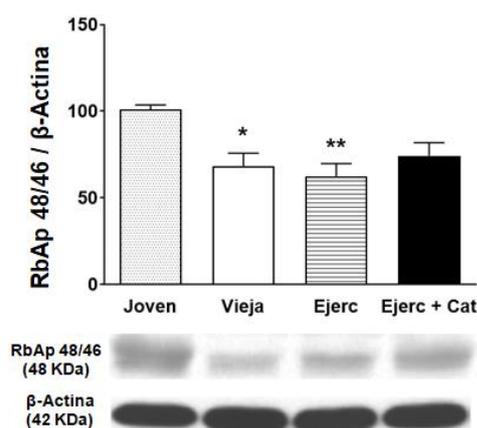


Figura 100. Efecto del ejercicio y de la acción conjunta del ejercicio con el tratamiento del antioxidante catequina sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a ejercicio, Ejerc, $n=7$; ejercicio junto a catequina 20+40 mg/kg, Ejerc + Cat, $n=7$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=6$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo.

4.5.3.3 Efectos sobre la proteína RbAp48/46

En el hipocampo, el ejercicio y su acción junto a la catequina no fueron capaces de revertir la disminución de la expresión de la proteína RbAp48/46 producida con la edad ($F_{(3,22)}=6.052$, $p=0.0036$). De este modo, los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles, mientras

que los animales viejos muestran una menor proporción de RbAp48/46 (33%, $p < 0.05$), disminución que también se observa en el grupo Ejerc (38%, $p < 0.01$). En el grupo Ejerc + Cat esta reducción (27%) no presentó cambios significativos (figura 100).

4.6 Efectos del enriquecimiento ambiental iniciado a distintas edades (1, 7 y 18.5 meses de edad) sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas viejas

En este apartado aparecen los efectos de la aplicación de tres programas de enriquecimiento ambiental, iniciados a partir de 1 mes, de 7 meses y de 18.5 meses de edad hasta los 20 meses, sobre el proceso de envejecimiento, tanto a nivel comportamental como a nivel neuroquímico.

4.6.1 Efectos del programa de enriquecimiento ambiental aplicado desde 1 mes de edad hasta los 20 meses de vida (enriquecimiento ambiental temprano)

La aplicación del programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo, iniciado a edades tempranas (desde 1 mes hasta los 20 meses de edad; grupo EA 1-20), indujo cambios de tipo conductual y neuroquímico, sin modificar el peso de los animales en comparación al grupo control a lo largo de todo su desarrollo (figura 101). El peso de los animales está condicionado por la edad de los animales ($F_{(19,440)}=152$, $p < 0.0001$), pero no se ve afectado por el tratamiento ($F_{(1,440)}=0.934$, $p=0.3343$) ni por la interacción de ambos factores ($F_{(19,440)}=0.241$, $p=0.9997$).

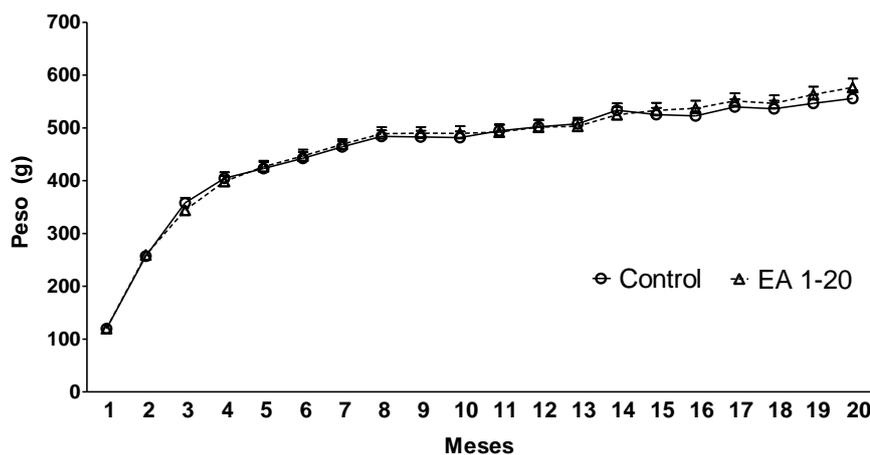


Figura 101. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre el peso de los animales. Los puntos representan el promedio \pm error estándar del peso (g) de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental (EA 1-20, $n=12$) a largo plazo (desde 1 mes de edad hasta los 20 meses) frente a los animales del grupo control ($n=12$). No se detectan diferencias significativas entre los dos grupos (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.6.1.1 Efectos conductuales producidos por el programa de enriquecimiento ambiental temprano

4.6.1.1.1 Memoria de trabajo espacial y aprendizaje visoespacial

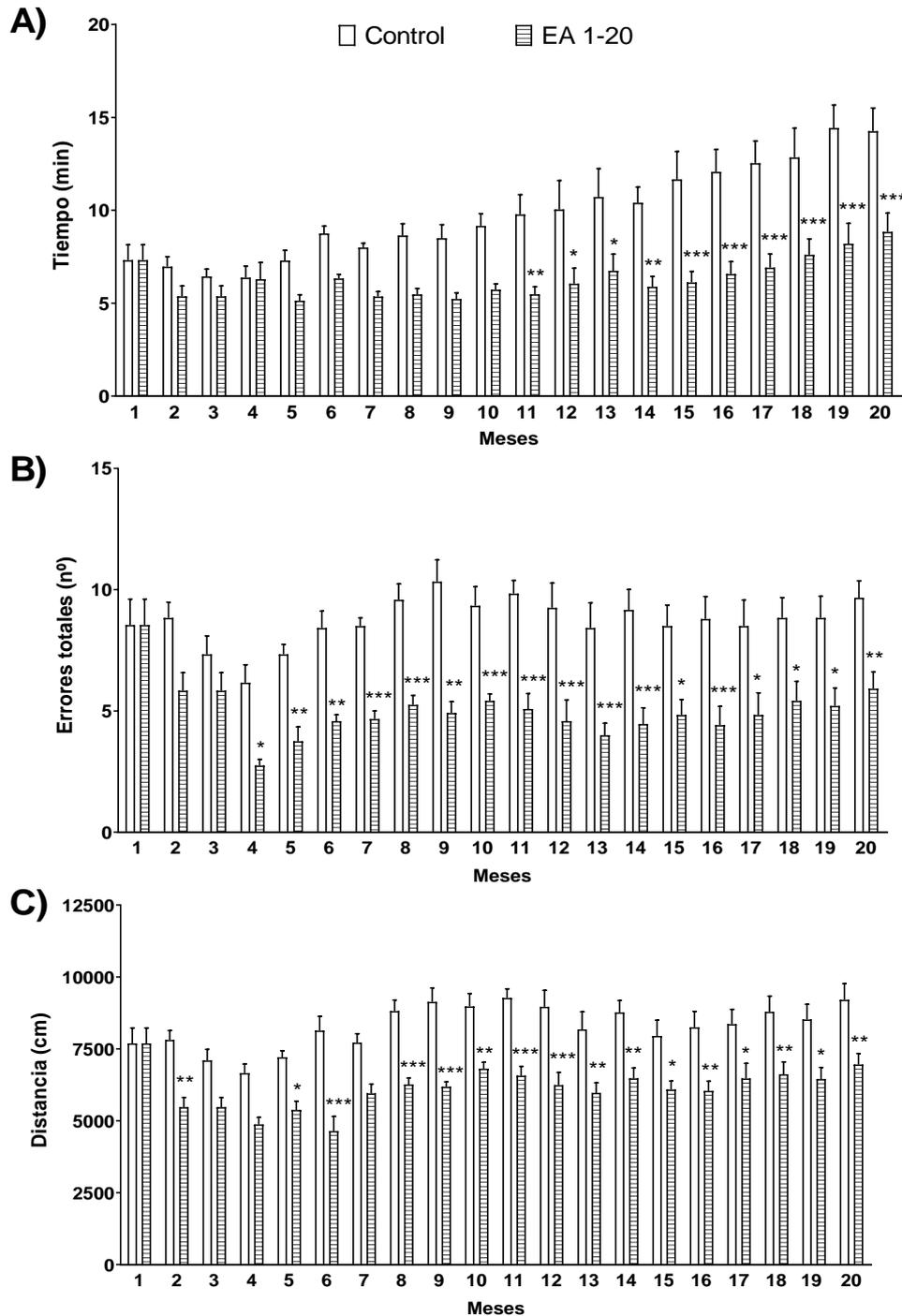


Figura 102. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A), los errores cometidos (B) y la distancia recorrida (C) de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses; EA 1-20, n=12) frente a los animales del grupo control (n=12). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar el grupo control (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

Los resultados del laberinto radial (figura 102) indican que la aplicación del EA desde edades tempranas (1 mes) hasta los 20 meses (EA 1-20) mejora la ejecución del test en comparación al grupo control. El tiempo requerido para completar la prueba (figura 102A) se ve significativamente influenciado por el tratamiento ($F_{(1,440)}=166$, $p<0.0001$), así como por la duración ($F_{(19,440)}=7.57$, $p<0.0001$) y por su interacción ($F_{(19,440)}=2.36$, $p=0.0011$). El EA disminuyó el tiempo necesario para finalizar la prueba ya desde los 11 meses de edad (44%, $p<0.01$) hasta el final del tratamiento (38%, $p<0.001$) en comparación al grupo control. En cuanto a los errores cometidos (figura 102B), los resultados se ven condicionados por el tratamiento ($F_{(1,440)}=249$, $p<0.0001$) y la duración ($F_{(19,440)}=2.67$, $p=0.0002$), pero no por su interacción ($F_{(19,440)}=1.28$, $p=0.1895$). Así, los animales sometidos a EA cometen menos errores de forma significativa ya desde los 4 meses (48%, $p<0.05$) hasta el final del tratamiento (reducción del 39%, $p<0.01$) en comparación al grupo control. Finalmente, la distancia recorrida (figura 102C) se ve influenciada por el tratamiento ($F_{(1,440)}=261$, $p<0.0001$) y por la duración ($F_{(19,440)}=4.75$, $p<0.0001$), aunque no por su interacción ($F_{(19,440)}=1.31$, $p=0.1723$). Los animales sometidos a EA recorren menos distancia a partir del segundo mes (30%, $p<0.01$) hasta el final del tratamiento (24%, $p<0.01$).

En el test del laberinto de *Barnes* (utilizado para analizar el aprendizaje visoespacial durante la aplicación del EA), a los 6 meses los datos de la latencia indican que todos los animales poseen capacidad de aprendizaje a lo largo de los diferentes entrenamientos (figura 103). La latencia (figura 103A) se ve afectada por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=4.10$, $p=0.010$), pero no está condicionada por el tratamiento ($F_{(1,64)}=2.79$, $p=0.0997$) ni por la interacción de ambos dos factores ($F_{(3,64)}=0.0526$, $p=0.9840$).

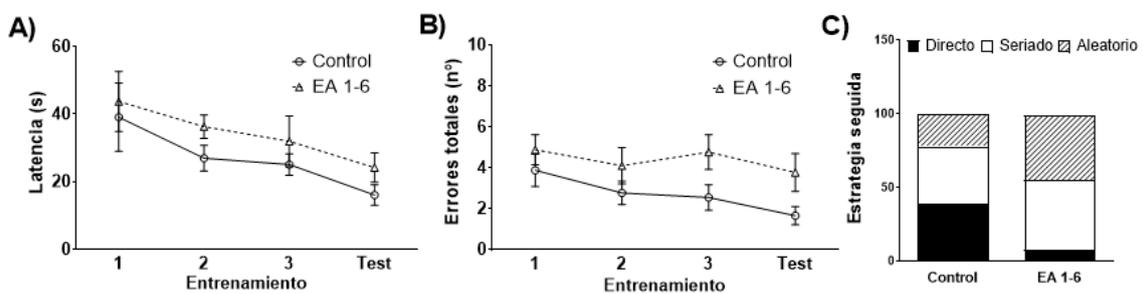


Figura 103. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de *Barnes* a los 6 meses de edad. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo del test de *Barnes* de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 1 mes de edad hasta los 6 meses (EA 1-6, $n=9$) frente a los animales del grupo control ($n=9$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

En cuanto a los errores cometidos (figura 103B), están condicionados por el tratamiento ($F_{(1,64)}=10.0$, $p=0.0024$), pero no por los entrenamientos ($F_{(3,64)}=1.70$, $p=0.1762$) ni por su interacción ($F_{(3,64)}=0.319$, $p=0.8116$). La comparación individual mediante el test de *Bonferroni* en la latencia y los errores no detectó diferencias significativas entre grupos de animales. Por otra parte, las estrategias seguidas para localizar el *target* en los animales control fueron principalmente la estrategia directa junto a la estrategia seriada. A diferencia de estos resultados, los animales sometidos a EA siguieron principalmente la estrategia seriada y la aleatoria.

A los 12 meses, la latencia (figura 104A) está influida por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=6.28$, $p=0.0008$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.001$, $p=0.9949$) ni su interacción ($F_{(3,64)}=0.496$, $p=0.6866$). En cuanto a los errores (figura 104B), se ven afectados por el tratamiento ($F_{(1,64)}=6.12$, $p=0.0161$) y el entrenamiento ($F_{(3,64)}=4.71$, $p=0.0049$), pero no por su interacción ($F_{(3,64)}=0.156$, $p=0.9252$). La comparación individual mediante el test de *Bonferroni* en la latencia y errores no detectó diferencias significativas. Además, la principal estrategia seguida para localizar el *target* en ambos grupos fue la estrategia seriada (figura 104C).

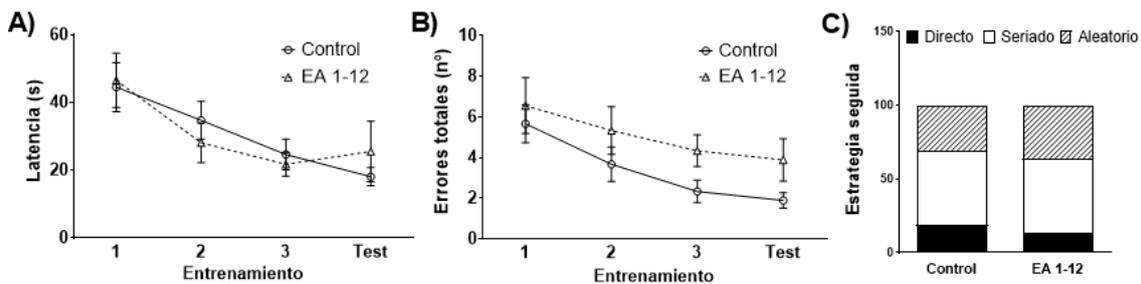


Figura 104. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de Barnes a los 12 meses de edad. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo del test de Barnes de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 1 mes de edad hasta los 12 meses (EA 1-12, $n=9$) frente a los animales del grupo control ($n=9$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

Finalmente, a los 19 meses la latencia (figura 105A) está condicionada por el tratamiento ($F_{(1,64)}=3.94$, $p=0.051$) y el entrenamiento ($F_{(3,64)}=13$, $p<0.0001$), pero no por su interacción ($F_{(3,64)}=1.81$, $p=0.1549$). En cuanto a los errores (figura 105B), se ven afectados por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=3.01$, $p=0.0371$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.525$, $p=0.4717$) ni su interacción ($F_{(3,64)}=0.504$, $p=0.6813$). La comparación individual mediante el test de *Bonferroni* en la latencia y errores no detectó diferencias significativas. Además, la principal estrategia seguida para localizar el *target* en ambos grupos fue la estrategia seriada y la estrategia aleatoria, con una reducción considerable de la estrategia directa en relación a los meses anteriores (figura 105C).

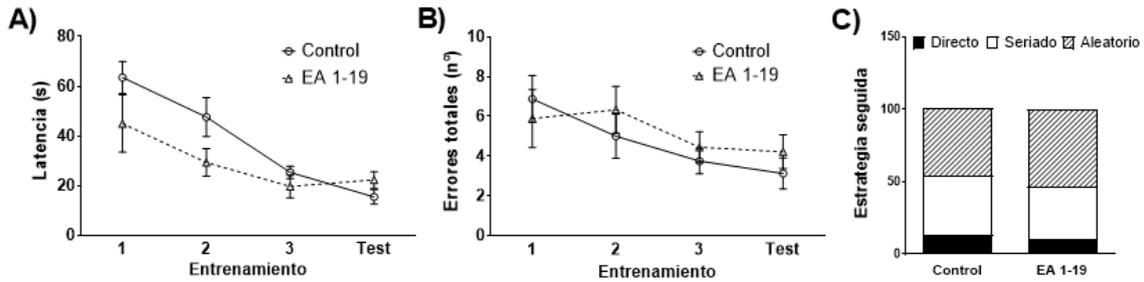


Figura 105. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de Barnes a los 19 meses de edad. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo del test de Barnes de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 1 mes de edad hasta los 19 meses (EA 1-19, $n=9$) frente a los animales del grupo control ($n=9$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.6.1.1.2 Memoria episódica

En el test de reconocimiento de objeto nuevo, los datos de la fase de familiarización (figura 106A) revelan cómo los animales de los dos grupos no presentan preferencia por ninguno de los objetos situados en el campo abierto. Por otra parte, los animales sometidos a enriquecimiento desde edades tempranas tienden a explorar durante más tiempo los objetos (a los 20 meses el tiempo de exploración promedio en el grupo EA 1-20 es un 28% superior al grupo control).

En la fase de test (figura 106B), ANOVA de tres factores indicó que los valores están condicionados por el objeto ($F_{(1,880)}=556.207$, $p<0.0001$), por el tratamiento ($F_{(1,880)}=91.207$, $p<0.0001$) y por la duración de los tratamientos ($F_{(19,880)}=3.875$, $p<0.0001$). Asimismo, se detectaron diferencias en la interacción entre los parámetros tratamiento \times objeto ($F_{(1,880)}=40.459$, $p<0.0001$). Los cambios observados son debidos a que los animales sometidos a enriquecimiento tienden a explorar más el objeto nuevo que el familiar a lo largo de toda su vida. Así, mientras que en los animales del grupo control el test de *Fisher PLSD* no detectó diferencias significativas entre el objeto nuevo y el objeto familiar a partir de los 5 meses de edad, en el grupo EA 1-20 se encontraron diferencias significativas entre ambos objetos hasta los 20 meses (momento en que los animales del grupo EA 1-20 exploran un 54% más el objeto nuevo y un 6% menos el familiar que los controles).

En relación a lo comentado anteriormente, la diferencia entre el tiempo de exploración del objeto nuevo y el familiar (figura 107) está influenciada por el tratamiento ($F_{(1,440)}=118$, $p<0.0001$) y la duración ($F_{(19,440)}=3.63$, $p<0.0001$), pero no por su interacción ($F_{(19,440)}=0.622$, $p=0.8902$). En los animales sometidos a EA, el tiempo de exploración del objeto nuevo menos el familiar, en comparación al grupo control, es significativamente superior desde los 15 meses de edad (2.5 veces, $p<0.05$) hasta el final del tratamiento (3 veces, $p<0.05$).

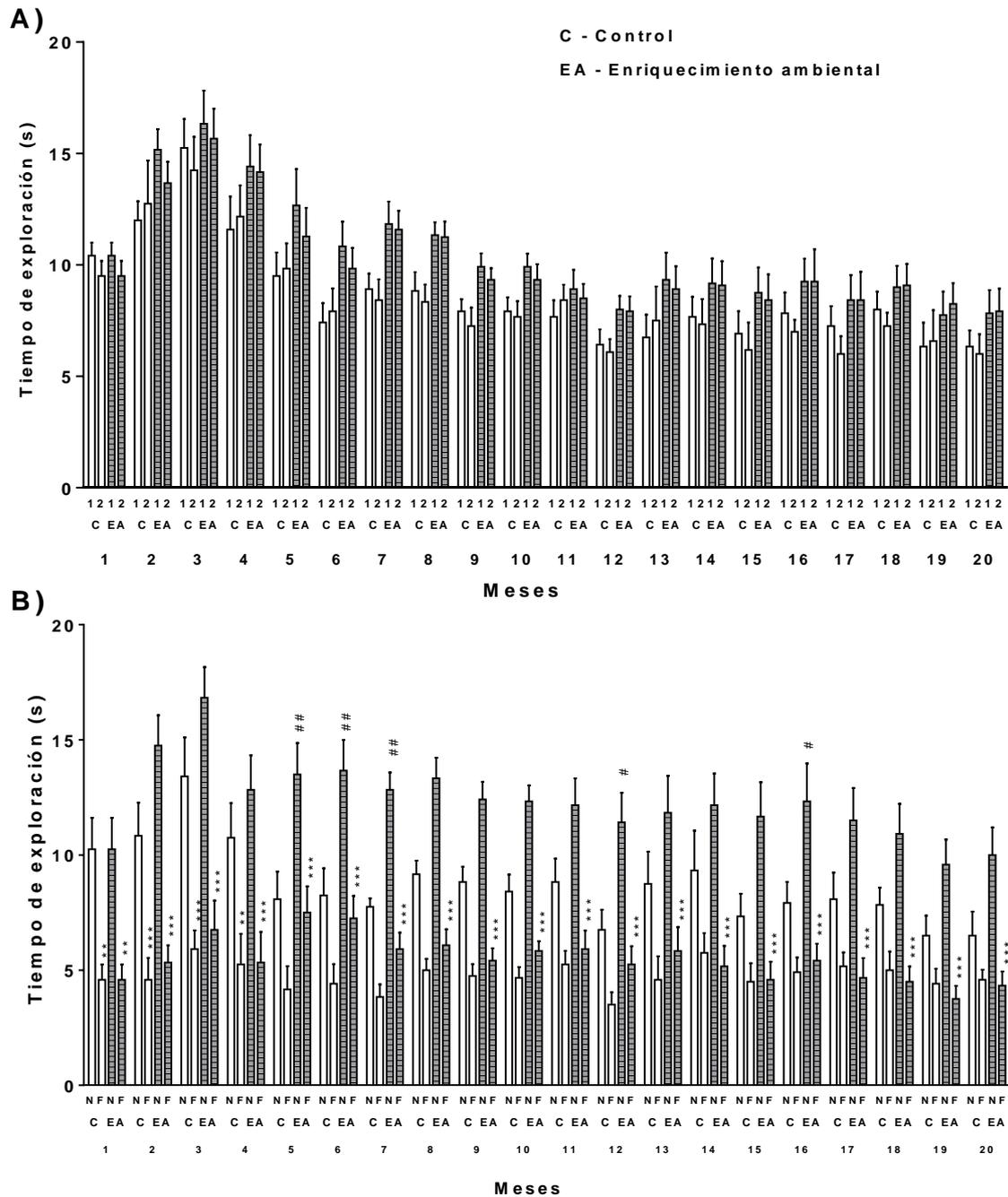


Figura 106. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (B: N, objeto nuevo; F, objeto familiar) de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses; EA 1-20, n=12) frente a los animales del grupo control (C, n=12). **p<0.01, ***p<0.001 al comparar el tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar; #p<0.05, ##p<0.01 comparando los valores respecto al grupo control (ANOVA de tres factores, seguido por el test de *Fisher PLSD*).

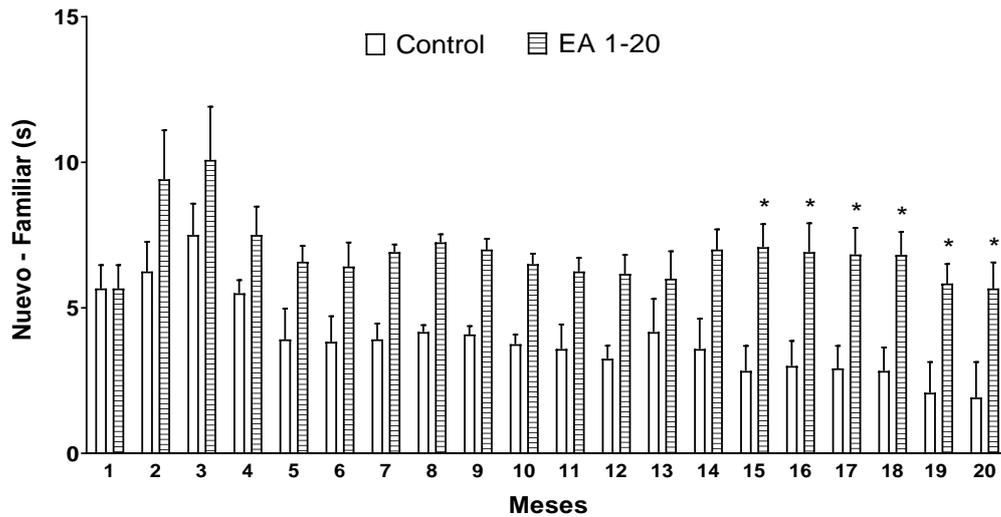


Figura 107. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar en la fase de test de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses; EA 1-20, n=12) frente a los animales del grupo control (n=12). * $p < 0.05$ al comparar con el grupo control (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.6.1.1.3 Coordinación motora

Al analizar la coordinación motora (figura 108), se observa cómo el tiempo que los animales permanecen sobre la rueda giratoria antes de caer está condicionado por el tratamiento ($F_{(1,440)}=11.1$, $p=0.0009$), aunque no por la duración ($F_{(19,440)}=0.416$, $p=0.9868$) ni su interacción ($F_{(19,440)}=0.511$, $p=0.9581$).

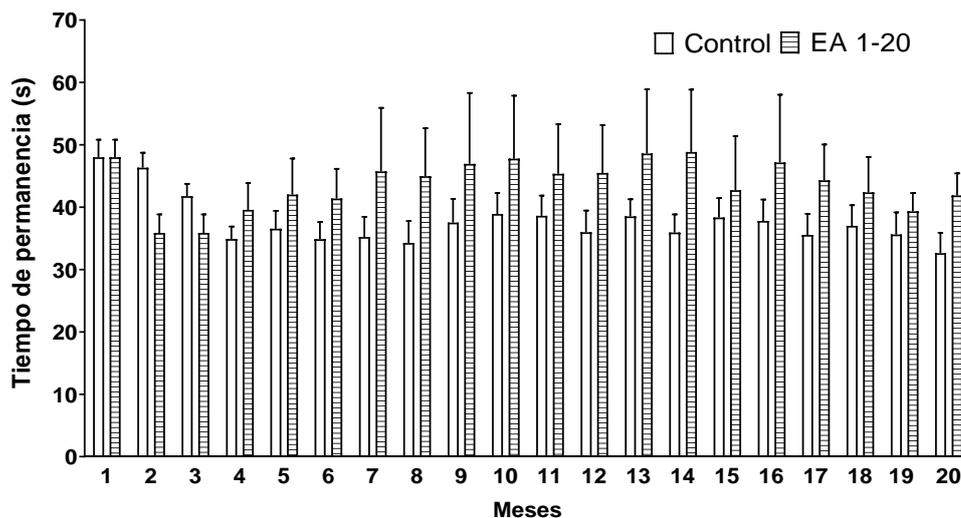


Figura 108. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la coordinación motora mediante el test del *rotarod*. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo que permanecen en la rueda giratoria antes de caer de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses; EA 1-20, n=12) frente a los animales del grupo control (n=12). ANOVA de dos factores seguido por el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre ambos grupos.

Sin embargo, aunque con el EA se produjo un incremento del tiempo que los animales permanecían sobre la rueda giratoria, el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas. Cabe indicar que a nivel cualitativo los animales sometidos a enriquecimiento presentaban un comportamiento motor diferente y más complejo, siendo capaces de girar sobre la rueda giratoria y permanecer en ella corriendo hacia atrás, o incluso coger impulso para saltar de la rueda giratoria, estando también interesados en explorar el dispositivo a la vez que corrían sobre la rueda.

4.6.1.2 Efecto del enriquecimiento ambiental temprano sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales *in vivo*

4.6.1.2.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

En el hipocampo, se observó un incremento de la actividad de la enzima TH de ratas viejas sometidas a EA a largo plazo (desde 1 mes de edad de los animales hasta los 20 meses) (figura 109), asociado a una mayor acumulación de DOPA (112%, $p=0.0003$; figura 109A) y de la cantidad de NA (34%, $p=0.0064$; figura 109B) en comparación al control.

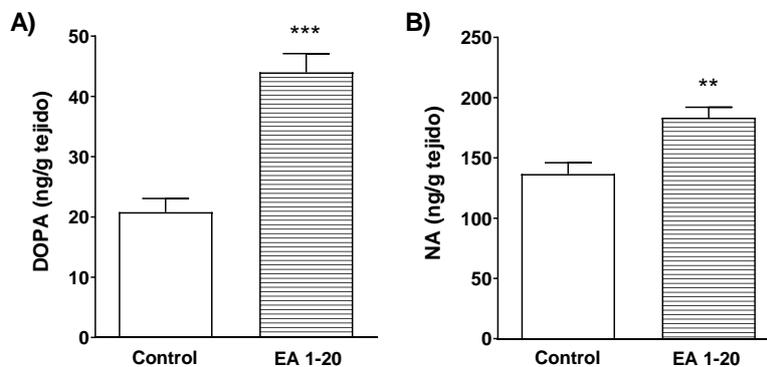


Figura 109. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (tras la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales sometidos a enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses de edad; EA 1-20, $n=5$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control (t-test de *Student*).

En el estriado (figura 110), se observó también un aumento significativo de la actividad TH tras la aplicación del programa de EA, basado en una mayor acumulación de DOPA (81%, $p=0.0002$; figura 110A). Además, se observó un aumento de la DA disponible (47%, $p<0.0001$; figura 110B) y de sus metabolitos HVA (39%, $p<0.0001$; figura 110C) y DOPAC (35%, $p=0.028$; figura 110D) en comparación al grupo control.

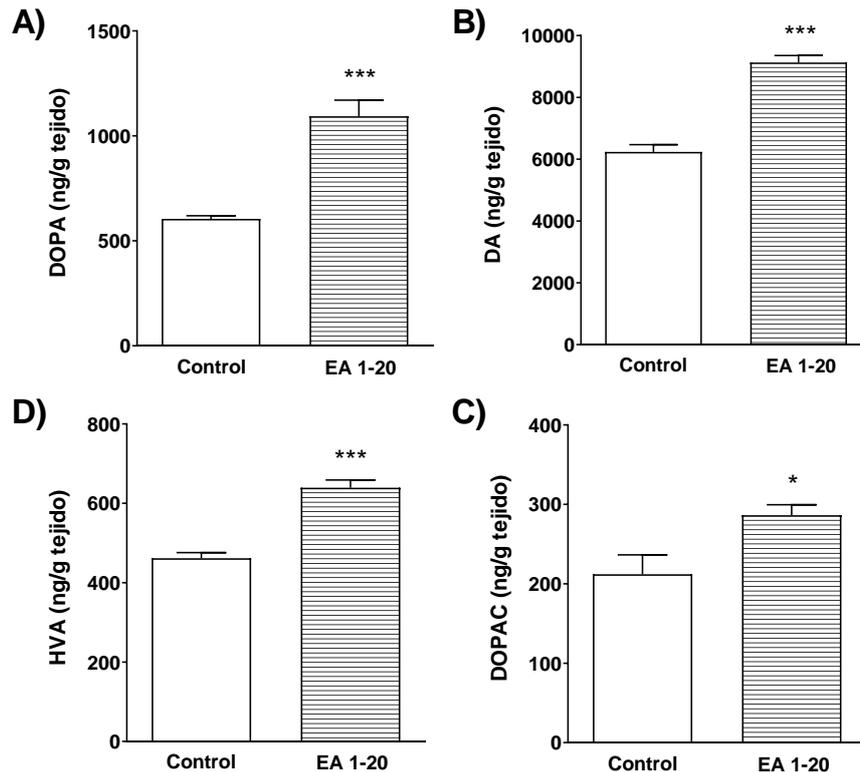


Figura 110. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A) y los niveles de DA (B), así como de sus metabolitos HVA (C) y DOPAC (D), en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses; EA 1-20, n=5) frente a los animales del grupo control (n=5). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ al comparar con el grupo control (t-test de Student).

4.6.1.2.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, en el estriado y en la glándula pineal

En el hipocampo (figura 111), se observó un aumento de la actividad de la enzima TPH-2 tras la aplicación del programa de EA a largo plazo, con una mayor acumulación de 5-HTP (52%, $p=0.0049$; figura 111A), de 5-HT disponible (22%, $p=0.0004$; figura 111B) y de los niveles del metabolito 5-HIAA (37%, $p=0.0070$; figura 111C).

En el estriado, los resultados también evidenciaron un incremento de los niveles de 5-HTP (57%, $p=0.0047$; figura 112A) y 5-HT (119%, $p < 0.0001$; figura 112B), aunque sin cambios en el metabolito 5-HIAA (figura 112C).

En la glándula pineal (figura 113), se puede apreciar un incremento de la actividad de la enzima TPH-1 en el grupo EA 1-20 en comparación al control, con aumentos significativos de los niveles de 5-HTP (149%, $p=0.0004$) y 5-HT (83%, $p=0.0173$), sin ser significativos en la cantidad del metabolito 5-HIAA.

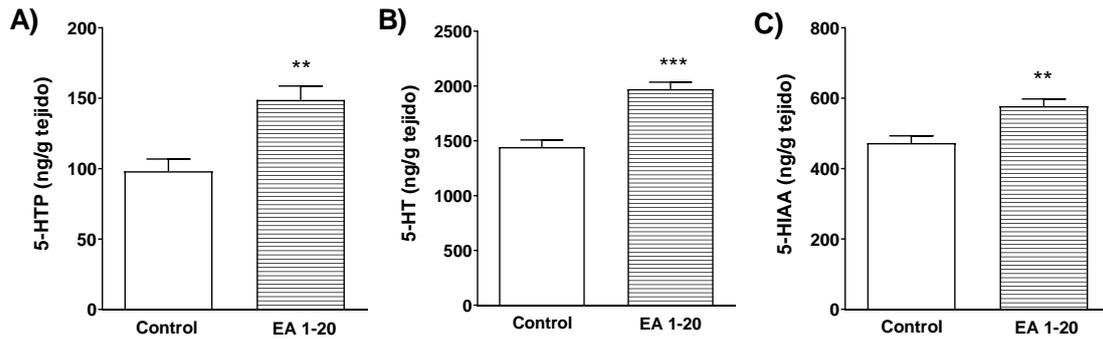


Figura 111. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (tras la inhibición de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales sometidos a enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses; EA 1-20, n=5) frente a los animales control (n=5). **p<0.01, ***p<0.001 comparando con el grupo control (t-test de *Student*).

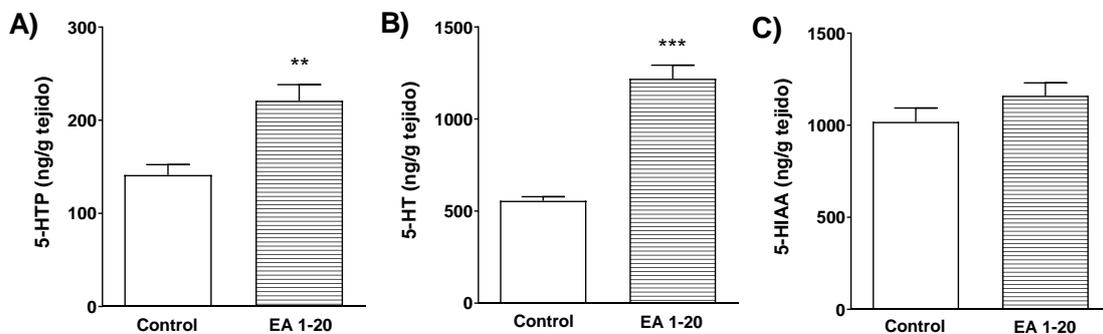


Figura 112. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de animales sometidos a enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses; EA 1-20, n=5) frente a los animales control (n=5). **p<0.01, ***p<0.001 en comparación al grupo control (t-test de *Student*).

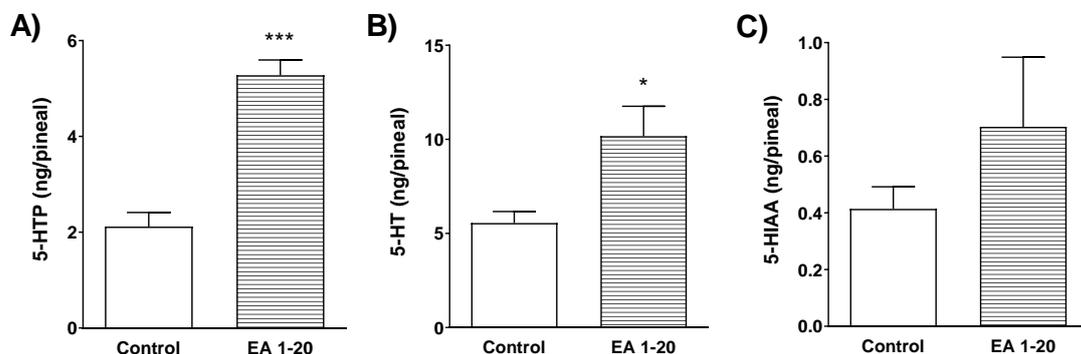


Figura 113. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas (20 meses) Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) así como del metabolito 5-HIAA (C) en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de animales sometidos a enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses; EA 1-20, n=5) frente a los animales del grupo control (n=5). *p<0.05, ***p<0.001 al comparar con el grupo control (t-test de *Student*).

4.6.1.3 Efectos del enriquecimiento ambiental temprano sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo

4.6.1.3.1 Efectos sobre la proteína SIRT1

La expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo (figura 114) se ve significativamente modificada por la edad ($F_{(2,21)}=18.83$, $p<0.0001$), pero no por el EA. Los animales jóvenes presentan los mayores niveles, los cuales se ven significativamente reducidos en los animales viejos (36%, $p<0.001$), no mostrándose un cambio en el grupo EA 1-20.

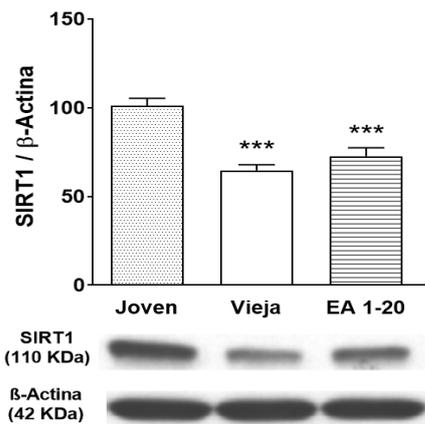


Figura 114. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde edades tempranas, EA 1-20, $n=9$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=9$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). *** $p<0.001$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo de los cambios obtenidos en SIRT1, sin cambios en la β -actina (patrón de carga).

4.6.1.3.2 Efectos sobre la proteína NF- κ B total

Los resultados obtenidos en los niveles de NF- κ B total en el hipocampo no presentan diferencias significativas tras la aplicación del enriquecimiento a largo plazo ($F_{(2,21)}=1.311$, $p=0.2908$). Con el anticuerpo utilizado en este estudio, los animales jóvenes presentan niveles de esta proteína similares a los obtenidos por los animales viejos de los grupos control y EA (figura 115).

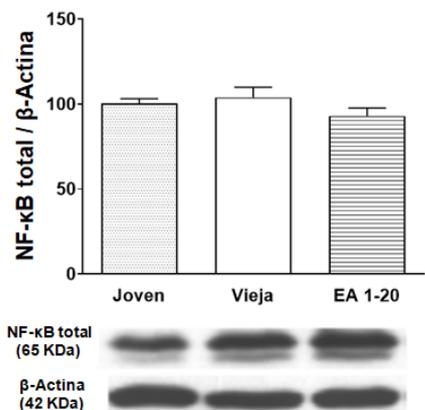


Figura 115. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína NF- κ B total (65 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde edades tempranas, EA 1-20, $n=9$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=9$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo.

4.6.1.3.3 Efectos sobre la proteína RbAp48/46

La expresión de la proteína RbAp48/46 en el hipocampo no se ve modificada por el EA (figura 116). Así, los animales viejos muestran una menor proporción significativa de RbAp48/46 (34%, $p < 0.001$), disminución que también se observa en el grupo EA 1-20 (27%, $p < 0.01$) en comparación a los animales jóvenes ($F_{(2,21)} = 11.57$, $p = 0.0004$).

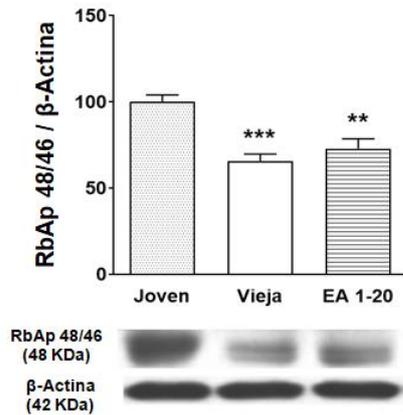


Figura 116. Efecto del enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde edades tempranas, EA 1-20, $n=9$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=9$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de Bonferroni). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la gráfica.

4.6.2 Efectos del programa de enriquecimiento ambiental aplicado desde 7 meses de edad hasta los 20 meses de vida (enriquecimiento ambiental intermedio)

El programa de EA aplicado en animales desde los 7 meses de edad hasta alcanzar los 20 meses (EA 7-20) produce cambios significativos tanto a nivel comportamental como a nivel neuroquímico, sin que se modifique el peso corporal en comparación al grupo control. Así, el peso (figura 117) está condicionado por la edad de los animales ($F_{(13,301)} = 10.6$, $p < 0.0001$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,301)} = 2.43$, $p = 0.1204$) ni la interacción de ambos factores ($F_{(13,301)} = 0.260$, $p = 0.9959$).

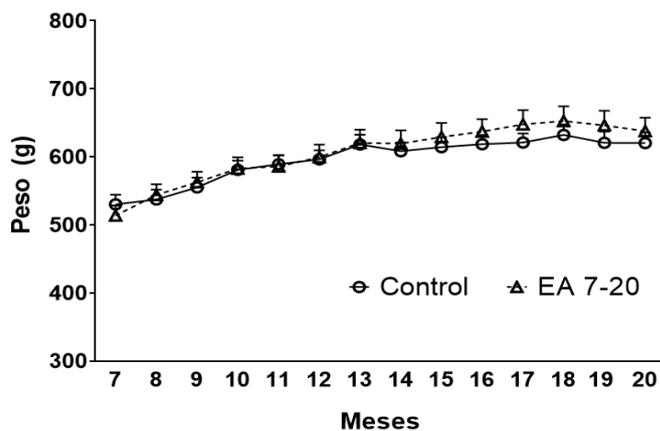


Figura 117. Efecto del enriquecimiento ambiental aplicado a edades adultas sobre el peso corporal. Los puntos representan el promedio \pm error estándar del peso (g) de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad hasta los 20 meses (EA 7-20, $n=12$) frente al grupo control ($n=12$). No se detectan diferencias significativas mediante ANOVA de dos factores seguido por el test de Bonferroni.

4.6.2.1 Efectos conductuales del programa de enriquecimiento ambiental intermedio

4.6.2.1.1 Memoria de trabajo espacial y aprendizaje visoespacial

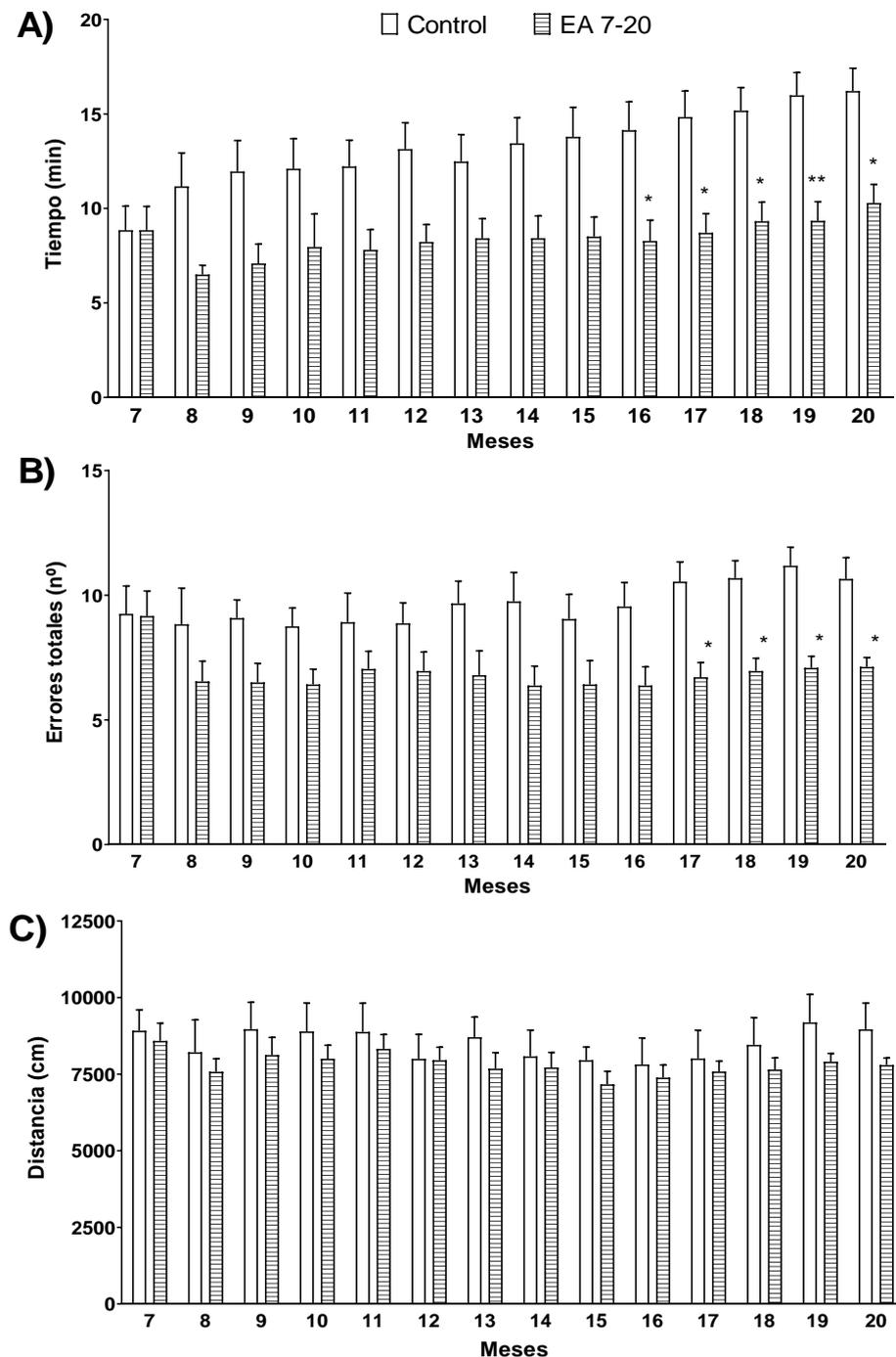


Figura 118. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A), los errores cometidos (B) y la distancia recorrida (C) de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad hasta los 20 meses (EA 7-20, n=12) frente a los animales del grupo control (n=12). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ al comparar con el grupo control (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

En el test del laberinto radial (figura 118), los datos muestran cómo la aplicación del EA desde edades adultas mejora la ejecución del test en comparación al grupo control. El tiempo requerido para completar la prueba (figura 118A) se ve significativamente influido por el tratamiento ($F_{(1,301)}=101$, $p<0.0001$) y la duración ($F_{(13,301)}=2.20$, $p=0.0098$), pero no por su interacción ($F_{(13,301)}=0.793$, $p=0.6677$). De esta forma, el EA disminuyó el tiempo necesario para finalizar la prueba ya desde los 16 meses de edad (42%, $p<0.05$) hasta el final del tratamiento (37%, $p<0.05$) en comparación al grupo control. Los errores cometidos durante el desarrollo de la prueba (figura 118B) están condicionados por el tratamiento ($F_{(1,301)}=70.4$, $p<0.0001$), pero no por la duración ($F_{(13,301)}=0.847$, $p=0.6098$) ni su interacción ($F_{(13,301)}=0.733$, $p=0.7297$). Así, los animales sometidos a EA cometen menos errores de forma significativa desde los 17 meses (36%, $p<0.05$) hasta el final del tratamiento (33%, $p<0.05$) en comparación al grupo control. Finalmente, la distancia recorrida (figura 118C) está condicionada por el tratamiento ($F_{(1,301)}=7.24$, $p=0.0075$), pero no por la duración ($F_{(13,301)}=0.664$, $p=0.7976$) ni su interacción ($F_{(13,301)}=0.135$, $p=0.999$); el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre los dos grupos de animales.

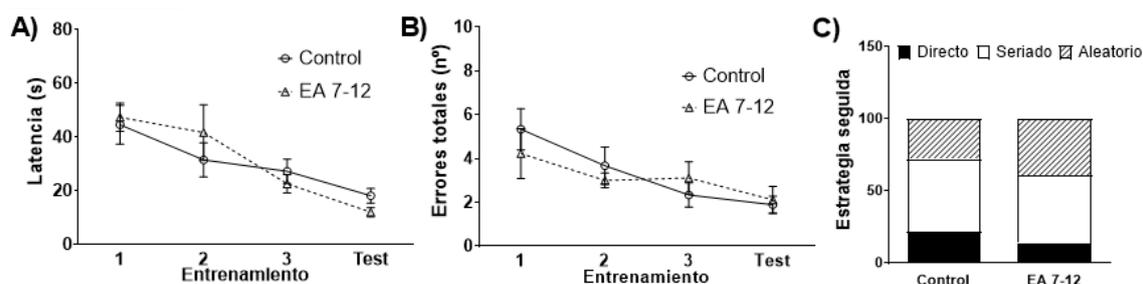


Figura 119. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de *Barnes* a los 12 meses de edad. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo de las pruebas de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 meses hasta los 12 meses (EA 7-12, $n=9$) frente a los animales del grupo control ($n=9$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

Para analizar el aprendizaje visoespacial, el test del laberinto de *Barnes* se realizó a los 12 y 19 meses de edad. A los 12 meses, la latencia (figura 119A) estuvo condicionada por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=10.8$, $p<0.0001$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.0183$, $p=0.8929$) ni por la interacción ($F_{(3,64)}=0.840$, $p=0.4772$). En cuanto a los errores cometidos (figura 119B), se vieron afectados por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=5.07$, $p=0.0033$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.138$, $p=0.7118$) ni su interacción ($F_{(3,64)}=0.662$, $p=0.5782$). La comparación individual mediante el test de *Bonferroni* en la latencia y errores no detectó diferencias significativas entre grupos de animales. La principal estrategia seguida para localizar el *target* en ambos grupos fue la estrategia seriada (figura 119C).

A los 19 meses, la latencia (figura 120A) estuvo influenciada por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=13.1$, $p<0.0001$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.860$, $p=0.3575$) ni su interacción ($F_{(3,64)}=0.987$, $p=0.4052$). Además, los errores (figura 120B) se vieron afectados por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=3.85$, $p=0.0134$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.420$, $p=0.5194$) ni su interacción ($F_{(3,64)}=0.420$, $p=0.7394$). La comparación individual mediante el test de *Bonferroni* en la latencia y errores no detectó diferencias significativas. En cuanto a la estrategia seguida para la localización del *target*, no se observaron mejoras debido al EA.

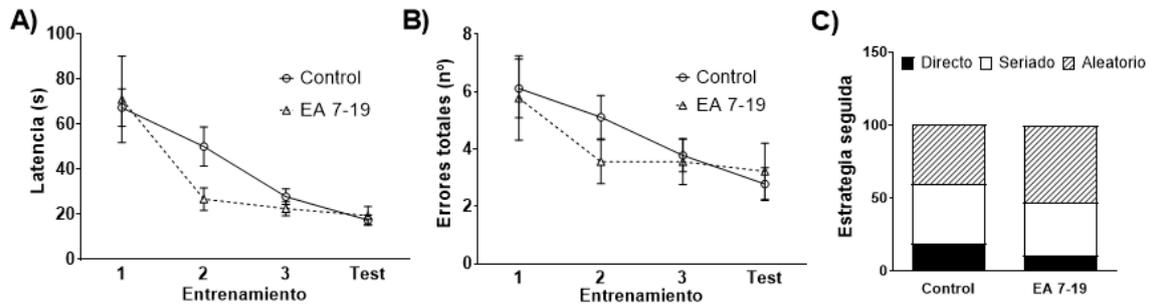


Figura 120. Efecto del enriquecimiento ambiental desde los 7 meses de edad sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de Barnes a los 19 meses de edad. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo de las pruebas de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 meses hasta los 19 meses (EA 7-19, $n=9$) frente a los animales del grupo control ($n=9$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.6.2.1.2 Memoria episódica

En la fase de familiarización (figura 121A), los animales de los diferentes grupos no presentaron una preferencia por ninguno de los dos objetos situados en el campo abierto. No obstante, al final del estudio el tiempo de exploración promedio de los objetos en los animales del grupo EA 7-20 es un 37% superior al grupo control.

En la fase de test (figura 121B), ANOVA de tres factores indicó que los resultados se ven condicionados por el objeto ($F_{(1,590)}=303.452$, $p<0.0001$), por el tratamiento ($F_{(1,590)}=24.694$, $p<0.0001$) y por la duración del tratamiento ($F_{(13,590)}=3.855$, $p<0.0001$). Asimismo, se detectaron diferencias en la interacción de los parámetros tratamiento x objeto ($F_{(1,590)}=21.985$, $p<0.0001$). Los cambios observados son debidos a que los animales sometidos a enriquecimiento tienden a explorar más el objeto nuevo que el familiar a lo largo de toda su vida. De esta forma, mientras que en los animales del grupo control el test de *Fisher PLSD* no detectó diferencias significativas entre el objeto nuevo y el objeto familiar a partir de los 11 meses de edad, en los animales del grupo EA 7-20 encontró diferencias significativas hasta los 20 meses (momento en que el grupo EA 7-20 explora un 47% más el objeto nuevo y un 18% menos el objeto familiar que el grupo control).

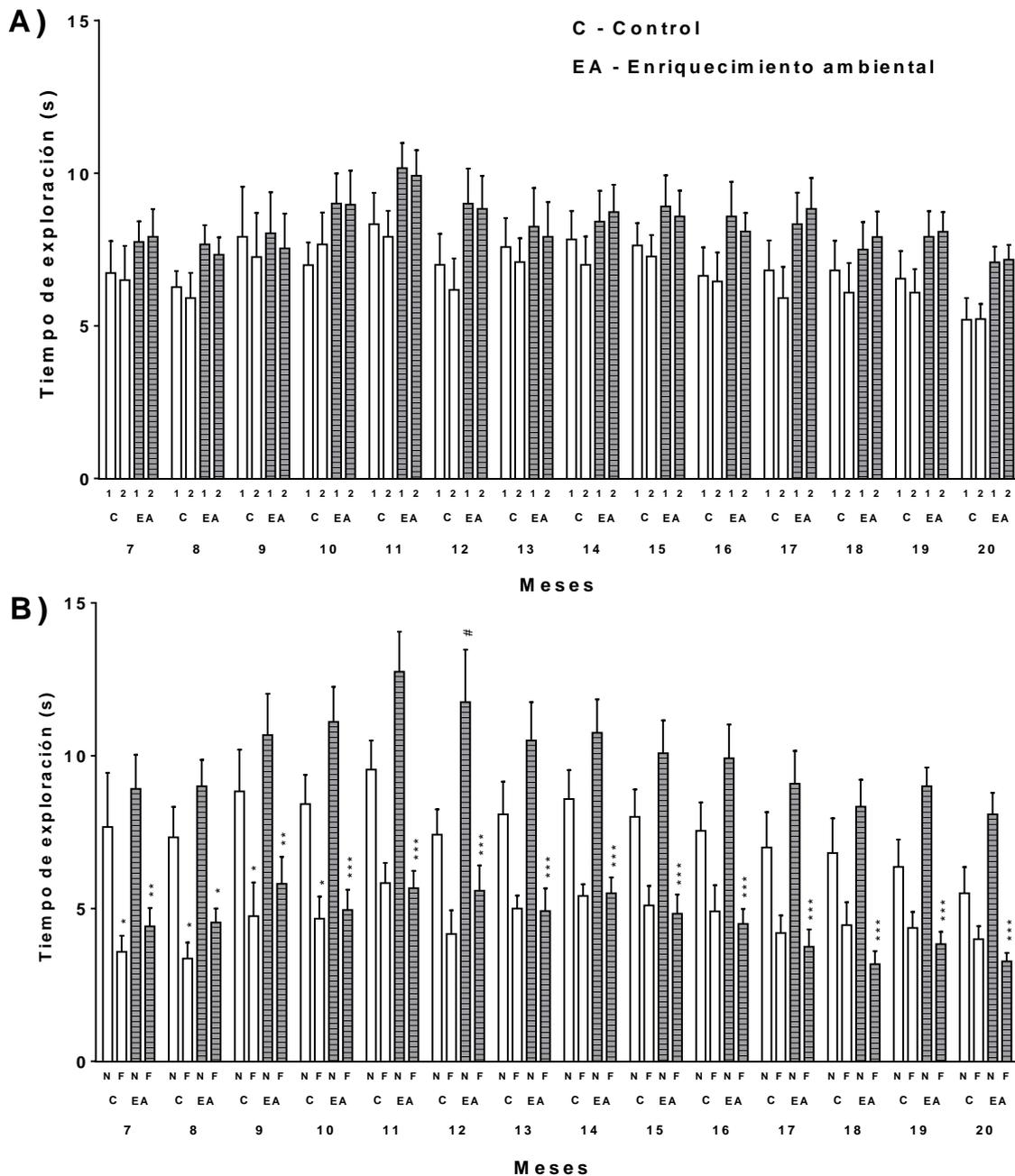


Figura 121. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (B: N, objeto nuevo; F, objeto familiar) de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 meses hasta los 20 meses de edad (EA 7-20, $n=12$) frente a los animales del grupo control (C, $n=12$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ comparando el tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el objeto familiar; # $p<0.05$ al comparar con el grupo control (ANOVA de tres factores, seguido por el test de *Fisher PLSD*).

En relación a lo comentado anteriormente, la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar (figura 122) está condicionada por el tratamiento ($F_{(1,301)}=39.8$, $p<0.0001$), aunque no por la duración ($F_{(13,301)}=0.753$, $p=0.7097$) ni su interacción

($F_{(13,301)}=0.597$, $p=0.8565$). Aunque con el enriquecimiento se produce un incremento de la diferencia del tiempo de exploración del objeto nuevo menos el objeto el familiar, el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas.

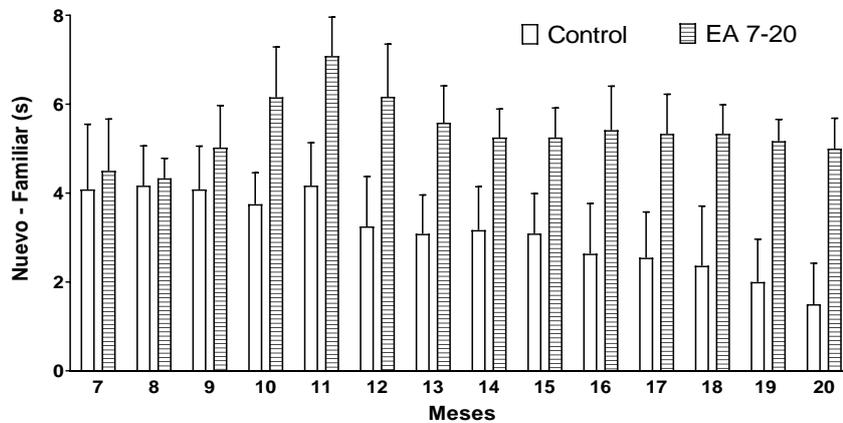


Figura 122. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar en la fase de test de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental intermedio (7-20 meses de edad; EA 7-20, $n=12$) frente a los animales del grupo control ($n=12$). ANOVA de dos factores seguido por el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre ambos grupos.

4.6.2.1.3 Coordinación motora

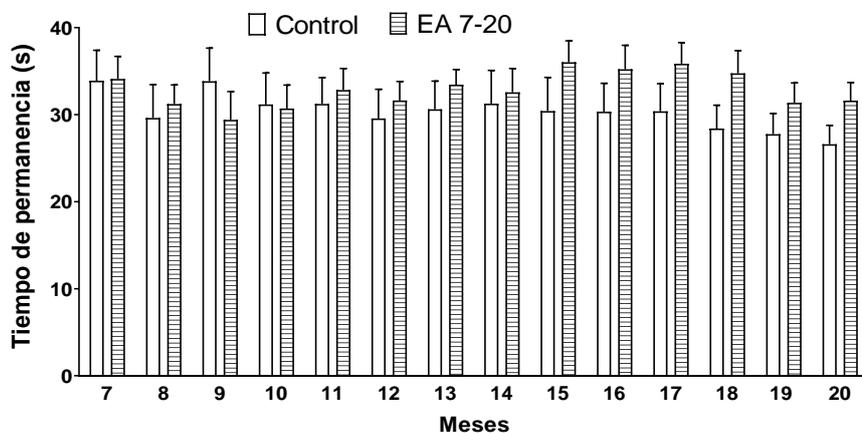


Figura 123. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad frente a los animales del grupo control sobre la coordinación motora mediante el test del rotarod. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo que permanecen en la rueda giratoria antes de caer de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 hasta 20 meses de edad (EA 7-20, $n=12$) frente a los animales del grupo control ($n=12$). ANOVA de dos factores seguido por el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre ambos grupos.

Al analizar la coordinación motora (figura 123), el tiempo que los animales permanecen sobre la rueda giratoria antes de caer está condicionado por el tratamiento ($F_{(1,301)}=5.28$, $p=0.0222$), pero no por la duración ($F_{(13,301)}=0.461$, $p=0.9444$) ni la interacción de ambos

factores ($F_{(13,301)}=0.502$, $p=0.9229$). El test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas. Cabe indicar que a nivel cualitativo los animales sometidos a enriquecimiento presentaban un comportamiento motor diferente y más complejo, siendo capaces de girar sobre la rueda giratoria y permanecer sobre ella corriendo hacia atrás, o tomar impulso para saltar de la rueda giratoria, tal y como también se ha descrito en el grupo de animales sometidos a EA desde 1 mes de vida.

4.6.2.2 Efectos del enriquecimiento ambiental intermedio sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales *in vivo*

4.6.2.2.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

En el hipocampo (figura 124), el programa de EA aplicado a partir de los 7 meses incrementó la actividad de la enzima TH, con una mayor acumulación de DOPA (67%, $p=0.0055$; figura 124A) y de la cantidad de NA disponible (24%, $p<0.0298$; figura 124B) en comparación a los animales del grupo control.

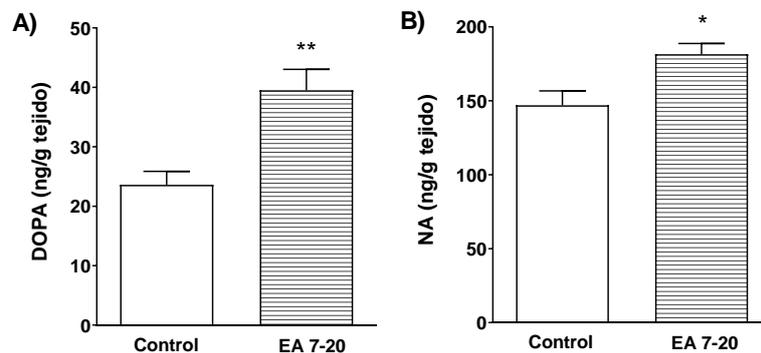


Figura 124. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (tras la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde los 7 hasta los 20 meses de edad (EA 7-20, $n=5$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ comparando con el grupo control (t-test de *Student*).

En el estriado, la aplicación del EA (figura 125) también produjo una mayor actividad de TH, con un aumento de DOPA (27%, $p=0.0064$; figura 125A) en comparación a los animales del grupo control. Además, aumentó la cantidad de DA disponible (36%, $p<0.0001$; figura 125B) y de sus metabolitos HVA (37%, $p=0.0115$; figura 125C) y DOPAC (32%, $p=0.0237$; figura 125D).

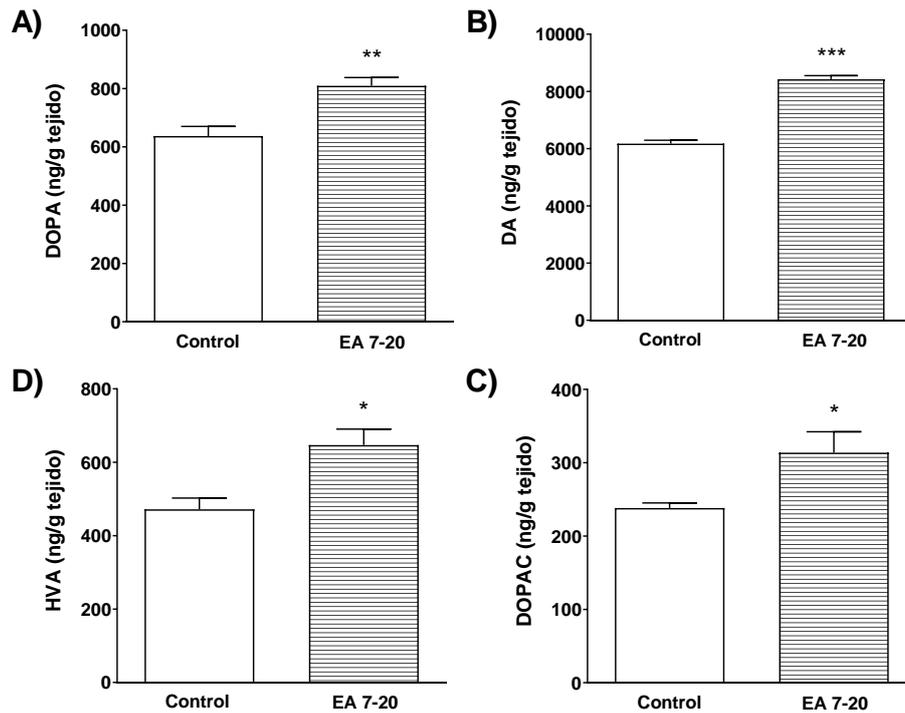


Figura 125. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A) y los niveles de DA (B), así como de sus metabolitos HVA (C) y DOPAC (D), en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental (desde 7 hasta 20 meses de edad) (EA 7-20, n=5) frente a los animales del grupo control (n=5). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparación al grupo control (t-test de *Student*).

4.6.2.2.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, en el estriado y en la glándula pineal

En el hipocampo, el EA aplicado desde los 7 meses aumentó la actividad de la enzima TPH-2 (figura 126), observándose un incremento de la acumulación de 5-HTP (41%, $p = 0.0031$; figura 126A), del contenido de 5-HT (26%, $p = 0.0004$; figura 126B) y del metabolito 5-HIAA (16%, $p < 0.033$; figura 126C) frente al control.

En el estriado, los animales sometidos a EA también mostraron una mayor acumulación de 5-HTP (43%, $p = 0.0010$; figura 127A) en comparación al grupo control, acompañado por un aumento significativo de 5-HT (96%, $p < 0.0001$; figura 127B), sin observarse cambios en 5-HIAA (figura 127C).

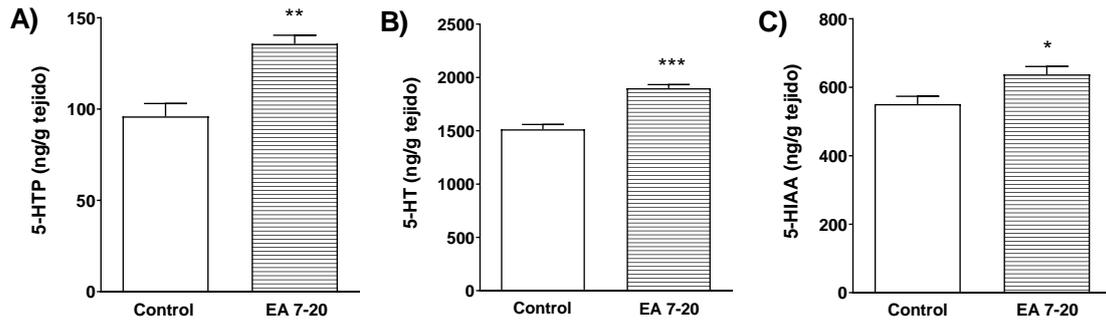


Figura 126. Efecto del enriquecimiento ambiental desde los 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (tras la inhibición de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 meses hasta los 20 meses de edad (EA 7-20, n=5) frente al grupo control (n=5). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar con el grupo control (t-test de *Student*).

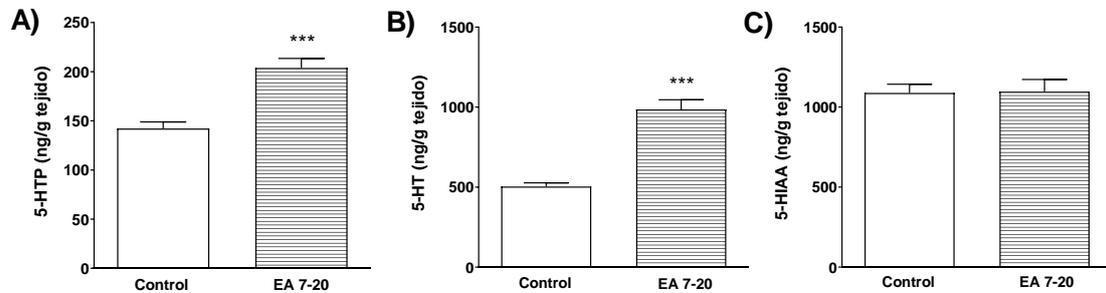


Figura 127. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 hasta los 20 meses de edad (EA 7-20, n=5) frente a los animales del grupo control (n=5). *** $p < 0.001$ en comparación al grupo control (t-test de *Student*).

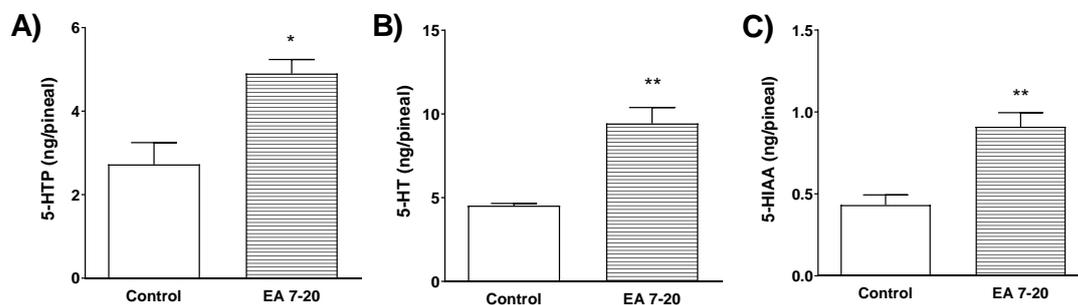


Figura 128. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B), así como del metabolito 5-HIAA (C), en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 meses hasta los 20 meses de edad (EA 7-20, n=4) frente a los animales del grupo control (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparando con el grupo control (t-test de *Student*).

En la glándula pineal (figura 128), se pudo apreciar un aumento de la actividad de TPH-1 en el grupo EA 7-20. De esta forma, se incrementó la acumulación de 5-HTP (80%, $p=0.0238$; figura 128A), así como los niveles de 5-HT (108%, $p=0.0018$; figura 128B) y del metabolito 5-HIAA (110%, $p=0.0055$; figura 128C).

4.6.2.3 Efectos del enriquecimiento ambiental intermedio sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo

4.6.2.3.1 Efectos sobre la proteína SIRT1

La expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo (figura 129) se ve significativamente modificada por la edad ($F_{(2,19)}=23.33$, $p<0.0001$), pero no por el EA. Los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles de esta proteína, mientras que en los animales viejos se produce una reducción significativa (32%, $p<0.001$), disminución que no es revertida en el grupo EA 7-20 (32%, $p<0.001$ respecto a los jóvenes).

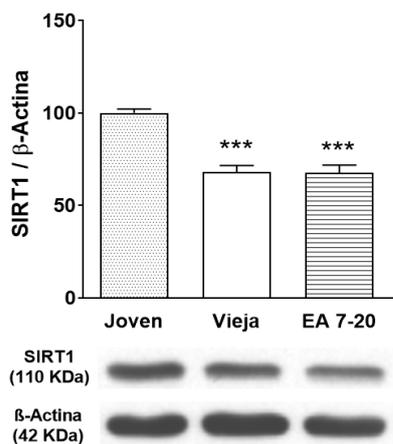


Figura 129. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 meses, EA 7-20, $n=8$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=8$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). *** $p<0.001$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo de los cambios obtenidos en SIRT1, sin cambios en la β -actina (patrón de carga).

4.6.2.3.2 Efectos sobre la proteína NF- κ B total

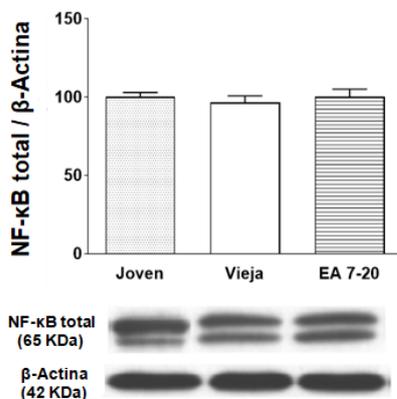


Figura 130. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la expresión de la proteína NF- κ B total (65 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 meses, EA 7-20, $n=8$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=8$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la gráfica.

Los niveles de NF- κ B total en el hipocampo (figura 130) no muestran diferencias significativas tras la aplicación del programa de EA ($F_{(2,19)}=1.717$, $p=0.2063$). De este modo, con la metodología seguida en este estudio, los animales jóvenes presentan niveles de la proteína NF- κ B similares a los obtenidos tanto por los animales viejos del grupo control como por los animales sometidos a enriquecimiento.

4.6.2.3.3 Efectos sobre la proteína RbAp48/46

La expresión de la proteína RbAp48/46 en el hipocampo (figura 131) no se ve modificada por la aplicación del EA, observándose solamente el efecto descrito por la edad ($F_{(2,19)}=34.47$, $p<0.0001$). Los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles de esta proteína, mientras que los animales viejos muestran una reducción significativa de RbAp48/46 (41%, $p<0.001$), similar a la observada en el grupo EA 7-20 (38%, $p<0.001$ respecto a los jóvenes).

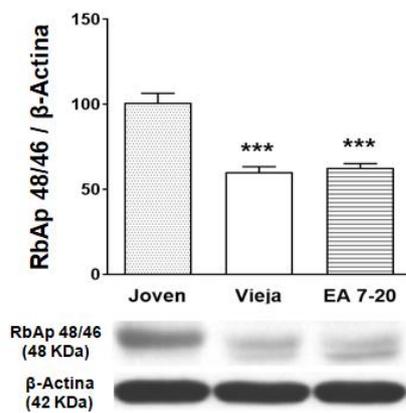


Figura 131. Efecto del enriquecimiento ambiental desde 7 meses de edad sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde 7 meses, EA 7-20, $n=8$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=8$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). *** $p<0.001$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo.

4.6.3 Efectos del enriquecimiento ambiental desde 18.5 meses de edad hasta los 20 meses de vida (enriquecimiento ambiental tardío)

En este apartado aparecen los efectos del programa de enriquecimiento ambiental iniciado en animales viejos de 18.5 meses de edad, tanto a nivel comportamental como neuroquímico.

4.6.3.1 Efectos conductuales producidos por el programa de enriquecimiento ambiental tardío

4.6.3.1.1 Memoria de trabajo espacial y aprendizaje visoespacial

En el test del laberinto radial (memoria de trabajo espacial) (figura 132), la aplicación del EA en animales viejos (EA 18.5-20) no mejora la ejecución del test en comparación al control. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos en el tiempo requerido para realizar el test (figura 132A), en los errores (figura 132B) ni en la distancia recorrida (figura 132C).

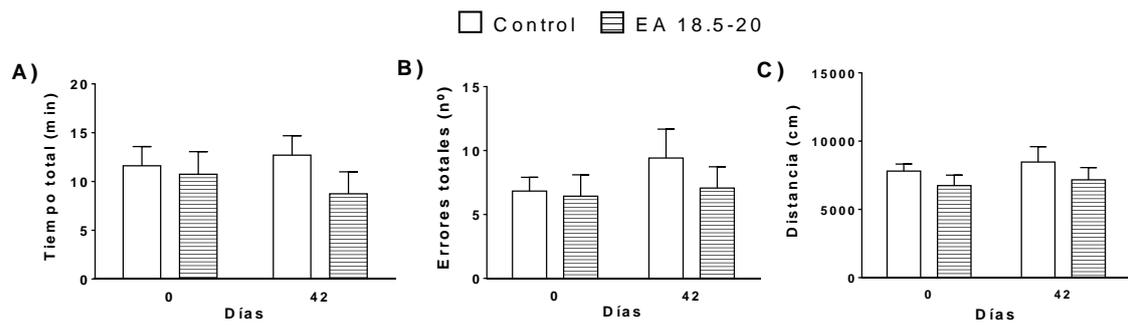


Figura 132. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A), los errores cometidos (B) y la distancia recorrida (C) de los animales viejos sometidos a enriquecimiento ambiental (desde los 18.5 a los 20 meses de edad, EA 18.5-20, $n=7$) frente a los animales del grupo control (20 meses, $n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (t-test de *Student*).

En el aprendizaje visoespacial (analizado mediante el test del laberinto de *Barnes* al finalizar el programa de EA), la latencia (figura 133A) está afectada por el entrenamiento ($F_{(3,44)}=6.44$, $p=0.0010$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,44)}=0.245$, $p=0.6228$) ni por la interacción de ambos factores ($F_{(3,44)}=0.359$, $p=0.7832$). De igual manera, los errores cometidos (figura 133B) están condicionados por el entrenamiento ($F_{(3,44)}=4.05$, $p=0.0126$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,44)}=0.234$, $p=0.6306$) ni su interacción ($F_{(3,44)}=0.0805$, $p=0.9702$). El test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre los dos grupos experimentales. Además, en la estrategia seguida no se observaron cambios destacables entre los dos grupos (figura 133C).

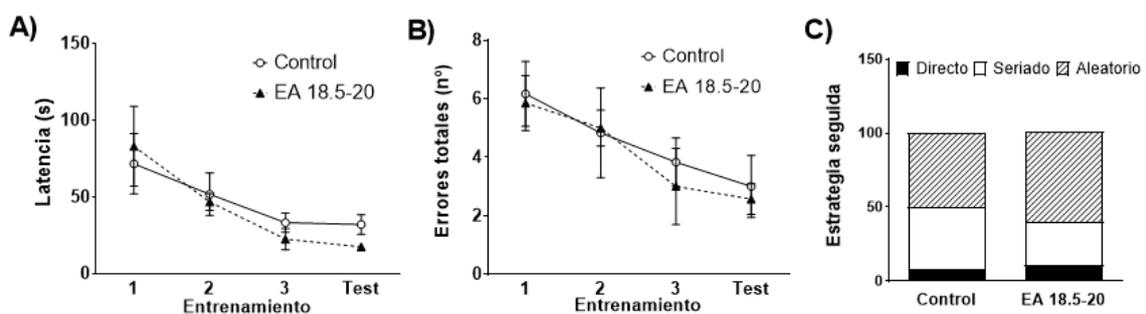


Figura 133. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de *Barnes*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo del test de *Barnes* de los animales viejos sometidos a enriquecimiento ambiental desde los 18.5 meses hasta los 20 meses de edad (EA 18.5-20, $n=7$) frente a los animales del grupo control (20 meses, $n=6$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.6.3.1.2 Memoria episódica

Los animales de los dos grupos no presentan una preferencia por ninguno de los dos objetos situados en el campo abierto en la fase de familiarización (figura 134A). En la fase de test (figura 134B) tampoco se detectaron diferencias significativas en la exploración de los objetos entre los dos grupos de animales. En relación a estos resultados, no se detectaron cambios significativos en la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar (figura 134C).

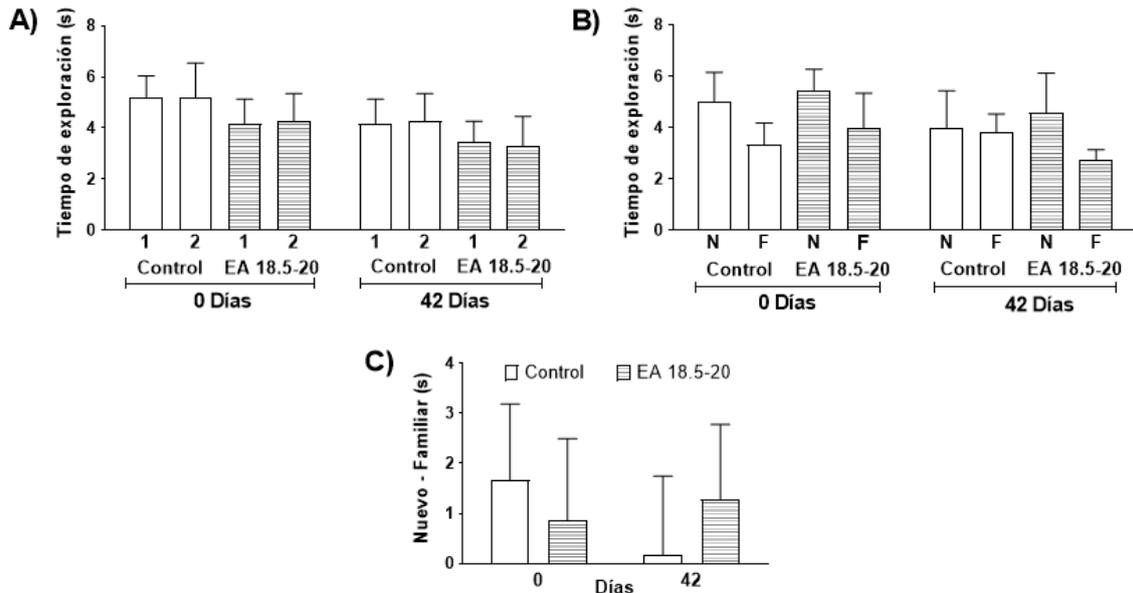


Figura 134. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (B: N, objeto nuevo; F, objeto familiar), así como la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar en la fase de test (C), de los animales viejos sometidos a enriquecimiento ambiental desde los 18.5 a los 20 meses de edad (EA 18.5-20, $n=7$) frente a los animales del grupo control (20 meses, $n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (A, B: ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*; C: t-test de *Student*).

4.6.3.1.3 Coordinación motora

La coordinación motora no se ve modificada tras la aplicación del EA en animales viejos (figura 135).

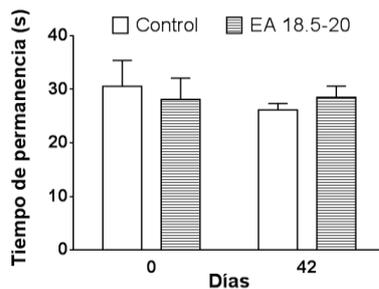


Figura 135. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la coordinación motora mediante el test del rotarod. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo que permanecen en la rueda giratoria antes de caer de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental a partir de los 18.5 meses hasta los 20 meses (EA 18.5-20, $n=7$) frente a los controles (20 meses, $n=6$). No se detectan diferencias significativas entre grupos (t-test de *Student*).

4.6.3.2 Efectos del enriquecimiento ambiental tardío sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales *in vivo*

4.6.3.2.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

En el hipocampo, la actividad de la enzima TH (figura 136) tras el EA se incrementó ligeramente en comparación al grupo control, asociado a una mayor acumulación de DOPA (22%, $p < 0.0426$; figura 136A), aunque sin cambios en la cantidad de NA ($p = 0.7895$; figura 136B).

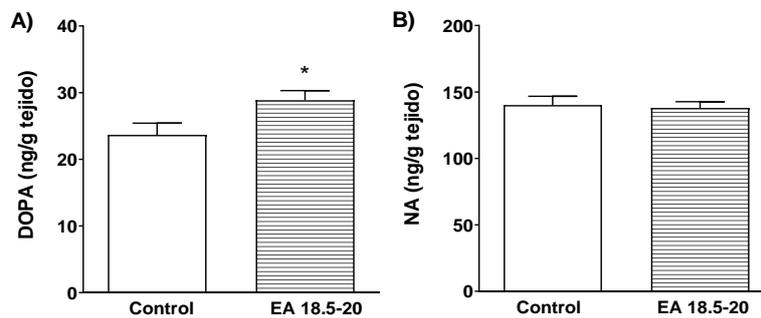


Figura 136. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A) (tras la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales viejos sometidos a enriquecimiento ambiental de los 18.5 hasta los 20 meses de edad (EA 18.5-20, $n = 7$) frente a los animales del grupo control (20 meses, $n = 6$). * $p < 0.05$ al comparar con el grupo control (t-test de Student).

En el estriado no se pudo observar una variación significativa de la actividad de la TH ($p = 0.1196$; figura 137A), aunque en el grupo EA 18.5-20 se observó un ligero aumento de los niveles de DA (10%, $p = 0.052$; figura 137B) frente al grupo control, sin modificaciones significativas en los metabolitos HVA ($p = 0.8083$; figura 137C) y DOPAC ($p = 0.3435$; figura 137D).

4.6.3.2.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, en el estriado y en la glándula pineal

En el hipocampo (figura 138), el EA aplicado en animales viejos incrementó la actividad de la enzima TPH-2, asociado a una mayor acumulación de 5-HTP (13%, $p = 0.0378$; figura 138A), aunque sin modificaciones en la cantidad de 5-HT ($p = 0.0868$; figura 138B) ni en el metabolito 5-HIAA ($p = 0.7638$; figura 138C).

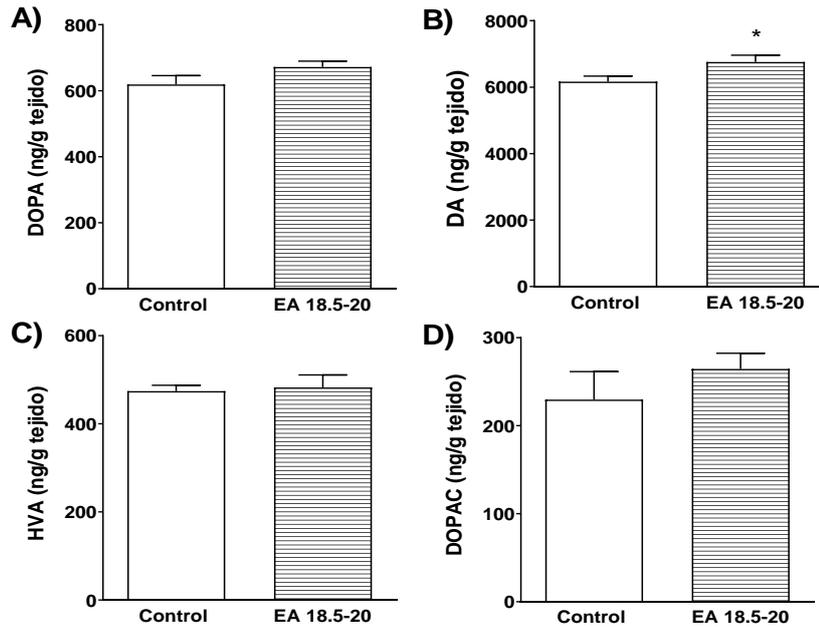


Figura 137. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la actividad de la enzima TH en el estriado. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (después de la inhibición de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y los niveles de DA (B), así como de sus metabolitos HVA (C) y DOPAC (D), en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales sometidos a enriquecimiento ambiental (EA 18.5-20, desde los 18.5 a los 20 meses de edad, n=7) frente a los animales del grupo control (20 meses, n=6). * $p \leq 0.05$ al comparar con el grupo control (t-test de *Student*).

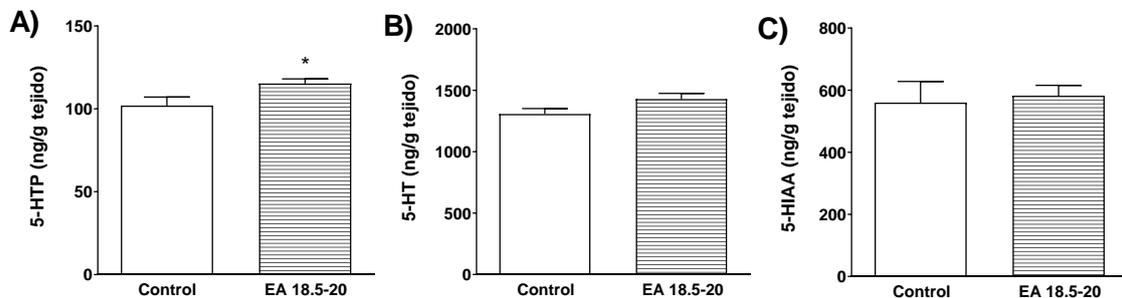


Figura 138. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (tras la inhibición de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de animales sometidos a enriquecimiento ambiental (desde los 18.5 a los 20 meses de edad, EA 18.5-20, n=7) frente a los animales del grupo control (20 meses, n=6). * $p < 0.05$ comparando los resultados obtenidos por el grupo EA 18.5-20 y el grupo control (t-test de *Student*).

En el estriado, los resultados no evidenciaron una modificación significativa de la actividad de TPH-2 entre los dos grupos, sin cambios en los niveles de 5-HTP ($p=0.1704$; figura 139A), ni en 5-HT ($p=0.2712$; figura 139B) y 5-HIAA ($p=0.5663$; figura 139C).

En la glándula pineal (figura 140), no se aprecian cambios significativos en la actividad de TPH-1 entre el grupo EA 18.5-20 y el control, no detectándose cambios en los niveles de 5-HTP

($p=0.4446$; figura 140A), de 5-HT ($p=0.1790$; figura 140B) o del metabolito 5-HIAA ($p=0.3860$; figura 140C).

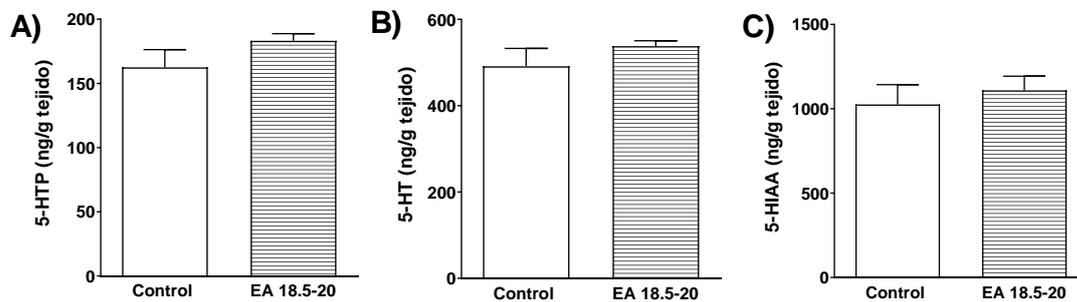


Figura 139. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde los 18.5 a los 20 meses de edad (EA 18.5-20, $n=7$) frente a los animales del grupo control (20 meses, $n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (t-test de *Student*).

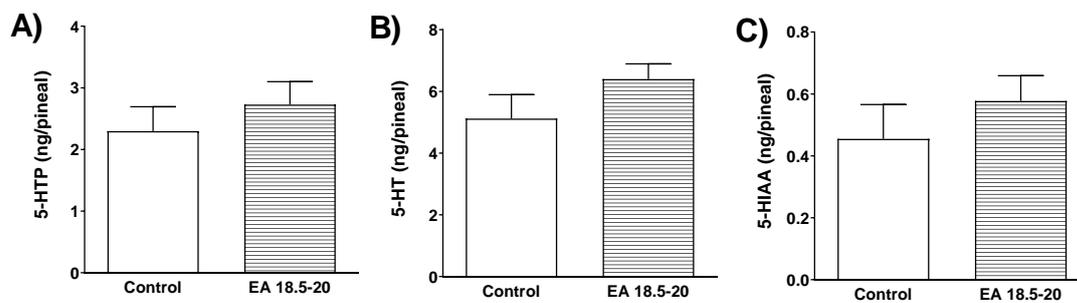


Figura 140 Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de los animales viejos sometidos a enriquecimiento ambiental (de 18.5 a 20 meses de edad, EA 18.5-20, $n=7$) frente a los animales del grupo control (20 meses, $n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (t-test de *Student*).

4.6.3.3 Efectos del enriquecimiento ambiental tardío sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo

4.6.3.3.1 Efectos sobre la proteína SIRT1

La expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo (figura 141) solamente se encuentra significativamente modificada por la edad ($F_{(2,17)}=52.98$, $p<0.0001$). Los animales jóvenes presentan los mayores niveles, mientras que dichos valores están significativamente reducidos en los animales viejos (grupo control: 34%, $p<0.001$; grupo EA 18.5-20: 30%, $p<0.001$).

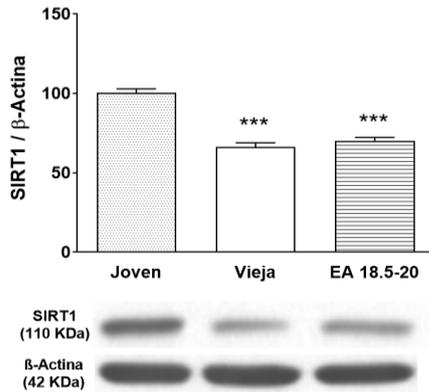


Figura 141. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en hipocampo. Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde los 18.5 meses, EA 18.5-20, n=7; animales viejos del grupo control, Vieja, n=7) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes (n=6). ***p<0.001 comparando los valores de los diferentes grupos respecto a los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo de los cambios obtenidos en SIRT1, sin cambios en la β -actina (patrón de carga).

4.6.3.3.2 Efectos sobre la proteína NF- κ B total

Los niveles de NF- κ B total en hipocampo (figura 142) no muestran diferencias significativas ($F_{(2,17)}=1.353$, p=0.2849). De este modo, con el anticuerpo utilizado en este estudio, los jóvenes presentan niveles de esta proteína similares a los obtenidos por los animales viejos (tanto controles como del grupo EA 18.5-20).

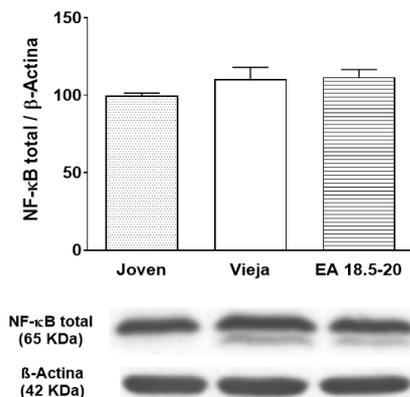


Figura 142. Efecto del enriquecimiento ambiental en animales viejos sobre la expresión de la proteína NF- κ B total (65 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a enriquecimiento ambiental desde los 18.5 meses, EA 18.5-20, n=7; animales viejos del grupo control, Vieja, n=7) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes (n=6). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la gráfica.

4.7 Efectos del enriquecimiento ambiental y una dieta rica en antioxidantes desde los 14 meses de edad hasta los 20 meses de vida sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el cerebro de ratas viejas

En este apartado se muestran los efectos de la administración de una dieta rica en antioxidantes (Dieta; desde los 14 meses de edad de los animales hasta alcanzar los 20 meses), así como de la aplicación conjunta de dicha dieta (desde los 14 hasta los 20 meses de edad) junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (desde 1 mes de edad hasta

alcanzar los 20 meses) (Dieta + EA), sobre el proceso de envejecimiento tanto a nivel comportamental como a nivel neuroquímico.

Al analizar el peso corporal de los animales (figura 143) de los tres grupos, la respuesta se ve condicionada por el tratamiento ($F_{(2,154)}=15.7$, $p<0.0001$) y por la edad de los animales ($F_{(6,154)}=2.15$, $p=0.0506$), pero no por la interacción de ambos factores ($F_{(12,154)}=0.212$, $p=0.9978$). Sin embargo, el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas.

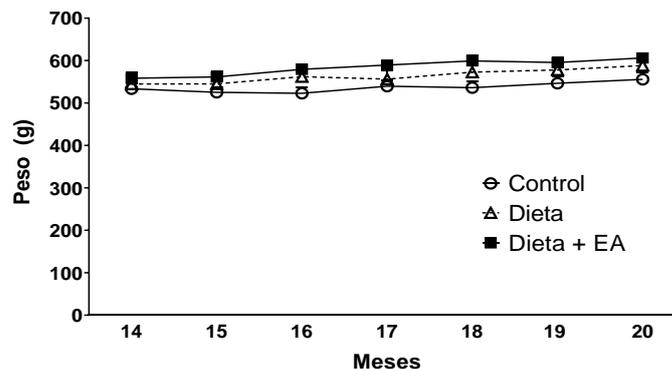


Figura 143. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre el peso corporal. Los puntos representan el promedio \pm error estándar del peso (g) de los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (Dieta, $n=6$, desde los 14 a los 20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (desde 1 mes de edad hasta los 20 meses) (Dieta + EA, $n=7$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). El test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre grupos.

4.7.1 Efectos conductuales producidos por una dieta rica en antioxidantes y el enriquecimiento ambiental

4.7.1.1 Memoria de trabajo espacial y aprendizaje visoespacial

Los resultados del laberinto radial (figura 144) muestran cómo la dieta rica en antioxidantes, así como la acción conjunta de dicha dieta y del EA desde edades tempranas, mejoran la ejecución del test en comparación al grupo control. El tiempo requerido para completar la prueba (figura 144A) se ve influenciado por el tratamiento ($F_{(2,154)}=40.9$, $p<0.0001$, pero no está condicionado por la duración ($F_{(6,154)}=0.613$, $p=0.7197$) ni por su interacción ($F_{(12,154)}=0.733$, $p=0.7174$). De esta forma, al final del tratamiento el grupo Dieta redujo significativamente el tiempo necesario para completar la prueba (42%, $p<0.05$) en comparación al grupo control, de la misma forma que el grupo Dieta + EA (47%, $p<0.01$). En cuanto a los errores cometidos (figura 144B), están condicionados por el tratamiento ($F_{(2,154)}=69.8$, $p<0.0001$) y la duración ($F_{(6,154)}=2.60$, $p=0.0198$), pero no por su interacción ($F_{(12,154)}=1.04$, $p=0.417$). Así, a los 20 meses los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes cometen menos errores (34%, $p<0.05$) en comparación al grupo control, de la misma forma que los animales del grupo Dieta + EA (73%, $p<0.001$).

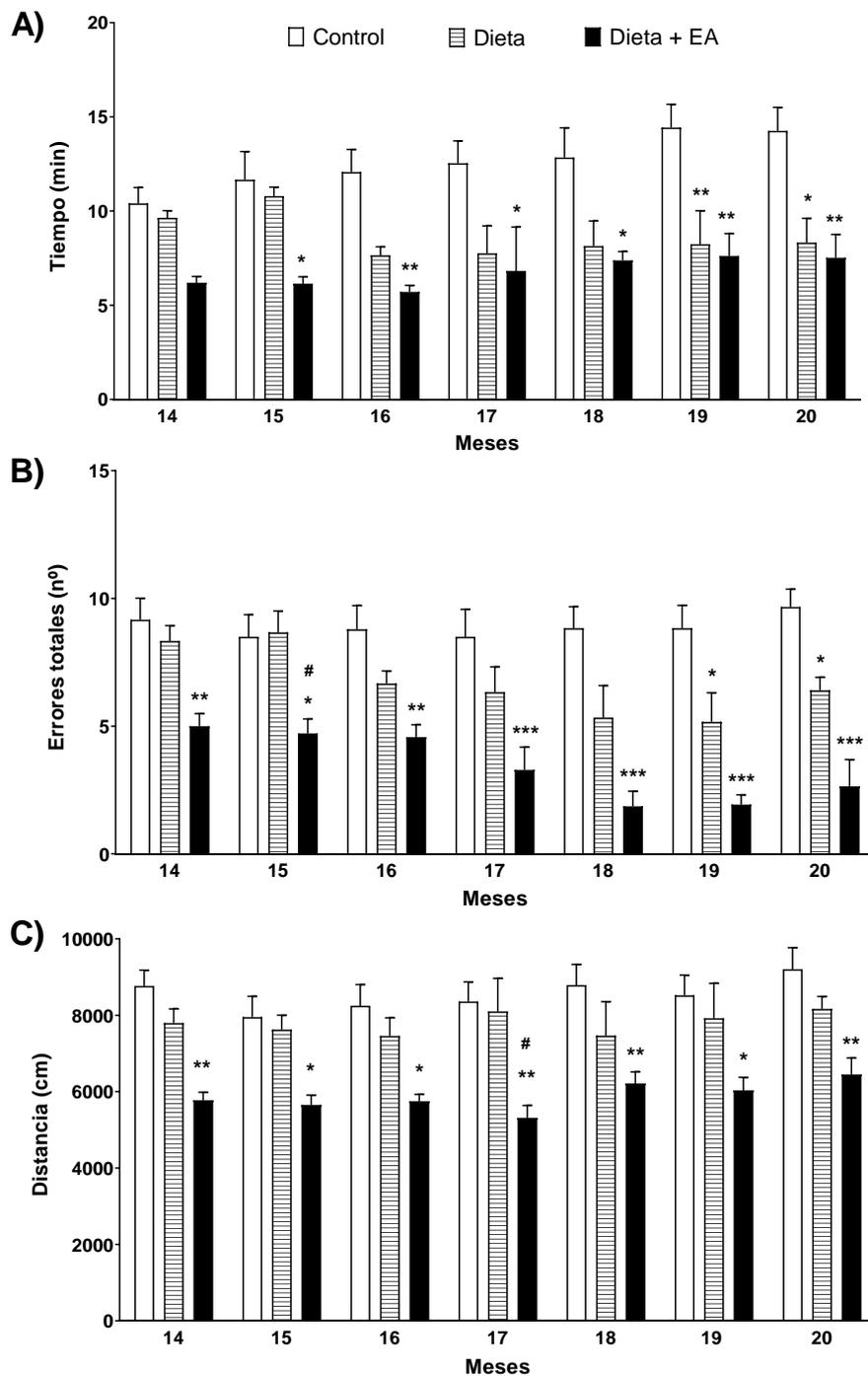


Figura 144. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo en ratas sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A), los errores cometidos (B) y la distancia recorrida (C) de los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (Dieta, $n=6$, 14-20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta (14-20 meses de edad) junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses de edad) (Dieta + EA, $n=7$) frente a los animales del grupo control (20 meses, $n=5$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control; # $p<0.05$ comparando los grupos Dieta y Dieta + EA (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

Finalmente, la distancia recorrida (figura 144C) está condicionada por el tratamiento ($F_{(2,154)}=40.8$, $p<0.0001$), aunque no por la duración ($F_{(6,154)}=0.748$, $p=0.612$) ni su interacción ($F_{(12,154)}=0.204$, $p=0.9981$). A los 20 meses, los animales del grupo Dieta recorren menos distancia (11%) en comparación al grupo control, aunque no de forma significativa; a diferencia, el grupo Dieta + EA redujo significativamente la distancia recorrida en comparación al grupo control (30%, $p<0.01$).

En el test del laberinto de *Barnes*, los animales del grupo Dieta y los del grupo Dieta + EA ejecutan el test de forma más eficaz, localizando el *target* en menor tiempo en comparación a los animales control. La latencia (figura 145A) está condicionada por el entrenamiento ($F_{(3,72)}=20.4$, $p<0.0001$), por el tratamiento ($F_{(2,72)}=39.4$, $p<0.0001$) y por su interacción ($F_{(6,72)}=6.66$, $p<0.0001$). En cuanto a los errores cometidos (figura 145B), se ven influenciados por el tratamiento ($F_{(2,72)}=27.5$, $p<0.0001$) y el entrenamiento ($F_{(3,72)}=3.23$, $p=0.0274$), aunque no por su interacción ($F_{(6,72)}=1.19$, $p=0.3231$). Además, el test de *Bonferroni* detectó diferencias significativas en el primer y segundo entrenamiento, indicando que los animales del grupo Dieta y del grupo Dieta + EA recuerdan mejor la localización del *target*, aprendida el día anterior en la fase de familiarización, que los animales control. Las estrategias seguidas para localizar el *target* en los animales del grupo control fueron principalmente la estrategia aleatoria junto a la estrategia seriada. A diferencia de estos resultados, los animales de los grupos Dieta y Dieta + EA siguieron principalmente la estrategia seriada y la directa (figura 145C).

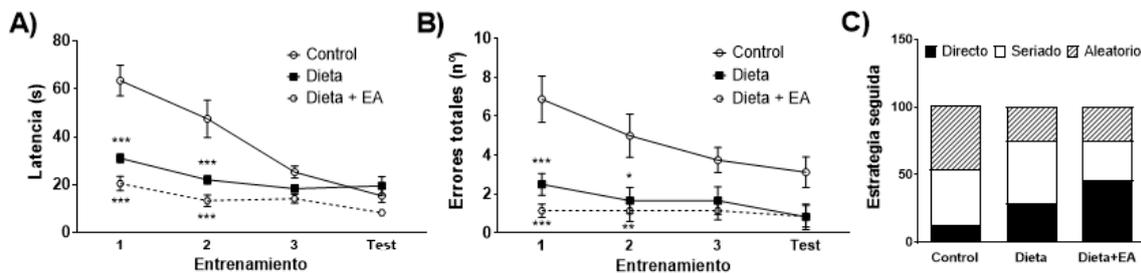


Figura 145. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo en ratas sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de *Barnes*. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) de los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (Dieta, $n=6$, 14-20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (Dieta + EA, $n=7$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.7.1.2 Memoria episódica

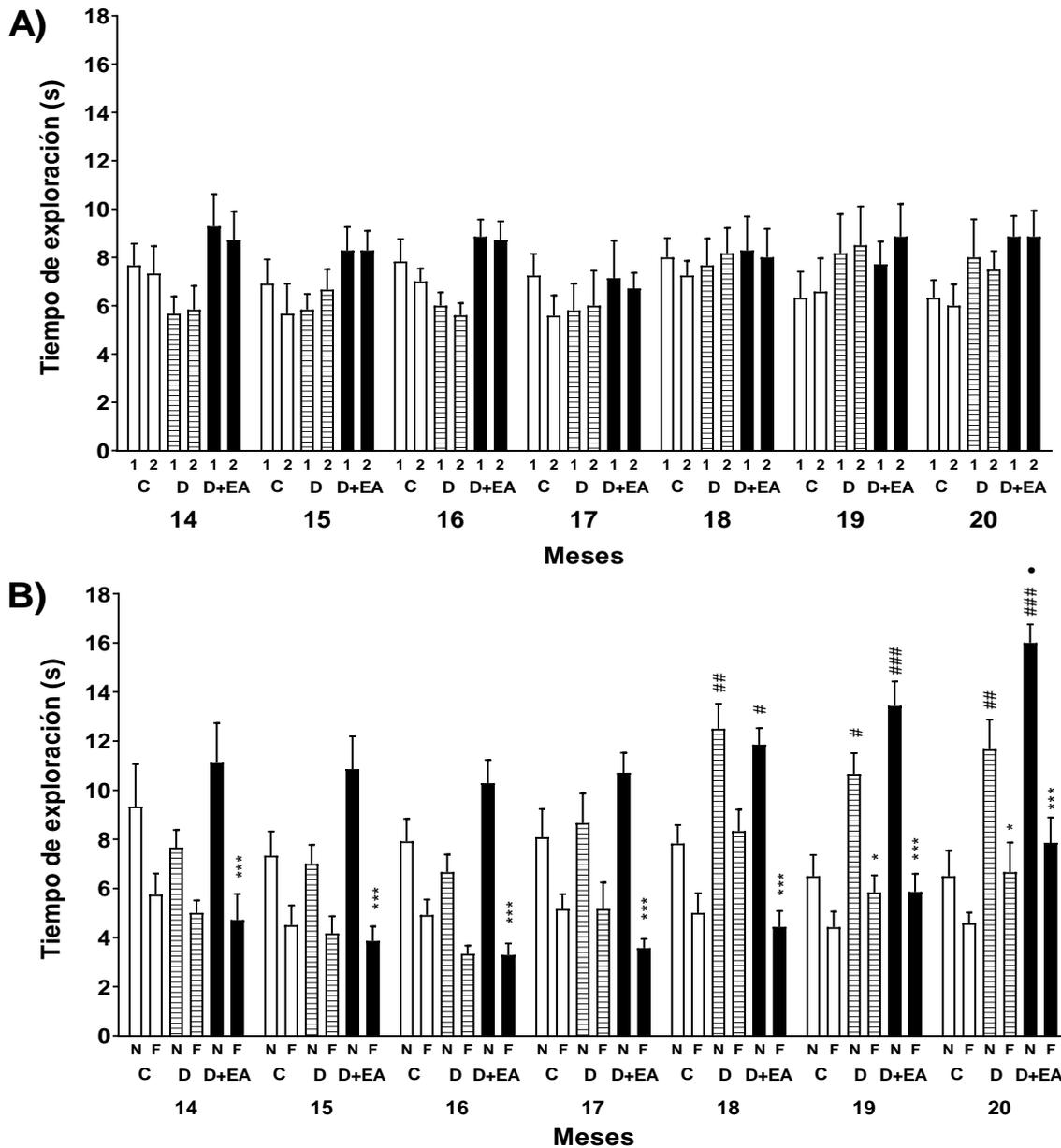


Figura 146. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (B: N, objeto nuevo; F, objeto familiar) de los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (Dieta, $n=6$, 14-20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses) (Dieta + EA, $n=7$) frente al grupo control ($n=5$). * $p<0.05$, *** $p<0.001$ comparando el tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el objeto familiar; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ al comparar con el control; • $p<0.05$ comparando los valores de los grupos Dieta y Dieta + EA (ANOVA de tres factores, seguido por el test de Fisher PLSD).

En la fase de familiarización del test de reconocimiento de objeto nuevo (figura 146A), no se observa una preferencia por ninguno de los objetos situados en el campo abierto en los animales de los diferentes grupos. No obstante, al finalizar los tratamientos el tiempo de exploración promedio de los animales del grupo Dieta es un 34% superior en comparación al grupo control y un 44% superior en el grupo Dieta + EA.

En la fase de test (figura 146B), ANOVA de tres factores muestra que los valores están condicionados por el objeto ($F_{(1,308)}=216.076$, $p<0.0001$), por el tratamiento ($F_{(2,308)}=18.684$, $p<0.0001$) y por la duración de los tratamientos ($F_{(6,308)}=6.341$, $p<0.0001$). Asimismo, se detectaron diferencias en la interacción entre los parámetros tratamiento x objeto ($F_{(2,308)}=20.589$, $p<0.0001$) y tratamiento x duración ($F_{(12,308)}=4.833$, $p<0.0001$). Los cambios observados son debidos a que los animales de los grupos Dieta y Dieta + EA tienden a explorar más el objeto nuevo que el familiar. Así, mientras que en los animales control el test de *Fisher PLSD* no detectó diferencias significativas entre el objeto nuevo y el familiar, en los animales del grupo Dieta se detectaron diferencias significativas entre ambos objetos a partir de los 19 meses. En el grupo Dieta + EA se encontraron diferencias significativas en todos los meses analizados; cabe tener en cuenta que cuando los animales de este grupo inician la dieta, ya habían recibido durante varios meses la aplicación del EA. A los 20 meses, el tiempo de exploración del objeto nuevo se incrementó en un 80% ($p<0.01$) en los animales del grupo Dieta y en un 146% ($p<0.001$) en los animales del grupo Dieta + EA en comparación al grupo control.

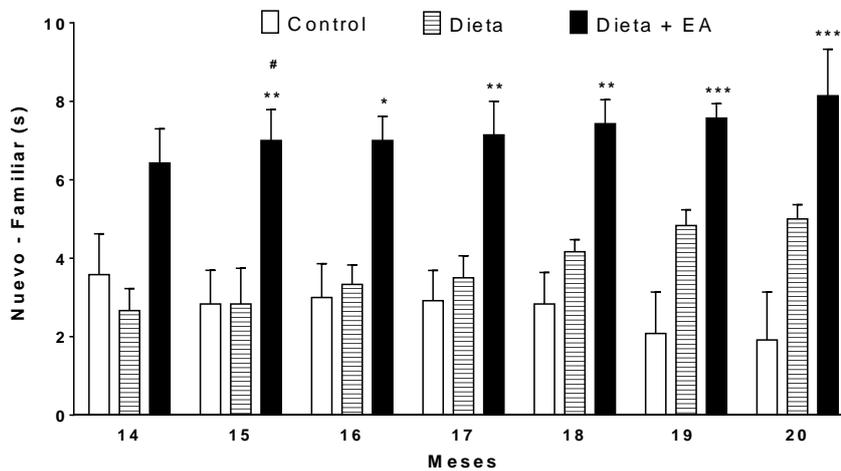


Figura 147. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar en la fase de test de los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (Dieta, $n=6$, 14-20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (Dieta + EA, $n=7$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control; # $p<0.05$ comparando los valores de los grupos Dieta y Dieta + EA (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

En relación a lo comentado anteriormente, la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar (figura 147) está condicionada por el tratamiento ($F_{(2,154)}=45.1$, $p<0.0001$), aunque no por la duración ($F_{(6,154)}=0.313$, $p=0.9292$) ni por su interacción ($F_{(12,154)}=0.740$, $p=0.7109$). De esta forma, a los 20 meses la diferencia en la exploración del objeto nuevo menos el objeto familiar se incrementó en los animales del grupo Dieta (2.6 veces, aunque no de forma significativa) en comparación al grupo control, de la misma forma que en el grupo Dieta + EA (4.2 veces, $p<0.001$).

4.7.1.3 Coordinación motora

El tiempo que los animales permanecen sobre la rueda giratoria antes de caer, analizado mediante el test de *rotarod* (figura 148), no está influenciado significativamente por el tratamiento ($F_{(2,154)}=3.02$, $p=0.0517$), por la duración ($F_{(6,154)}=0.635$, $p=0.7022$) ni por su interacción ($F_{(12,154)}=0.077$, $p=1.00$).

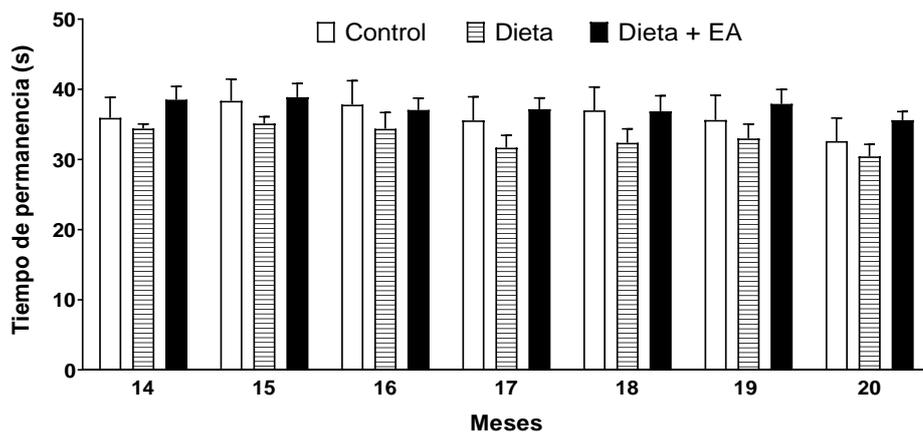


Figura 148. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la coordinación motora mediante el test del *rotarod*. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo que permanecen en la rueda giratoria antes de caer de los animales sometidos a dieta rica en antioxidantes (Dieta, $n=6$, 14-20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses) (Dieta + EA, $n=7$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). ANOVA de dos factores seguido por el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre los grupos.

4.7.2 Efectos de una dieta rica en antioxidantes y el enriquecimiento ambiental sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo

4.7.2.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

En el hipocampo (figura 149), la dieta rica en antioxidantes y la acción de dicha dieta junto a un programa de EA incrementan la actividad de la enzima TH, asociado a una mayor

acumulación de DOPA ($F_{(2,15)}=30.1$, $p<0.0001$; figura 149A) y de los niveles de NA ($F_{(2,15)}=40.9$, $p<0.0001$; figura 149B). Así, los niveles de DOPA aumentaron significativamente en el grupo Dieta (74%, $p<0.01$) en comparación al grupo control. Dicho aumento fue aún más acusado en el grupo Dieta + EA (154%, $p<0.001$), observándose un efecto sumatorio entre la dieta y el EA, habiendo diferencias significativas entre ambos grupos ($p<0.01$). La cantidad de NA también se incrementó tanto en el grupo Dieta (20%, $p<0.05$) como en el grupo Dieta + EA (67%, $p<0.001$), observándose además el efecto sumatorio entre los dos tratamientos ($p<0.001$).

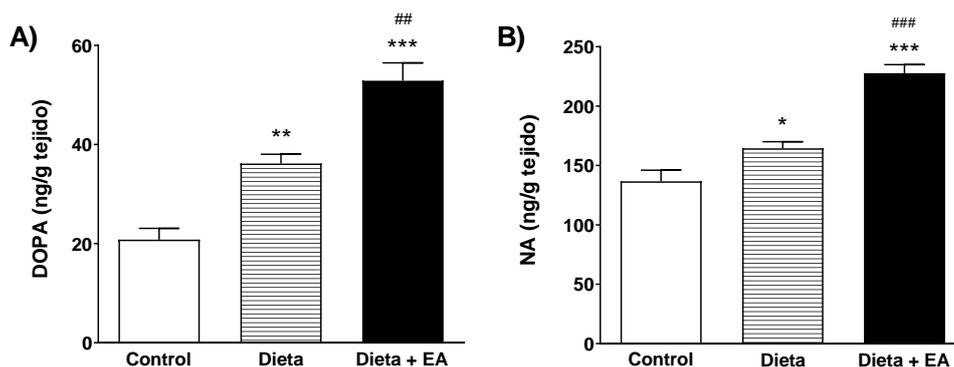


Figura 149. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (después de la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo de animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (Dieta, $n=6$, 14-20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses de edad) (Dieta + EA, $n=7$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control; ### $p<0.01$, #### $p<0.001$ comparando los grupos Dieta y Dieta + EA (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

La actividad de la TH en el estriado (figura 150) también se ve modificada, con un mayor contenido de DOPA ($F_{(2,15)}=107$, $p<0.0001$; figura 150A), de la cantidad de DA ($F_{(2,15)}=86$, $p<0.0001$; figura 150B) y de sus metabolitos HVA ($F_{(2,15)}=22.8$, $p<0.0001$; figura 150C) y DOPAC ($F_{(2,15)}=6.39$, $p=0.0099$; figura 150D). El grupo Dieta presentó un incremento significativo de los niveles de DOPA (29%, $p<0.01$) en comparación al control, aumento que fue mayor en el grupo Dieta + EA (99%, $p<0.001$) observándose, de nuevo, un efecto sumatorio de ambos tratamientos ($p<0.001$). De forma similar, aumentó el contenido de DA (Dieta: 16%, $p<0.01$; Dieta + EA: 51%, $p<0.001$), habiendo diferencias entre ambos tratamientos ($p<0.001$). En los metabolitos analizados se produjo también un incremento tanto de los niveles de HVA (Dieta: 17%, $p<0.05$; Dieta + EA: 48%, $p<0.001$) como DOPAC (Dieta: 30%, $p<0.05$; Dieta + EA: 52%, $p<0.01$).

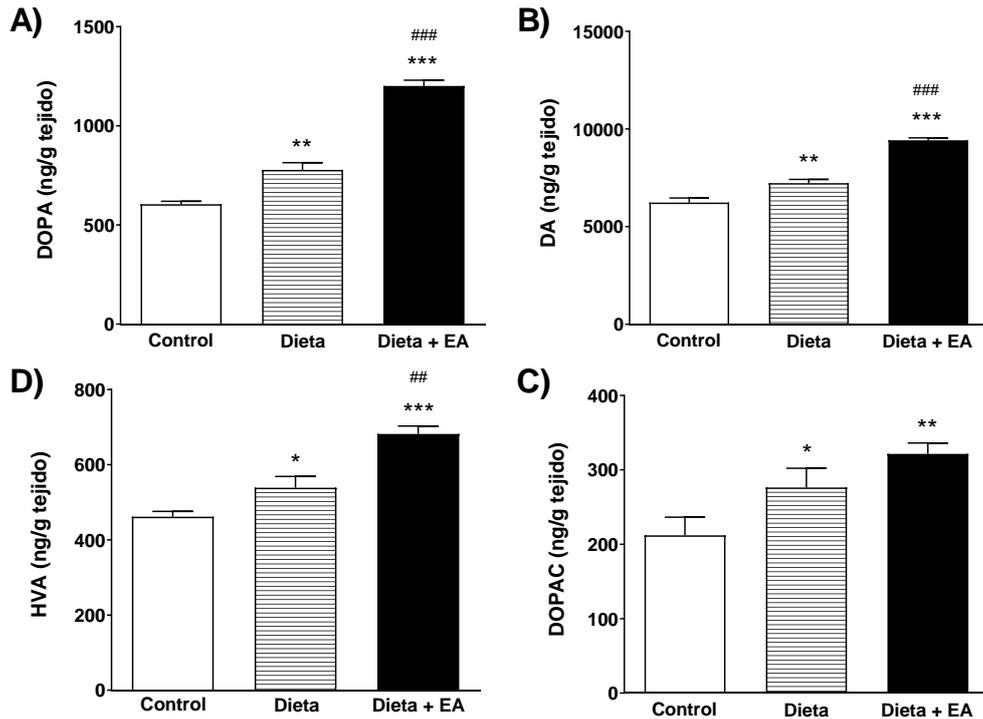


Figura 150. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el estriado. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A), los niveles de DA (B) y sus metabolitos HVA (C) y DOPAC (D) extractos procedentes del estriado (ng/g) de animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (Dieta, n=6, 14-20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses) (Dieta + EA, n=7) frente a los animales del grupo control (n=5). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 al comparar con el grupo control; ##p<0.01, ###p<0.001 comparando el grupo Dieta y el grupo Dieta + EA (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.7.2.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, en el estriado y en la glándula pineal

En el hipocampo, se observó un incremento de la actividad de la enzima TPH-2 (figura 151), tanto en el grupo Dieta como en el grupo Dieta + EA, con una mayor acumulación de 5-HTP ($F_{(2,15)}=78.8$, $p<0.0001$; figura 151A), de la cantidad de 5-HT ($F_{(2,15)}=28.9$, $p<0.0001$; figura 151B) y del metabolito 5-HIAA ($F_{(2,15)}=25.1$, $p<0.0001$; figura 151C). Los niveles de 5-HTP se incrementaron significativamente en el grupo Dieta (81%, $p<0.001$) y Dieta + EA (107%, $p<0.001$), habiendo un efecto sumatorio entre ambos grupos ($p<0.05$). Además, se produjo un aumento del contenido de 5-HT (Dieta: 38%, $p<0.001$; Dieta + EA: 53%, $p<0.001$) y de 5-HIAA (33% y 42% respectivamente, $p<0.001$).

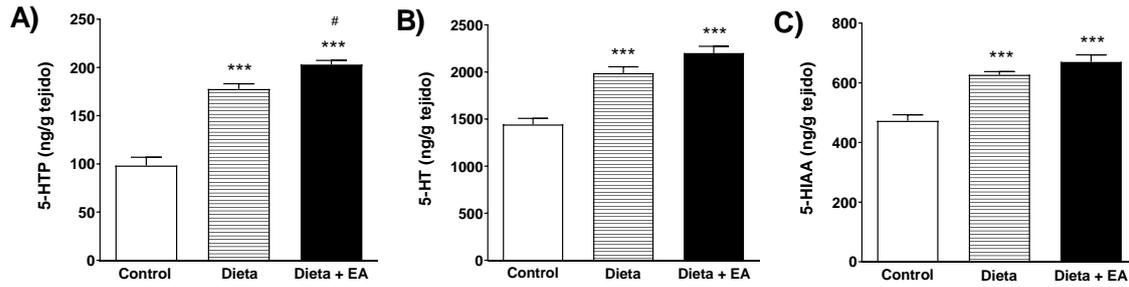


Figura 151. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (tras la inhibición de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A), los niveles de 5-HT (B), así como del metabolito 5-HIAA (C), en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (Dieta, n=6, 14-20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses de edad) (Dieta + EA, n=7) frente a los animales del grupo control (n=5). ***p<0.001 comparando con el grupo control; #p<0.05 al comparar el grupo Dieta y el grupo Dieta + EA (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

En el estriado, se produjo también una mayor acumulación de 5-HTP ($F_{(2,15)}=17.8$, $p=0.0001$; figura 152A), de los niveles de 5-HT ($F_{(2,15)}=201$, $p<0.0001$; figura 152B) y de los del metabolito 5-HIAA ($F_{(2,15)}=8.67$, $p=0.0031$; figura 152C). En el grupo Dieta se incrementaron significativamente los niveles de 5-HTP (88%, $p<0.01$) en comparación al grupo control, acompañado por un aumento de los valores de 5-HT (125%, $p<0.001$) y del metabolito 5-HIAA (20%, $p<0.05$). En el grupo Dieta + EA se detectaron incrementos significativos en comparación al control, tanto en el precursor 5-HTP (118%, $p<0.001$) como en 5-HT (186%, $p<0.001$) y 5-HIAA (28%, $p<0.01$). Además, se observó un efecto sumatorio de los dos tratamientos en la 5-HT ($p<0.001$).

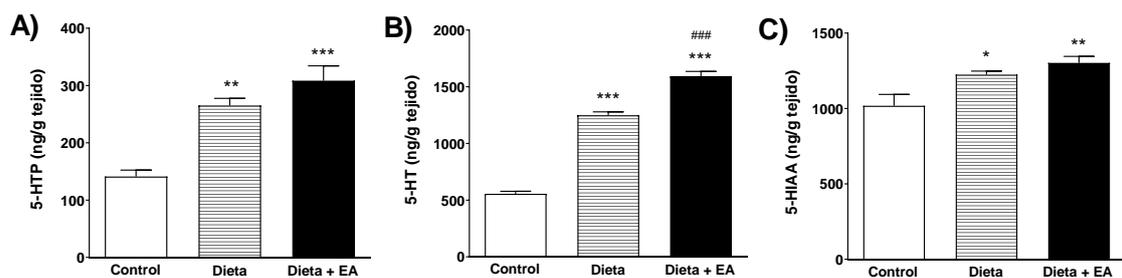


Figura 152. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y del metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (Dieta, n=6, 14-20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses) (Dieta + EA, n=7) frente a los animales del grupo control (n=5). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 al comparar con el grupo control; ###p<0.001 comparando el grupo Dieta y el grupo Dieta + EA (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

En la glándula pineal (figura 153) aumentó la actividad de la vía de TPH-1, tanto el grupo Dieta como el grupo Dieta + EA, incrementándose de forma significativa la acumulación de 5-HTP ($F_{(2,13)}=12.3$, $p=0.0012$; figura 153A), los niveles de 5-HT ($F_{(2,13)}=21.2$, $p<0.0001$; figura 153B) y los del metabolito 5-HIAA ($F_{(2,13)}=9.27$, $p=0.0037$; figura 153C). Sin embargo, no se observó el efecto sumatorio descrito anteriormente entre el grupo Dieta y el grupo Dieta + EA. Los valores de 5-HTP fueron aumentados (Dieta: 145%, $p<0.01$; Dieta + EA: 156%, $p<0.01$) en comparación al grupo control, así como el contenido de 5-HT (155% y 147% respectivamente, $p<0.001$) y 5-HIAA (Dieta: 111%, $p<0.05$; Dieta + EA: 152%, $p<0.01$).

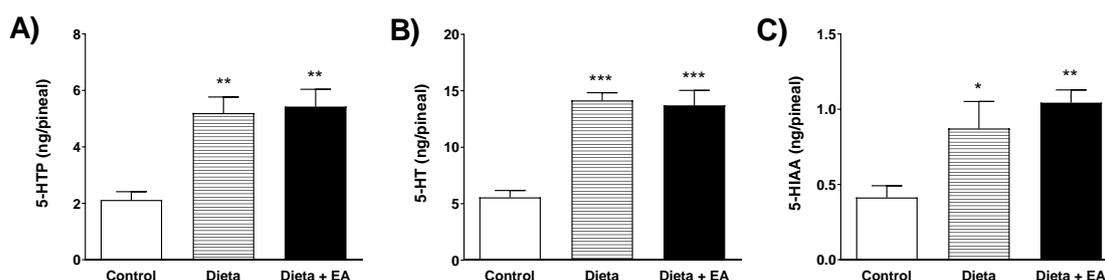


Figura 153. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y del metabolito 5-HIAA (C) en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (Dieta, $n=5$, 14-20 meses de edad) y a la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo (1-20 meses) (Dieta + EA, $n=6$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.7.3 Efectos de una dieta rica en antioxidantes y el enriquecimiento ambiental sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo

4.7.3.1 Efecto sobre la proteína SIRT1

La expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo (figura 154) se ve significativamente modificada ($F_{(3,23)}=10.06$, $p=0.0002$). Los resultados obtenidos el grupo Dieta muestran un incremento de los niveles de SIRT1 (22%, $p<0.05$), de la misma forma que los animales del grupo Dieta + EA (22%, $p<0.05$), respecto a los animales viejos del grupo control (los cuales mostraron una reducción del 27% respecto a los jóvenes, $p<0.001$).

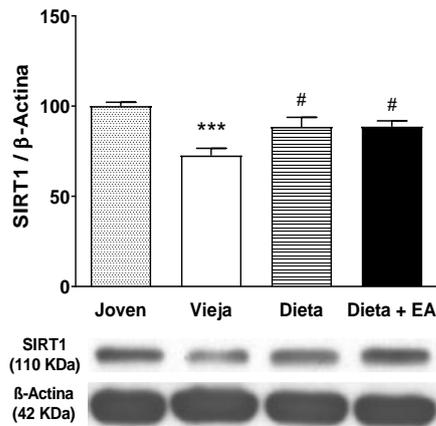


Figura 154. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en hipocampo. Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes, Dieta, n=6; acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo, Dieta + EA, n=7; animales viejos del grupo control, Vieja, n=7) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes (n=7). ***p<0.001 al comparar con los animales jóvenes del grupo control; #p<0.05 al comparar con los animales viejos del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo de los cambios obtenidos en SIRT1, sin cambios en la β -actina (patrón de carga).

4.7.3.2 Efecto sobre la proteína NF- κ B total

Los niveles de NF- κ B total obtenidos en el hipocampo (figura 155), con la metodología utilizada en este estudio, no muestran diferencias significativas entre los grupos analizados ($F_{(3,21)}=2.251$, $p=0.1121$). De este modo, los animales jóvenes presentan niveles similares a los obtenidos por los animales viejos (grupo control, Dieta y Dieta + EA).

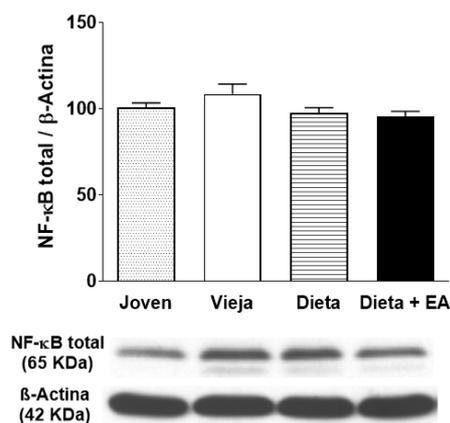


Figura 155. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína NF- κ B total (65 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes, Dieta, n=6; acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo, Dieta + EA, n=7; animales viejos del grupo control, Vieja, n=6) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes (n=6). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo.

4.7.3.3 Efectos sobre la proteína RbAp48/46

La expresión de la proteína RbAp48/46 en el hipocampo (figura 156) se ve modificada por la edad ($F_{(3,21)}=10.11$, $p=0.0003$), pero no por la dieta ni por la acción conjunta de dicha dieta y el enriquecimiento. Los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles de esta proteína,

mientras que los animales viejos muestran una reducción significativa de RbAp48/46 (34%, $p<0.01$), disminución que no es revertida en el grupo Dieta (34%, $p<0.001$) ni en el grupo Dieta + EA (31%, $p<0.01$).

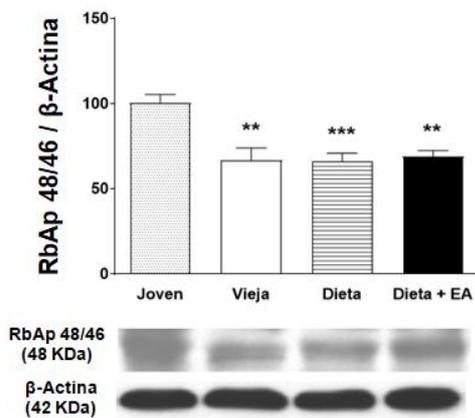


Figura 156. Efecto de la dieta rica en antioxidantes y de la acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes, Dieta, $n=6$; acción conjunta de dicha dieta junto a un programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo, Dieta + EA, $n=7$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=6$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la figura.

4.8 Efectos del estrés moderado iniciado a distintas edades (1 y 7 meses de edad) sobre las habilidades cognitivas y motoras, la actividad de las enzimas TH y TPH y las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 de ratas viejas

En este apartado se quieren mostrar los efectos de la aplicación de dos programas de estrés crónico moderado impredecible (iniciados a partir de 1 mes y de 7 meses de edad hasta los 20 meses) sobre el proceso de envejecimiento, tanto a nivel comportamental como a nivel neuroquímico.

4.8.1 Efectos del programa de estrés moderado aplicado desde 1 mes de edad hasta los 20 meses de vida (estrés moderado temprano)

La aplicación del programa de estrés crónico moderado impredecible a largo plazo desde edades tempranas (1 mes de edad hasta los 20 meses de los animales; ES 1-20) induce cambios significativos de tipo conductual y neuroquímico. Además, en los primeros meses de edad la aplicación del estrés moderado modificó el peso corporal de los animales en comparación al grupo control (figura 157), aunque no de forma significativa (test de *Bonferroni*). ANOVA de dos factores mostró como el peso está condicionado por la edad de los animales ($F_{(19,320)}=136$, $p<0.0001$) y por el tratamiento ($F_{(1,320)}=5.58$, $p=0.0187$), aunque no por su interacción ($F_{(19,320)}=0.637$, $p=0.8770$).

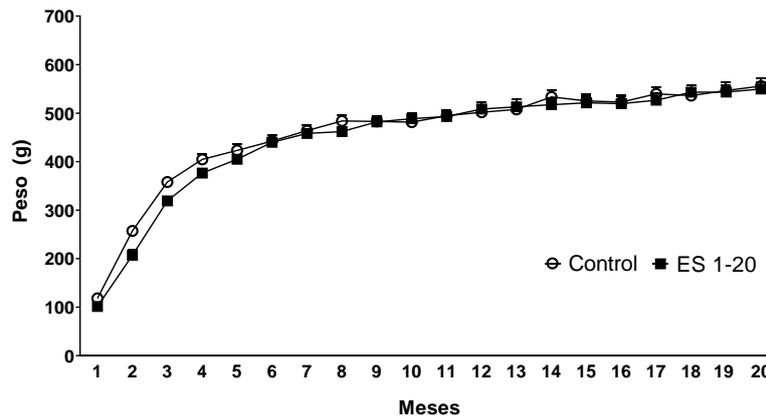


Figura 157. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre el peso de los animales. Los puntos representan el promedio \pm error estándar del peso (g) de los animales sometidos a estrés moderado (ES 1-20, $n=6$) a largo plazo (desde 1 mes de edad hasta los 20 meses) frente a los animales del grupo control ($n=12$). El test de *Bonferroni* (ANOVA de dos factores) no detectó diferencias significativas entre grupos.

4.8.1.1 Efectos conductuales del programa de estrés moderado temprano

4.8.1.1.1 Memoria de trabajo espacial y aprendizaje visoespacial

La aplicación del estrés moderado ES 1-20 modifica la ejecución del test del laberinto radial (figura 158). El tiempo requerido para completar la prueba (figura 158A) se ve significativamente influenciado por el tratamiento ($F_{(1,320)}=22.1$, $p<0.0001$) y por la duración ($F_{(19,320)}=8.47$, $p<0.0001$), pero no por su interacción ($F_{(19,320)}=0.697$, $p=0.8218$). Los animales sometidos a ES suelen realizar el test en menos tiempo en comparación al grupo control; sin embargo, el test de *Bonferroni* no detectó diferencias entre ambos grupos. En cuanto a los errores cometidos (figura 158B), se ven condicionados por el tratamiento ($F_{(1,320)}=12.6$, $p=0.0004$) y la duración ($F_{(19,320)}=2.52$, $p=0.0005$), pero no por su interacción ($F_{(19,320)}=3.92$, $p<0.0001$). En este caso, cabe indicar que los animales sometidos a ES no siguen una pauta fija, sino que en función de los factores estresantes aplicados en los días previos realizaban más o menos errores en comparación al grupo control. A pesar de estos cambios, el test de *Bonferroni* sólo detectó diferencias significativas en el número de errores cometidos a los 8 y 9 meses de edad (reducciones del 49% y 50% respectivamente, $p<0.001$) en comparación al grupo control. En la mayoría de los meses, a pesar de realizar menos errores, el tiempo necesario para finalizar la prueba no se redujo significativamente debido al comportamiento de los animales, mucho más indeciso a la hora de entrar en los diferentes brazos del dispositivo y de llegar al final de los mismos para conseguir la recompensa. Finalmente, la distancia recorrida (figura 158C) se ve condicionada por el tratamiento ($F_{(1,320)}=3.67$, $p=0.056$), la duración ($F_{(19,320)}=1.64$, $p=0.0447$) y su interacción ($F_{(19,320)}=5.22$, $p<0.0001$). El test de *Bonferroni* sólo detectó diferencias significativas en el cuarto mes (incremento del 55%, $p<0.001$ en comparación al control) y a los 8 y 9 meses de edad (con reducciones del: 38% a los 8 meses, $p<0.01$; 45% a los 9, $p<0.001$).

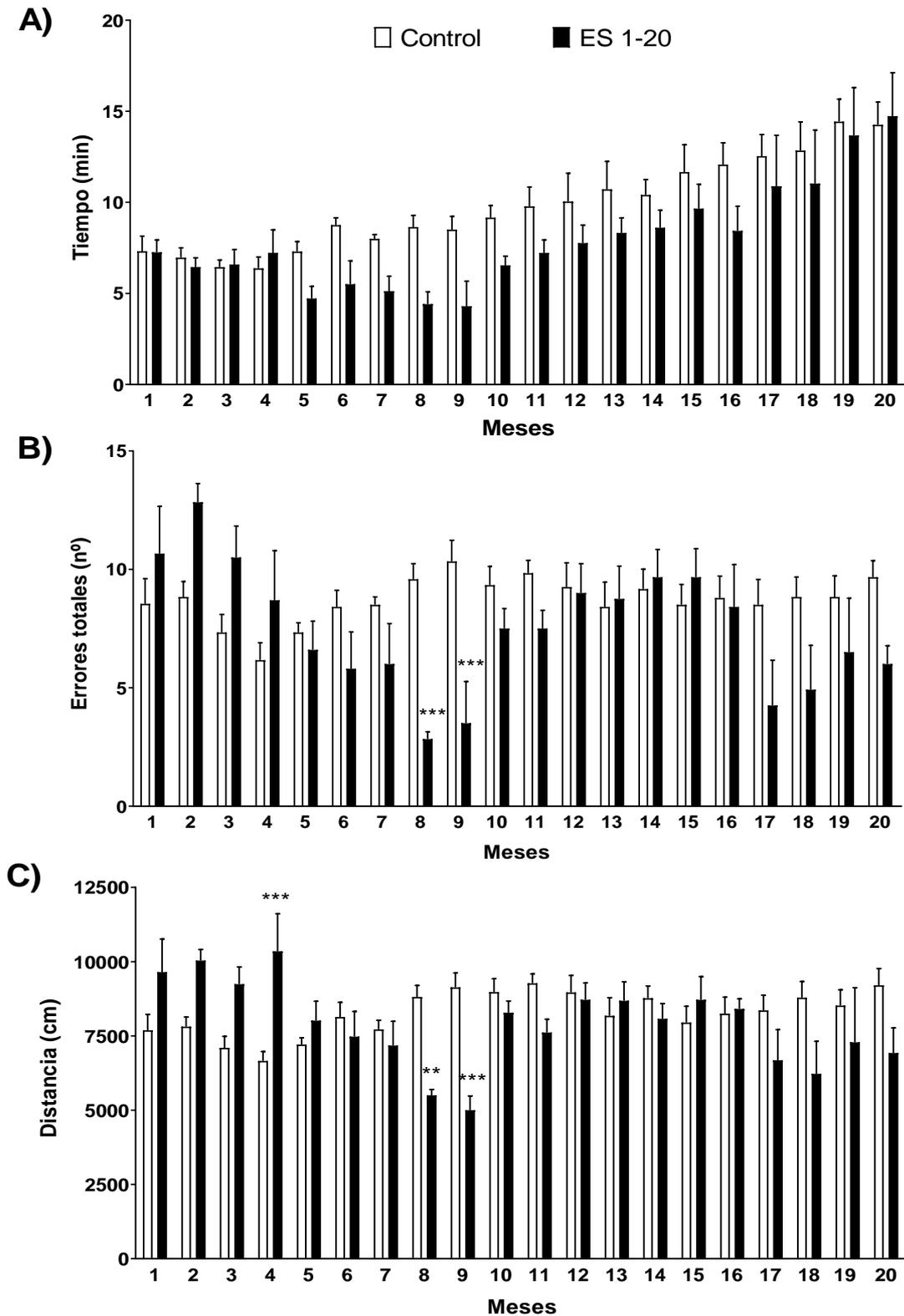


Figura 158. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A), los errores cometidos (B) y la distancia recorrida (C) de los animales sometidos a estrés moderado a largo plazo (1-20 meses, ES 1-20, $n=6$) frente a los animales del grupo control ($n=12$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ al comparar con el grupo control (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

La capacidad de aprendizaje visoespacial de los animales sometidos a estrés, analizada a los 6, 12 y 19 meses de edad mediante el test del laberinto de *Barnes*, no difiere significativamente de la de los animales control en la latencia y los errores cometidos, aunque sí en la estrategia seguida. A los 6 meses, la latencia (figura 159A) está significativamente influenciada por el tratamiento ($F_{(1,64)}=3.77$, $p=0.05$), pero no por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=1.72$, $p=0.1731$) ni la interacción de ambos factores ($F_{(3,64)}=0.320$, $p=0.8112$). En cuanto a los errores cometidos (figura 159B), están condicionados por el tratamiento ($F_{(1,64)}=7.20$, $p=0.0094$) así como por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=2.98$, $p=0.0386$), pero no por su interacción ($F_{(3,64)}=0.153$, $p=0.9273$). La comparación individual mediante el test de *Bonferroni* para la latencia y los errores no detectó diferencias significativas entre grupos de animales. Las estrategias seguidas para localizar el *target* en el grupo control fueron principalmente la estrategia directa junto a la seriada; a diferencia, los animales del grupo ES 1-6 siguieron principalmente la estrategia aleatoria (figura 159C).

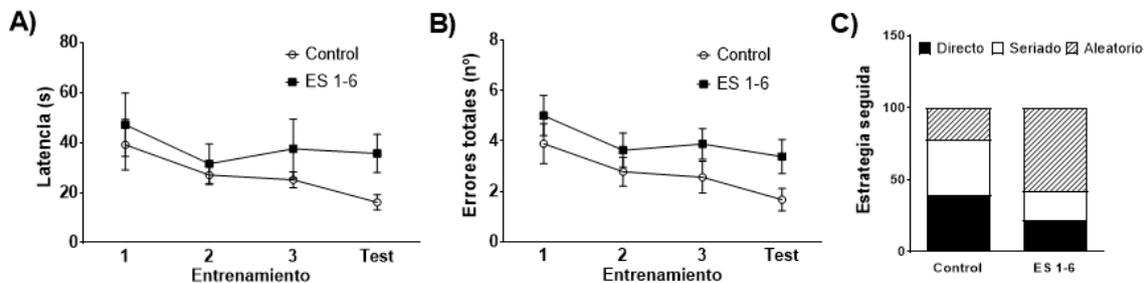


Figura 159. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de *Barnes* a los 6 meses de edad. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo del test de *Barnes* de los animales sometidos a estrés moderado desde 1 mes de edad de hasta los 6 meses (ES 1-6, $n=9$) frente al grupo control ($n=9$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

A los 12 meses, la latencia (figura 160A) está significativamente condicionada por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=6.57$, $p=0.0006$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.393$, $p=0.5329$) ni su interacción ($F_{(3,64)}=0.424$, $p=0.7361$). Los errores cometidos (figura 160B) también están influenciados por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=6.26$, $p=0.0009$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.0145$, $p=0.9046$) ni la interacción ($F_{(3,64)}=1.52$, $p=0.2181$). No se detectaron cambios en el test de *Bonferroni*. La estrategia seguida para localizar el *target* en el grupo control fue la estrategia seriada, seguida por la aleatoria. Sin embargo, en el grupo ES 1-12 la proporción de animales que siguieron la estrategia aleatoria fue mayor que en el grupo control (figura 160C).

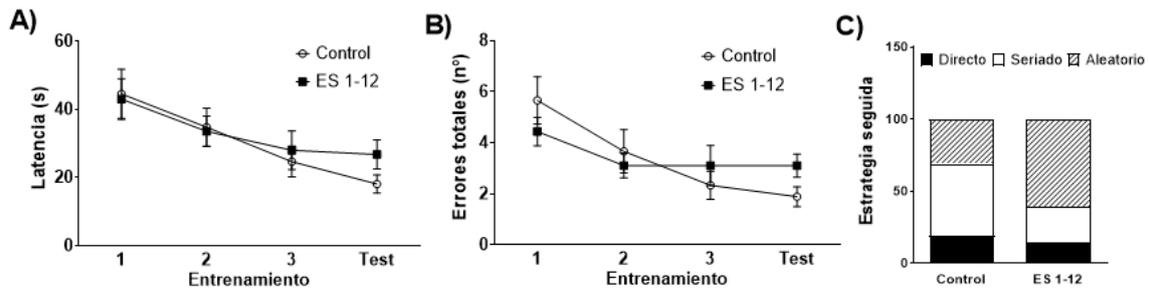


Figura 160. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de Barnes a los 12 meses de edad. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo de la prueba de los animales sometidos a estrés moderado desde 1 mes de edad de hasta los 12 meses (ES 1-12, $n=9$) frente al grupo control ($n=9$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

A los 19 meses, la latencia (figura 161A) está significativamente influenciada por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=10.7$, $p<0.0001$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.0826$, $p=0.775$) ni por su interacción ($F_{(3,64)}=2.99$, $p=0.378$). Los errores cometidos (figura 161B) se ven condicionados por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=3.60$, $p=0.0185$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.101$, $p=0.7513$) ni por su interacción ($F_{(3,64)}=0.432$, $p=0.7306$). No se detectaron cambios en el test de *Bonferroni*. Las estrategias seguidas para localizar el *target* en el grupo control fueron la seriada y la aleatoria, mientras que los animales del grupo ES 1-19 siguieron principalmente la estrategia aleatoria (figura 161C).

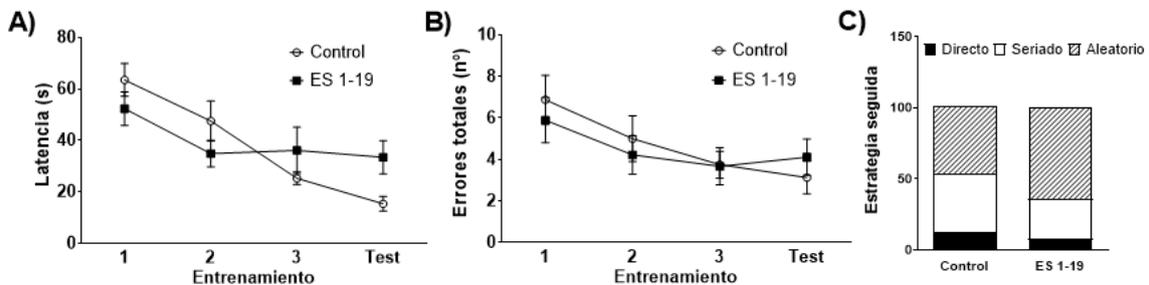


Figura 161. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de Barnes a los 19 meses de edad. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo de la prueba de los animales sometidos a estrés moderado desde 1 mes de edad de hasta los 19 meses (ES 1-19, $n=9$) frente al grupo control ($n=9$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.8.1.1.2 Memoria episódica

En la fase de familiarización del test de reconocimiento de objeto nuevo (figura 162A), los animales de los diferentes grupos, en general, no presentan una preferencia por ninguno de los

dos objetos situados en el campo abierto. Además, los animales sometidos a ES desde edades tempranas tienden a explorar durante menos tiempo los objetos.

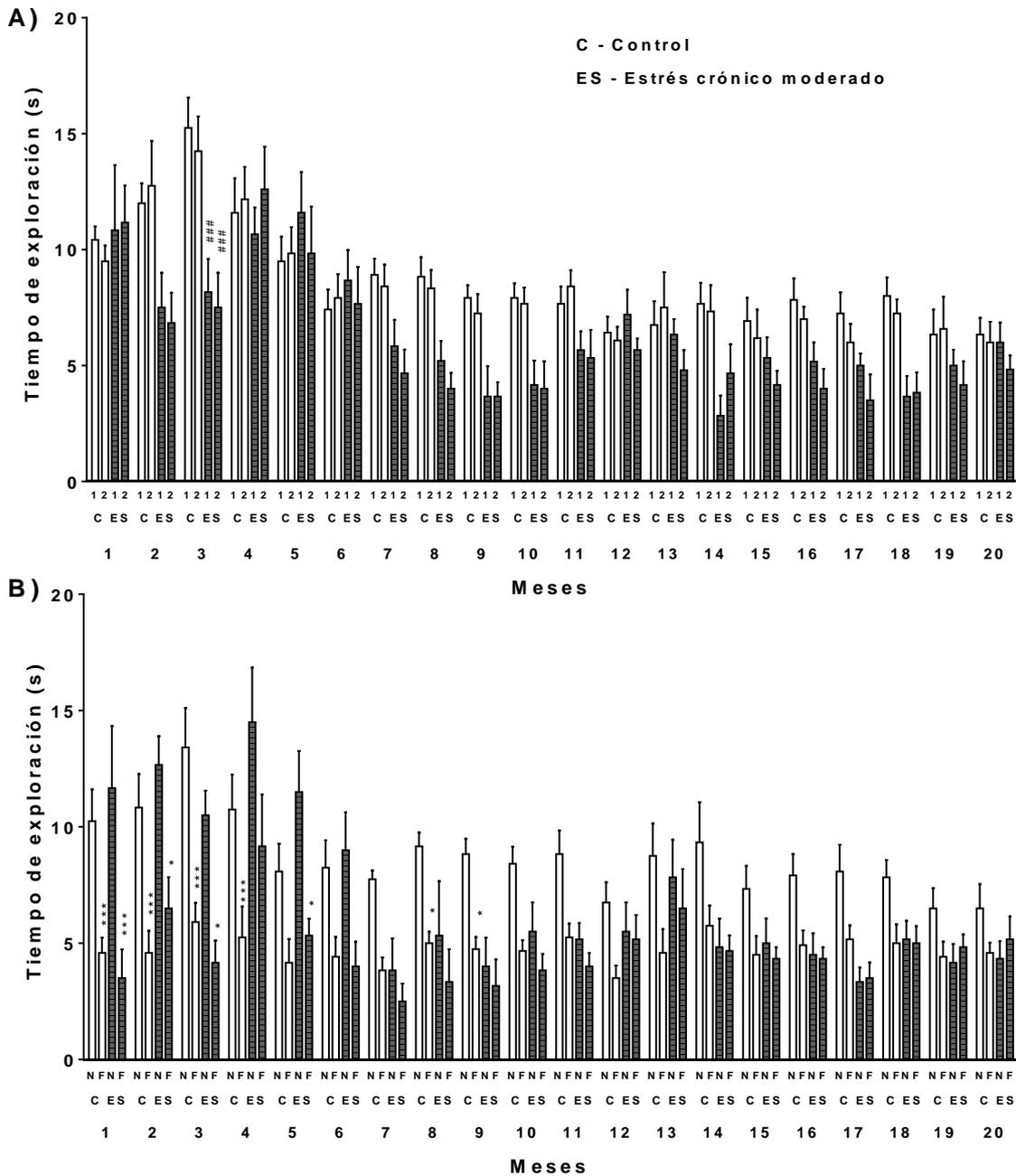


Figura 162. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (B: N, objeto nuevo; F, objeto familiar) de los animales sometidos a estrés moderado a largo plazo (desde 1 mes de edad de los animales hasta los 20 meses; ES 1-20, n=6) frente a los animales del grupo control (C, n=12). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparando el tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el objeto familiar; ## $p < 0.01$ al comparar con el grupo control (ANOVA de tres factores, seguido por el test de *Fisher PLSD*).

En la fase de test (figura 162B), ANOVA de tres factores indicó que los valores están condicionados por el objeto ($F_{(1,640)}=144.054$, $p<0.0001$), por el tratamiento ($F_{(1,640)}=12.866$, $p=0.0004$) y por la duración ($F_{(19,640)}=6.264$, $p<0.0001$). Asimismo, se detectaron diferencias en la interacción entre los parámetros tratamiento x objeto ($F_{(1,640)}=10.448$, $p=0.0013$), duración x objeto ($F_{(19,640)}=3.003$, $p<0.0001$) y tratamiento x duración ($F_{(19,640)}=2.889$, $p<0.0001$). El test de *Fisher* no detectó diferencias significativas entre el objeto nuevo y el familiar a partir de los 10 meses de edad en el control y a partir de 6 meses en los animales del grupo ES 1-20. Además, a los 20 meses los animales del grupo ES 1-20 exploraron un 33% menos el objeto nuevo y un 13% más el familiar que los del grupo control, aunque estos cambios no fueron significativos.

En relación a lo comentado anteriormente, se detectaron cambios en la diferencia del tiempo de exploración del objeto nuevo menos el objeto familiar (figura 163), estando condicionada por el tratamiento ($F_{(1,320)}=24.9$, $p<0.0001$) y por la duración ($F_{(19,320)}=7.16$, $p<0.0001$), pero no por su interacción ($F_{(19,320)}=1.48$, $p=0.0905$). Así, el estrés moderado disminuyó el tiempo que los animales exploraban el objeto nuevo menos el tiempo del familiar a partir de los 7 meses de edad hasta el final del estudio en comparación al grupo control, aunque el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas.

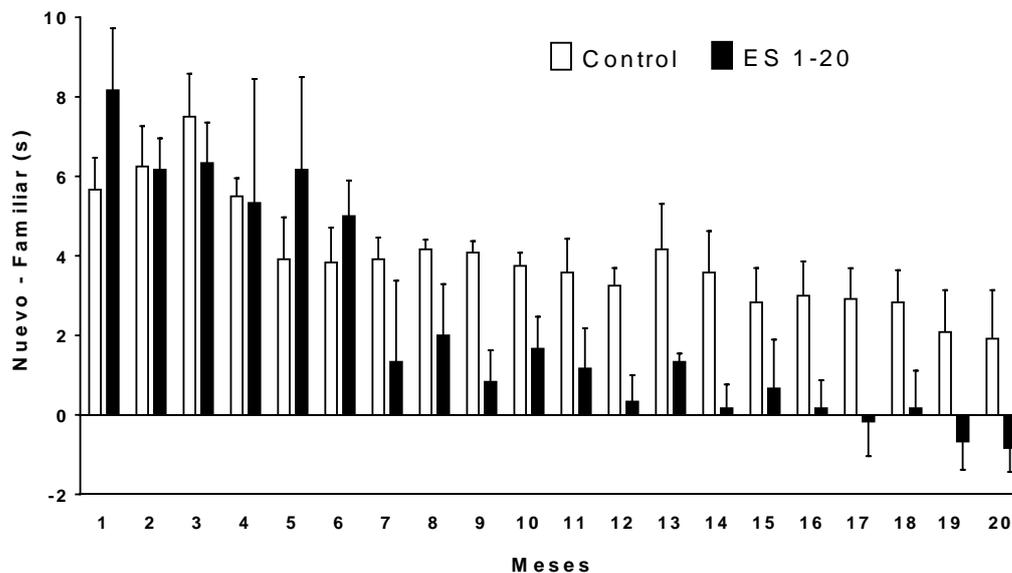


Figura 163. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la diferencia entre el tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar en la fase de test de los animales sometidos a estrés moderado a largo plazo (1-20 meses de edad; ES 1-20, $n=6$) frente a los animales del grupo control ($n=12$). ANOVA de dos factores seguido por el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre ambos grupos.

4.8.1.1.3 Coordinación motora

En la coordinación motora (figura 164), el tiempo que los animales permanecieron sobre la rueda giratoria antes de caer está condicionado por el tratamiento ($F_{(1,320)}=29.1$, $p<0.0001$) y la duración ($F_{(19,320)}=2.41$, $p=0.001$), pero no por su interacción ($F_{(19,320)}=0.436$, $p=0.9822$). Sin embargo, aunque con el ES se producen reducciones en el tiempo que los animales permanecían sobre la rueda giratoria, el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas.

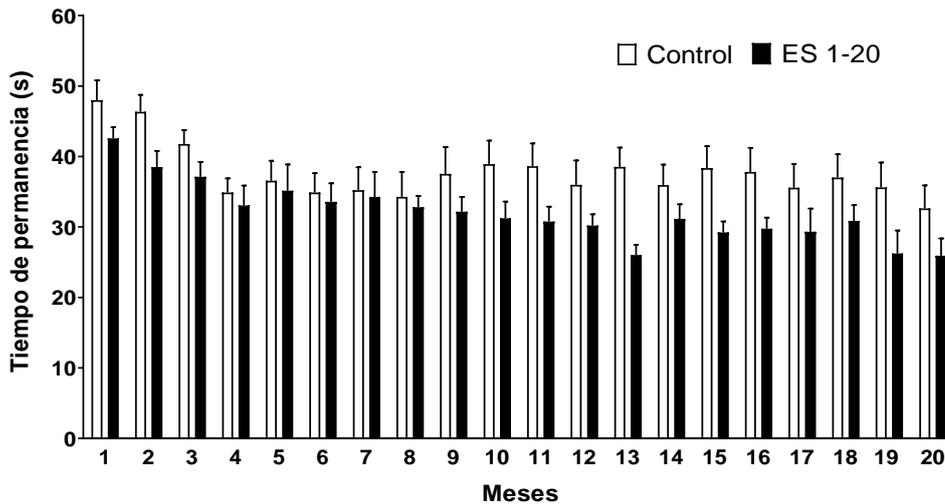


Figura 164. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la coordinación motora mediante el test del *rotarod*. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo que permanecen en la rueda giratoria antes de caer de los animales sometidos a estrés moderado a largo plazo (1-20 meses de edad; ES 1-20, $n=6$) frente a los animales del grupo control ($n=12$). ANOVA de dos factores seguido por el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre ambos grupos.

4.8.1.2 Efectos del estrés moderado temprano sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales in vivo

4.8.1.2.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

En el hipocampo (figura 165), el programa de estrés a largo plazo incrementó la actividad de la enzima TH, asociado a una mayor acumulación de DOPA (82%, $p=0.0017$; figura 165A) en comparación al grupo control, aunque no se observó un aumento significativo en el contenido de NA (20%, $p=0.0843$; figura 165B).

En el estriado, se detectó también un incremento significativo de la actividad de TH tras la aplicación del programa de ES 1-20 (figura 166) respecto al grupo control, asociado a una mayor acumulación de DOPA (23%, $p=0.0072$; figura 166A) y acompañado de un aumento de la cantidad de DA (20%, $p=0.0131$; figura 166B), así como de sus metabolitos HVA (15%, $p=0.0101$; figura 166C) y DOPAC (49%, $p=0.0223$; figura 166D).

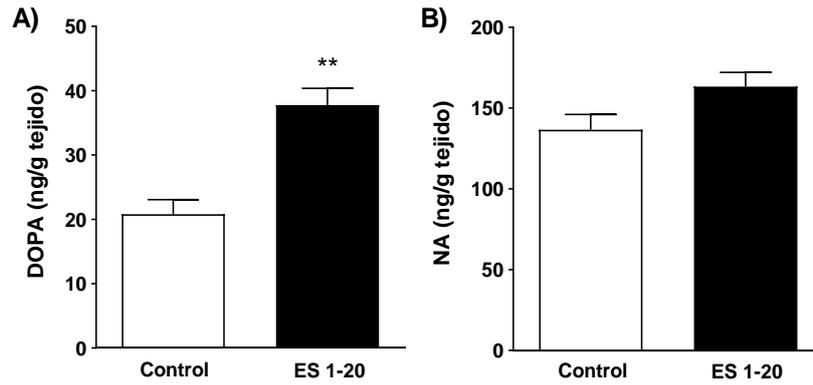


Figura 165. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (tras la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de los animales sometidos a estrés moderado a largo plazo (1-20 meses de edad; ES 1-20, n=4) frente a los animales del grupo control (n=5). ** $p < 0.01$ al comparar con el grupo control (t-test de *Student*).

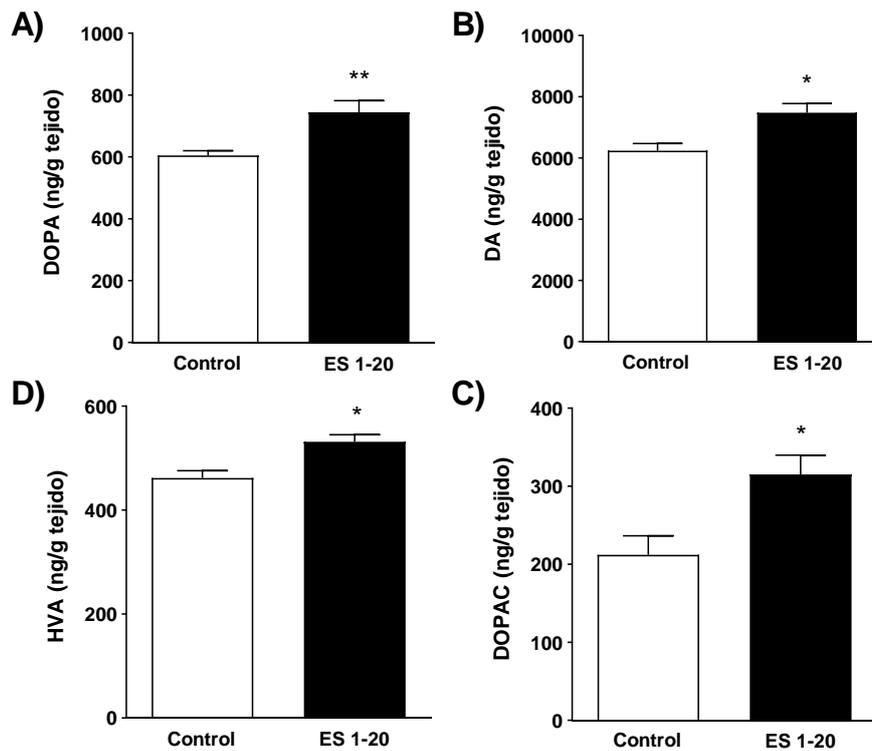


Figura 166. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A) y los niveles de DA (B), así como de sus metabolitos HVA (C) y DOPAC (D), en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales sometidos a estrés moderado a largo plazo (1-20 meses; ES 1-20, n=4) frente a los animales del grupo control (n=5). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ al comparar con el grupo control (t-test de *Student*).

4.8.1.2.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, en el estriado y en la glándula pineal

En el hipocampo, los resultados obtenidos (figura 167) indican que el programa de ES 1-20 no modificó significativamente la acumulación de 5-HTP ($p=0.342$; figura 167A), aunque produjo una reducción significativa de los niveles de 5-HT (25%, $p=0.0041$; figura 167B), sin observarse cambios en los niveles del metabolito 5-HIAA ($p=0.551$; figura 167C).

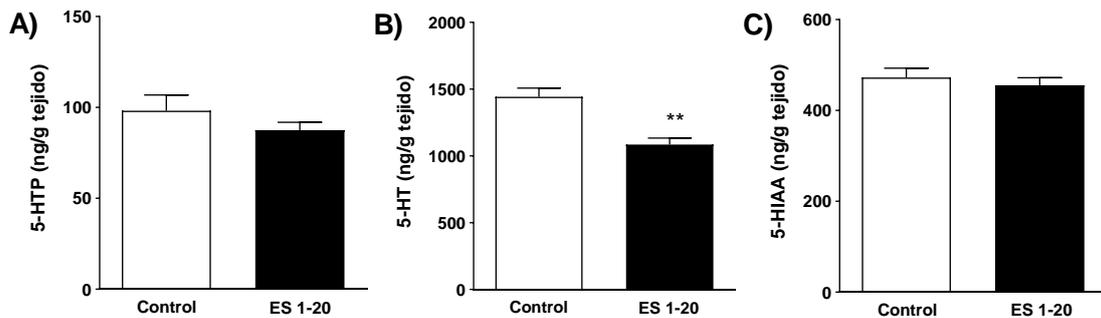


Figura 167. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (tras la inhibición de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A), los niveles de 5-HT (B) y del metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de los animales sometidos a estrés moderado a largo plazo (1-20 meses; ES 1-20, $n=4$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). ** $p<0.01$ en comparación al grupo control (t-test de *Student*).

En el estriado, el estrés no modificó el contenido de 5-HTP ($p=0.3401$; figura 168A), pero redujo significativamente los niveles de 5-HT (18%, $p=0.0228$; figura 168B) y 5-HIAA (23%, $p=0.0329$; figura 168C).

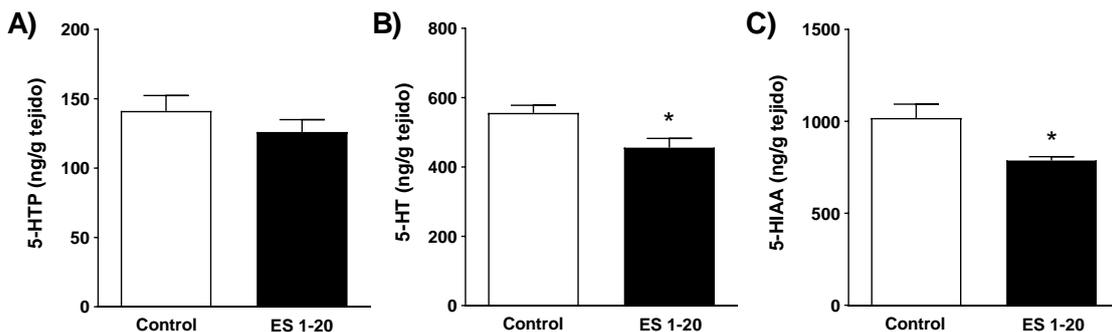


Figura 168. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en tejido fresco (ng/g) del estriado de los animales sometidos a estrés moderado a largo plazo (1-20 meses; ES 1-20, $n=4$) frente a los animales del grupo control ($n=12$). * $p<0.05$ comparando con el grupo control (t-test de *Student*).

Por el contrario, en la glándula pineal (figura 169) se puede apreciar un incremento de la actividad de TPH-1 en el grupo ES 1-20, aumentándose de forma significativa los niveles de 5-HTP (103%, $p=0.0029$; figura 169A), 5-HT (148%, $p=0.0009$; figura 169B) y 5-HIAA (338%,

$p < 0.0001$; figura 169C). Estos resultados muestran una modulación diferente de las dos isoformas de TPH con el estrés.

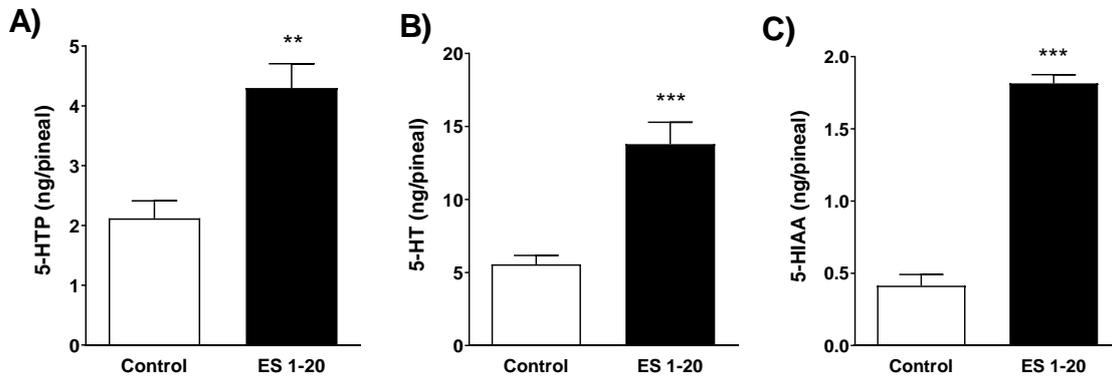


Figura 169. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de los animales sometidos a estrés moderado a largo plazo (1-20 meses; ES 1-20, $n=4$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparación al grupo control (t-test de Student).

4.8.1.3 Efectos del estrés moderado temprano sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo

4.8.1.3.1 Efectos sobre la proteína SIRT1

La expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo (figura 170) se ve significativamente modificada ($F_{(2,14)}=28.36$, $p < 0.0001$). En los animales viejos control se produce una disminución significativa en comparación a los jóvenes (36%, $p < 0.001$). A diferencia, en el grupo ES 1-20 se evidencia un incremento significativo de SIRT1 (40%, $p < 0.01$) respecto a los animales viejos control.

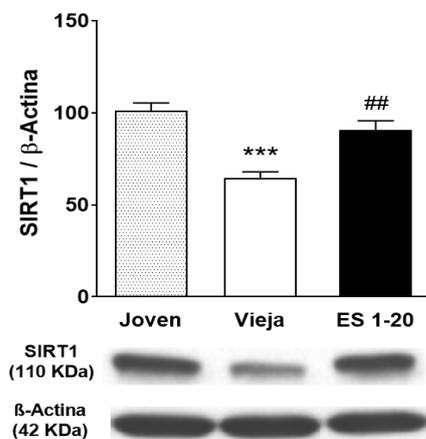


Figura 170. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a estrés moderado desde edades tempranas, ES 1-20, $n=4$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=7$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). *** $p < 0.001$ comparando los valores respecto a los animales jóvenes del grupo control; ** $p < 0.01$ comparando con los animales viejos del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de Bonferroni). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo de los cambios obtenidos en SIRT1, sin cambios en la β -actina (patrón de carga).

4.8.1.3.2 Efectos sobre la proteína NF- κ B total

Los resultados en los niveles de NF- κ B total en el hipocampo (figura 171), con la metodología seguida en este estudio, no muestran diferencias significativas con la edad ni tras la aplicación del estrés ($F_{(2,14)}=0.4287$, $P=0.6586$).

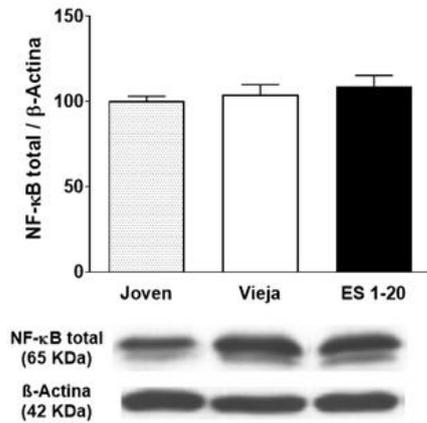


Figura 171. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la expresión de la proteína NF- κ B total (65 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a estrés moderado desde edades tempranas, ES 1-20, $n=4$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=7$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo.

4.8.1.3.3 Efectos sobre la proteína RbAp48/46

La expresión de la proteína RbAp48/46 en el hipocampo (figura 172) se ve modificada por la edad ($F_{(2,14)}=21.20$, $p<0.0001$), pero no por el ES. Los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles, mientras que los animales viejos control muestran una disminución significativa de RbAp48/46 (34%, $p<0.001$), reducción que también se observa en el grupo de animales sometidos a estrés a largo plazo (40%, $p<0.001$).

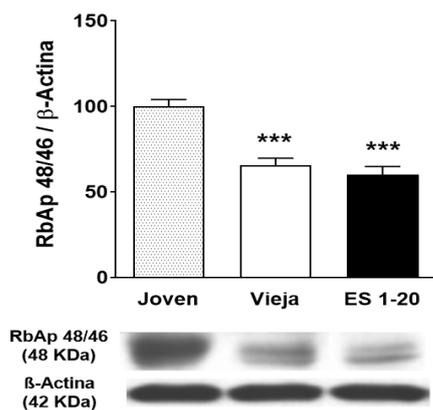


Figura 172. Efecto del estrés moderado a largo plazo sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a estrés moderado desde edades tempranas, ES 1-20, $n=4$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=7$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). *** $p<0.001$ comparando los valores de los diferentes grupos respecto a los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la figura.

4.8.2 Efectos del programa de estrés moderado aplicado desde 7 meses de edad hasta los 20 meses de vida (estrés moderado intermedio)

La aplicación del programa de estrés moderado impredecible a partir de edades adultas (desde 7 meses de edad hasta los 20 meses de vida; ES 7-20) produce cambios significativos de

tipo conductual y neuroquímico, con modificaciones en el peso corporal de los animales. Así, el peso (figura 173) está condicionado por la edad de los animales ($F_{(13,301)}=8.61$, $p<0.0001$) y por el tratamiento ($F_{(1,301)}=62.5$, $p<0.0001$), pero no por la interacción ($F_{(13,301)}=0.34$, $p=0.9851$).

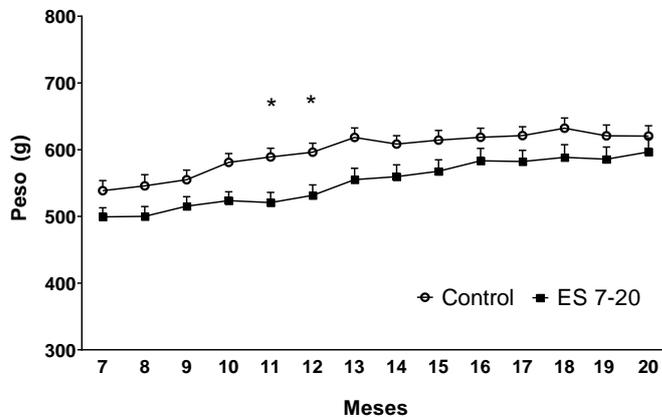


Figura 173. Efecto del estrés moderado aplicado a edades adultas sobre el peso corporal. Los puntos representan el promedio \pm error estándar del peso (g) de los animales sometidos a estrés moderado (ES 7-20, $n=12$) a medio plazo (desde 7 meses de edad hasta los 20 meses) frente al grupo control ($n=12$). * $p<0.05$ comparando ambos grupos (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

4.8.2.1 Efectos conductuales producidos por el programa de estrés moderado intermedio

4.8.2.1.1 Memoria de trabajo espacial y aprendizaje visoespacial

En el test del laberinto radial (figura 174), la aplicación del ES 7-20 modifica la ejecución del test en comparación al grupo control. El tiempo requerido para completar la prueba (figura 174A) se ve significativamente influenciado por el tratamiento ($F_{(1,301)}=15.8$, $p<0.0001$) y por la duración ($F_{(13,301)}=2.19$, $p=0.0099$), pero no por su interacción ($F_{(13,301)}=0.590$, $p=0.8621$). Los animales sometidos a estrés moderado suelen realizar el test en menos tiempo en comparación al grupo control; sin embargo, el test de *Bonferroni* no detectó diferencias entre ambos grupos. En cuanto a los errores realizados (figura 174B), también se ven condicionados por el tratamiento ($F_{(1,301)}=43.6$, $p<0.0001$) y la duración ($F_{(13,301)}=3.28$, $p=0.0001$), aunque no por su interacción ($F_{(13,301)}=0.769$, $p=0.6932$). De esta forma, el ES disminuyó los errores cometidos a partir de los 17 meses de edad (50%, $p<0.01$) hasta el final del tratamiento (53%, $p<0.01$) en comparación al grupo control. Finalmente, la distancia recorrida (figura 174C) se ve condicionada por el tratamiento ($F_{(1,301)}=5.24$, $p=0.0227$), pero no está influenciada por la duración ($F_{(13,301)}=1.11$, $p=0.3529$) ni por su interacción ($F_{(13,301)}=1.44$, $p=0.142$). Los animales sometidos a ES 7-20 no siguen una pauta fija, con variaciones en función del mes de estudio (recorriendo más o menos distancia en comparación al grupo control); sin embargo, el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas.

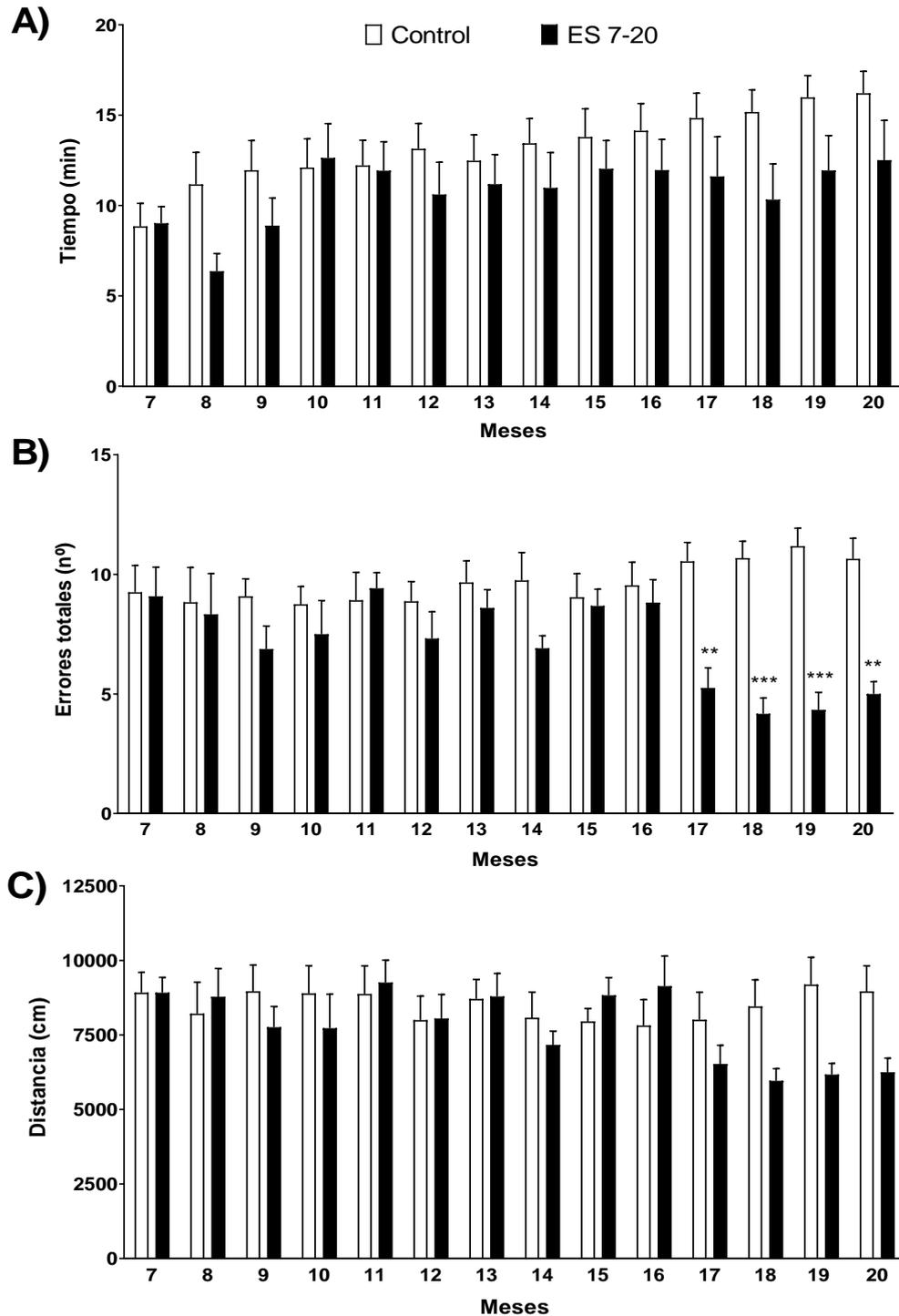


Figura 174. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad de los animales sobre la memoria de trabajo espacial mediante el test del laberinto radial. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo necesario para completar la prueba (A), los errores cometidos (B) y la distancia recorrida (C) de los animales sometidos a estrés moderado desde 7 meses de edad hasta los 20 meses (ES 7-20, n=12) frente a los animales del grupo control (n=12). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ al comparar con el grupo control (ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

La capacidad de aprendizaje visoespacial de los animales sometidos a ES, analizada a los 12 y 19 meses de edad, no difiere significativamente de la de los animales control en la latencia y los errores cometidos, aunque sí en la estrategia seguida. A a 12 meses de edad, la latencia (figura 175A) está significativamente influenciada por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=8.49$, $p<0.0001$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.0863$, $p=0.7698$) ni su interacción ($F_{(3,64)}=0.243$, $p=0.8660$). Los errores cometidos (figura 175B) se ven condicionados por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=5.12$, $p=0.0031$), aunque no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.274$, $p=0.6024$) ni su interacción ($F_{(3,64)}=0.559$, $p=0.6438$). El test de *Bonferroni* para la latencia y los errores no detectó diferencias significativas entre grupos de animales. Además, la estrategia seguida para localizar el *target* en el grupo control fue la estrategia seriada seguida por la aleatoria. Sin embargo, en los animales sometidos a ES una mayor proporción de animales siguió la estrategia aleatoria (figura 175C).

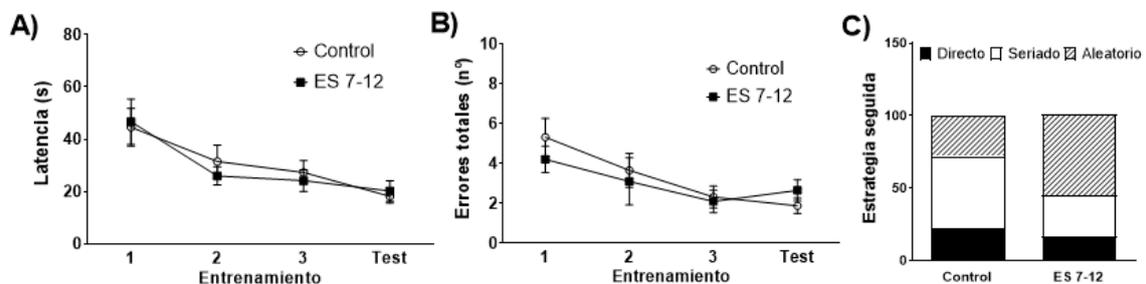


Figura 175. Efecto del estrés moderado desde los 7 meses de edad sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de Barnes a los 12 meses de edad. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de los la latencia (A) y los errores cometidos (B) a lo largo del test de Barnes de los animales sometidos a estrés moderado desde 7 hasta los 12 meses de edad (ES 7-12, $n=9$) frente a los animales del grupo control ($n=9$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de *Bonferroni*).

A los 19 meses, la latencia (figura 176A) está significativamente influenciada por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=9.82$, $p<0.0001$), pero no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.0126$, $p=0.911$) ni su interacción ($F_{(3,64)}=1.83$, $p=0.1514$). Los errores realizados (figura 176B) también se ven condicionados por el entrenamiento ($F_{(3,64)}=3.45$, $p=0.0217$), aunque no por el tratamiento ($F_{(1,64)}=0.0894$, $p=0.7659$) ni por su interacción ($F_{(3,64)}=1.82$, $p=0.1527$). Además, las principales estrategias seguidas para localizar el *target* en ambos grupos fueron la estrategia seriada y la aleatoria (figura 176C).

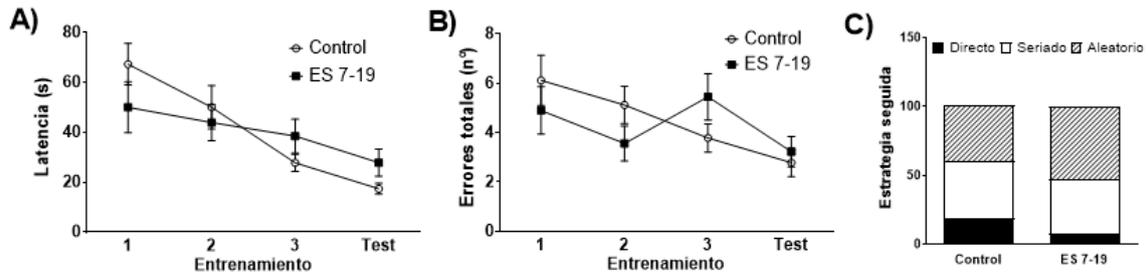


Figura 176. Efecto del estrés moderado a medio plazo sobre la capacidad de aprendizaje visoespacial mediante el test del laberinto de Barnes a los 19 meses de edad. Los puntos representan el promedio \pm error estándar de la latencia (A) y los errores cometidos (B) durante el test de Barnes de los animales sometidos a estrés moderado desde 7 meses de edad hasta los 19 meses (ES 7-19, $n=9$) frente al grupo control ($n=9$). Las barras representan el promedio de la estrategia seguida en % respecto el total sumando los 3 entrenamientos y el test (C). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados en la latencia y los errores cometidos (A, B: ANOVA de dos factores, seguido por el test de Bonferroni).

4.8.2.1.2 Memoria episódica

En la fase de familiarización (figura 177A), los animales de ambos grupos no presentan una preferencia por ninguno de los objetos situados en el campo abierto. Además, los animales del grupo ES 7-20, en general, tienden a explorar durante menos tiempo los objetos en comparación al control.

En la fase de test (figura 177B), ANOVA de tres factores indicó que los resultados están condicionados por el objeto ($F_{(1,580)}=97.389$, $p<0.0001$), por el tratamiento ($F_{(1,580)}=63.860$, $p<0.0001$) y por la duración del estudio ($F_{(13,580)}=4.392$, $p<0.0001$). Asimismo, se detectaron diferencias en la interacción entre los parámetros tratamiento x duración ($F_{(13,580)}=1.862$, $p=0.0317$) y tratamiento x objeto ($F_{(1,580)}=11.590$, $p=0.0007$). Los animales del grupo ES 7-20 tienden a discriminar peor el objeto nuevo; por ejemplo, a los 20 meses los animales sometidos a estrés exploraron un 24% menos el objeto nuevo y un 20% más el familiar que el grupo control. Así, en el grupo ES 7-20 a partir de los 8 meses ya no se detectaron diferencias significativas entre el objeto nuevo y el familiar, mientras que en los controles se detectan diferencias hasta los 11 meses de edad.

En relación a lo comentado anteriormente, los resultados del tiempo de exploración del objeto nuevo menos el objeto familiar (figura 178) se ven influidos por el tratamiento ($F_{(1,301)}=20.2$, $p<0.0001$) y por la duración ($F_{(13,301)}=2.35$, $p=0.0054$), pero no por su interacción ($F_{(13,301)}=0.256$, $p=0.9962$). El ES disminuyó el tiempo que los animales exploraban el objeto nuevo menos el familiar a partir de los 8 meses de edad hasta los 20 meses en comparación al grupo control, aunque el test de Bonferroni no detectó diferencias significativas.

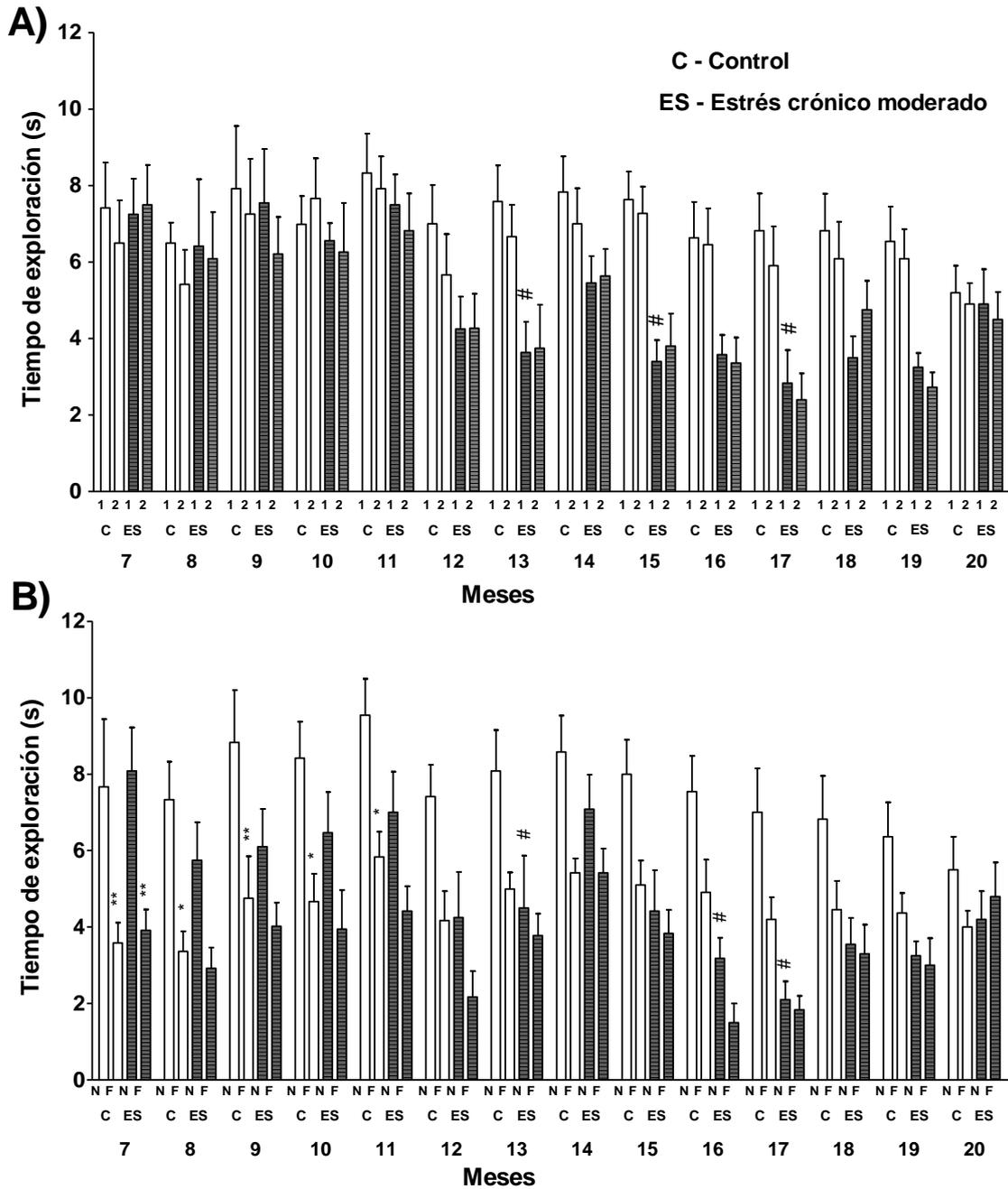


Figura 177. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad de los animales sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo de exploración total de cada uno de los objetos en la fase de familiarización (A: 1, objeto 1; 2, objeto 2) y la fase de test (B: N, objeto nuevo; F, objeto familiar) de los animales sometidos a estrés moderado desde los 7 hasta los 20 meses de edad (ES 7-20, n=12) frente a los animales del grupo control (C, n=12). *p<0.05, **p<0.01 comparando el tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el objeto familiar; #p<0.05 comparando los valores respecto a su grupo control (ANOVA de tres factores, seguido por el test de *Fisher PLSD*).

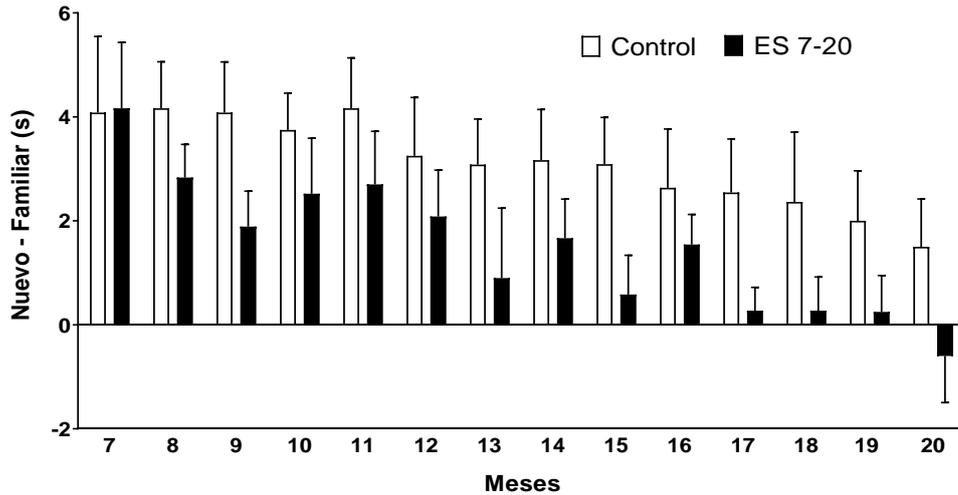


Figura 178. Efecto del estrés moderado desde los 7 meses de edad sobre la memoria episódica mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la diferencia del tiempo de exploración entre el objeto nuevo y el familiar en la fase de test de los animales sometidos a estrés moderado desde 7 hasta 20 meses de edad (ES 7-20, n=12) frente a los animales del grupo control (n=12). ANOVA de dos factores seguido por el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre ambos grupos.

4.8.2.1.3 Coordinación motora

La coordinación motora, analizada mediante el test del *rotarod*, no se ve modificada tras la aplicación del ES desde edades adultas (figura 179), no observándose diferencias significativas en el tratamiento ($F_{(1,301)}=0.396$, $p=0.5299$), duración del estudio ($F_{(13,301)}=1.21$, $p=0.2682$) o su interacción ($F_{(13,301)}=0.218$, $p=0.9984$).

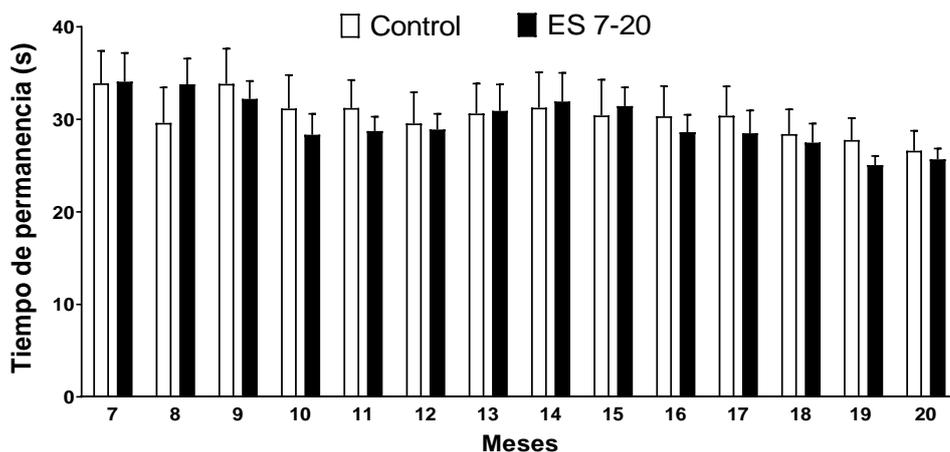


Figura 179. Efecto del estrés moderado desde los 7 meses de edad sobre la coordinación motora mediante el test del rotarod. Las barras representan el promedio \pm error estándar del tiempo que permanecen en la rueda giratoria antes de caer de los animales sometidos a estrés moderado desde 7 meses de edad hasta los 20 meses (ES 7-20, n=12) frente a los animales del grupo control (n=12). ANOVA de dos factores seguido por el test de *Bonferroni* no detectó diferencias significativas entre ambos grupos.

4.8.2.2 Efectos del estrés moderado intermedio sobre las actividades tirosina hidroxilasa (síntesis de NA y DA) y triptófano hidroxilasa (síntesis de 5-HT) cerebrales *in vivo*.

4.8.2.2.1 Efectos sobre la actividad de la vía de las catecolaminas en el hipocampo y en el estriado

En el hipocampo (figura 180), el programa de ES aplicado a partir de los 7 meses incrementó significativamente la actividad de la enzima TH, con una mayor acumulación de DOPA (61%, $p=0.0044$; figura 180A) en comparación al grupo control. En cuanto al contenido de NA (figura 180B), en el grupo ES 7-20 se observa un ligero incremento de los niveles de NA, aunque no de forma significativa (15%, $p=0.071$).

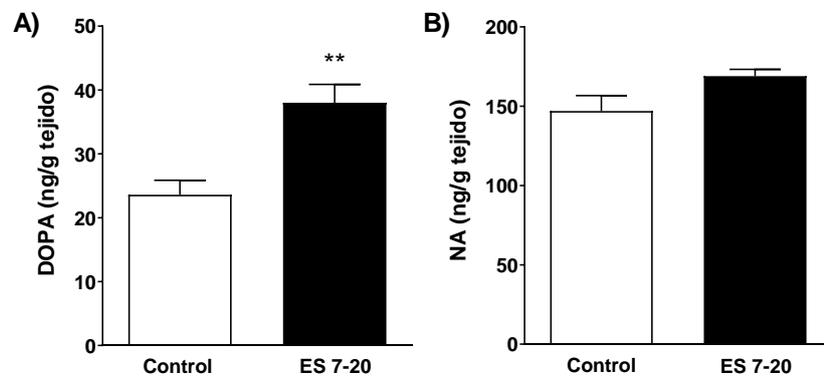


Figura 180. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TH en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (tras la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A) y los niveles de NA (B) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de los animales sometidos a estrés moderado desde 7 meses de edad hasta los 20 meses (ES 7-20, $n=5$) frente a los animales del grupo control ($n=5$). ** $p<0.01$ comparando con el grupo control (t-test de *Student*).

En el estriado, se observaron también cambios neuroquímicos tras la aplicación del estrés desde edades adultas (figura 181). Se produjeron aumentos en la actividad de la TH, cuantificada a partir de la acumulación de DOPA (13%, $p=0.05$; figura 181A), e incrementos de DA disponible (14%, $p=0.0013$; figura 181B) y de los metabolitos HVA (16%, $p=0.05$; figura 181C) y DOPAC (21%, $p=0.042$; figura 181D).

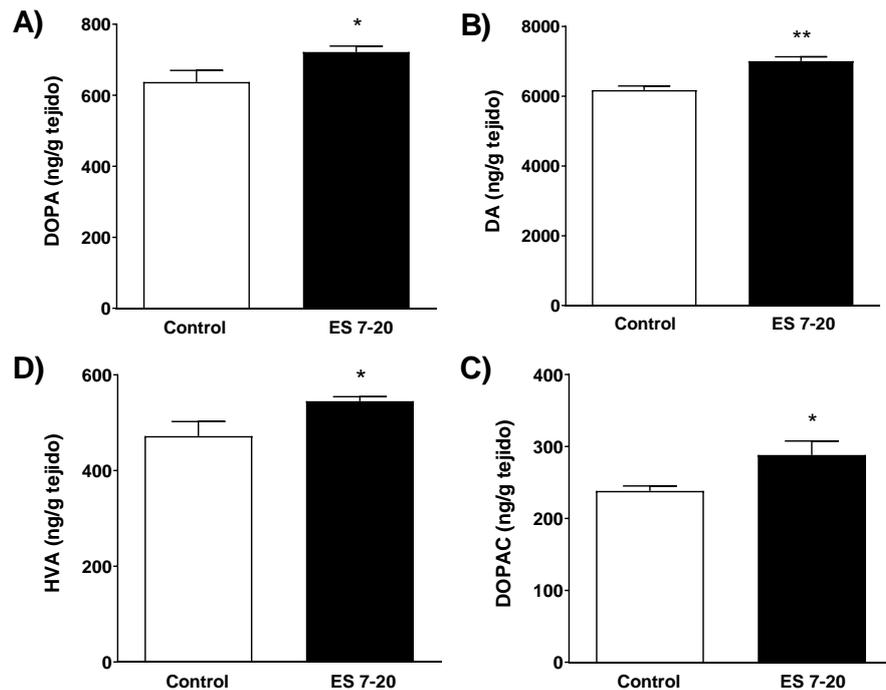


Figura 181. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TH en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de DOPA (A) y los niveles de DA (B), así como de sus metabolitos HVA (C) y DOPAC (D), en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales sometidos a estrés moderado desde 7 hasta los 20 meses de edad (ES 7-20, n=5) frente a los animales del grupo control (n=5). * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$ comparando con el grupo control (t-test de *Student*).

4.8.2.2.2 Efectos sobre la actividad de la vía de las indolaminas en el hipocampo, en el estriado y en la glándula pineal

En el hipocampo (figura 182), la aplicación de estrés a partir de los 7 meses modifica la actividad de la enzima TPH-2. De este modo, en el grupo ES 7-20 se observó una ligera reducción, aunque no significativa, de los niveles de 5-HTP (14%, $p=0.0935$; figura 182A), acompañado por una disminución significativa de 5-HT (25%, $p=0.0007$; figura 182B), sin cambios en el metabolito 5-HIAA ($p=0.2586$; figura 182C).

En el estriado, se observó una disminución de la actividad de la TPH-2 en el grupo ES 7-20, asociado a una reducción de 5-HTP (28%, $p=0.002$; figura 183A) y del metabolito 5-HIAA (27%, $p=0.0013$; figura 183C) en comparación al grupo control, aunque dicha disminución no fue significativa en el caso de 5-HT (8%, $p=0.1695$; figura 183B).

Por el contrario, en la glándula pineal (figura 184) en el grupo ES 7-20 se pudo apreciar un incremento, aunque no significativo, de los niveles de 5-HTP (41%, $p=0.131$; figura 184A), con aumentos significativos de 5-HT (169%, $p=0.0002$; figura 184B) y 5-HIAA (143%, $p=0.0049$; figura 184C) en comparación al control. Estos resultados muestran una modulación diferente de las dos isoformas de TPH con el estrés.

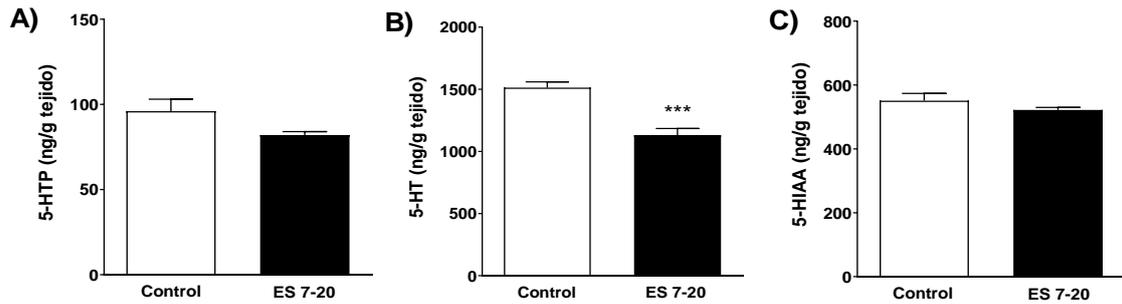


Figura 182. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (tras la inhibición *in vivo* de la descarboxilación con NSD-1015 durante 30 min) (A), los niveles de 5-HT (B) y el metabolito 5-HIAA (C) en extractos procedentes del hipocampo (ng/g) de los animales sometidos a estrés moderado desde 7 meses de edad hasta los 20 meses (ES 7-20, n=5) frente al grupo control (n=5). *** $p < 0.001$ comparando con el grupo control (t-test de *Student*).

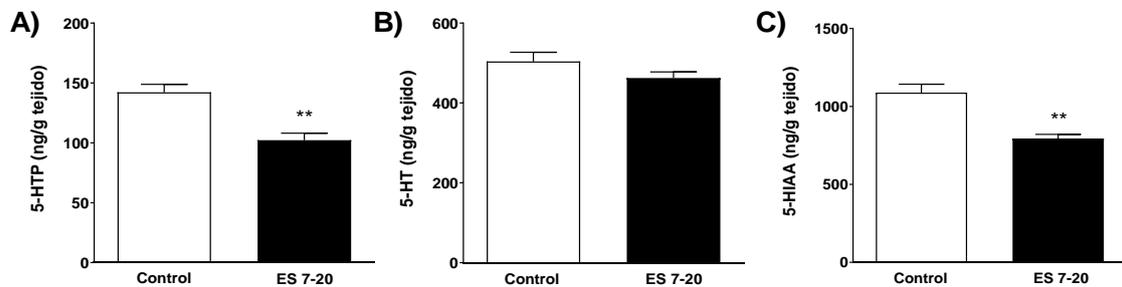


Figura 183. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-2 en el estriado de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B), así como del metabolito 5-HIAA (C), en extractos procedentes del estriado (ng/g) de los animales sometidos a estrés moderado desde 7 hasta los 20 meses de edad (ES 7-20, n=5) frente a los animales del grupo control (n=5). ** $p < 0.01$ comparando con el grupo control (t-test de *Student*).

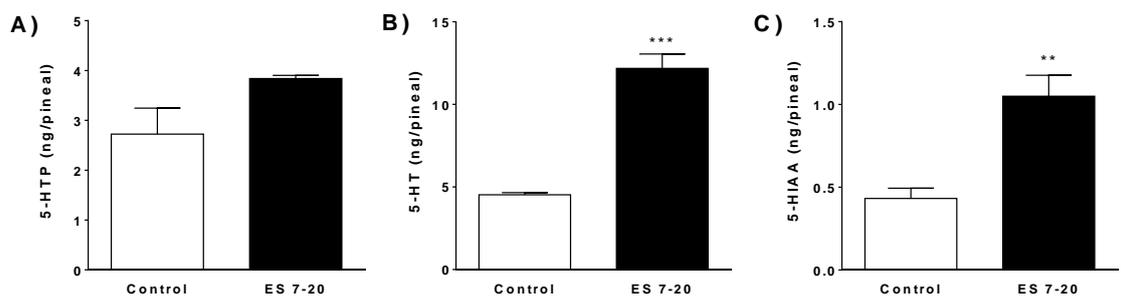


Figura 184. Efecto del estrés moderado desde los 7 meses de edad sobre la actividad de la enzima TPH-1 en la glándula pineal de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar de la acumulación de 5-HTP (A), los niveles de 5-HT (B) y del metabolito 5-HIAA (C) en extracto de glándula pineal (ng/pineal) de animales sometidos a estrés moderado desde 7 hasta los 20 meses de edad (ES 7-20, n=4) frente a los animales del grupo control (n=4). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparando con el grupo control (t-test de *Student*).

4.8.2.3 Efectos del estrés moderado intermedio sobre las proteínas SIRT1, NF- κ B y RbAp48/46 en el hipocampo

4.8.2.3.1 Efectos sobre la proteína SIRT1

La expresión de la proteína SIRT1 en el hipocampo (figura 185) se ve significativamente reducida con la edad ($F_{(2,19)}=17.32$, $p<0.0001$), disminución que no se ve modificada tras la aplicación del ES. De este modo, los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles, mientras que dichos valores se ven significativamente reducidos en los animales viejos del grupo control (32%, $p<0.001$) y en los animales del grupo ES7-20 (24%, $p<0.01$).

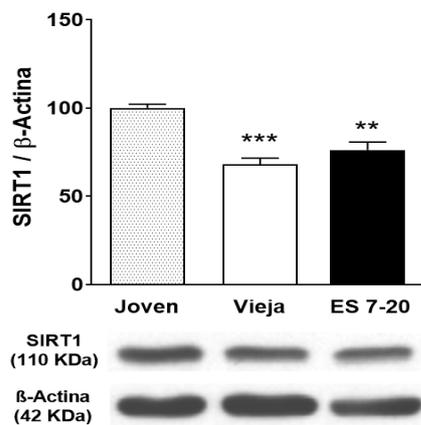


Figura 185. Efecto del estrés moderado desde los 7 meses de edad sobre la expresión de la proteína SIRT1 (110 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a estrés moderado a partir de edades intermedias, ES 7-20, $n=8$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=8$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ comparando los valores de los diferentes grupos respecto a los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo de los cambios obtenidos en SIRT1, sin cambios en la β -actina (patrón de carga).

4.8.2.3.2 Efectos sobre la proteína NF- κ B total

Los resultados de NF- κ B total (figura 186) obtenidos en el hipocampo no muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F_{(2,19)}=1.959$, $p=0.1685$), con el anticuerpo utilizado en este estudio.

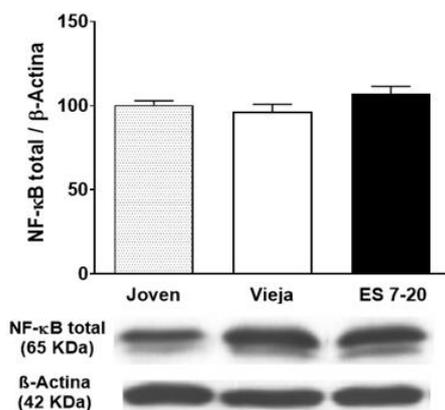


Figura 186. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad de los animales sobre la expresión de la proteína NF- κ B total (65 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a estrés moderado a partir de edades intermedias, ES 7-20, $n=8$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=8$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). No se detectan diferencias significativas entre los grupos analizados (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). En la parte inferior de la figura se muestra un inmunoblot representativo.

4.8.2.3.3 Efectos sobre la proteína RbAp48/46

La expresión de la proteína RbAp48/46 en el hipocampo (figura 187) se ve modificada por la edad ($F_{(2,19)}=35.21$, $p<0.0001$), pero no por el estrés. Los animales jóvenes son los que presentan mayores niveles de esta proteína, mientras que los viejos muestran una reducción significativa de RbAp48/46 (grupo control viejo: 41%, $p<0.001$; grupo ES 7-20: 42%, $p<0.001$).

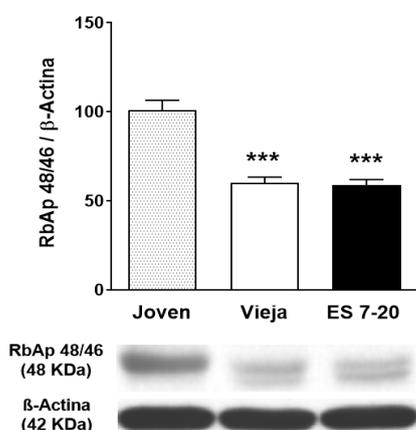


Figura 187. Efecto del estrés moderado desde 7 meses de edad sobre la expresión de la proteína RbAp48/46 (48 kDa) en hipocampo de ratas viejas (20 meses). Las barras representan el promedio \pm error estándar por grupo (animales sometidos a estrés moderado a partir de edades intermedias, ES 7-20, $n=8$; animales viejos del grupo control, Vieja, $n=8$) de experimentos realizados por triplicado y se expresan como porcentaje respecto a las ratas jóvenes ($n=6$). *** $p<0.001$ al comparar con los animales jóvenes del grupo control (ANOVA de un factor, seguido por el test de *Bonferroni*). Inmunoblot representativo en la parte inferior de la figura.

4.9 Tabla resumen de los resultados globales obtenidos

En la tabla 1 se ha indicado si ha habido una mejora (\uparrow), si no ha habido diferencias ($=$) o si se ha producido un deterioro (\downarrow) en las diferentes estrategias aplicadas respecto a su control de forma general, por lo que se han añadido las variaciones globales observadas en cada prueba (% respecto al control). Por ejemplo, en el laberinto radial se ha realizado el promedio del tiempo y errores cometidos durante la prueba; en el test de reconocimiento de objeto nuevo, la diferencia entre el tiempo de exploración del objeto nuevo menos el familiar; en el test del *rotarod*, el tiempo de permanencia sobre la rueda giratoria; mientras que en el laberinto de *Barnes* no se ha incluido ningún % ya que se miró globalmente si había diferencias en alguno de los parámetros: latencia, errores cometidos o estrategias seguidas durante los entrenamientos y el test. En cuanto a las vías de los transmisores monoaminérgicos, los porcentajes se corresponden a medidas globales de los niveles del precursor (DOPA o 5-HTP) y la monoamina correspondiente (NA, DA o 5-HT); y en la SIRT1 hace referencia al nivel de expresión hipocampal.

En resumen, los antioxidantes α -tocoferol, catequina, *poliphenon 60* y la dieta rica en antioxidantes producen efectos positivos en todos los parámetros cognitivos y neuroquímicos. Estos datos parecen indicar que el efecto neuroprotector de la dieta rica en antioxidantes no es exclusivo de un solo compuesto. El resveratrol, mimético de la restricción calórica, induce mejoras similares a otros antioxidantes, a excepción de SIRT1 que podría ser debido a que los animales no eran viejos y, por tanto, la disminución de SIRT1 basal era menos marcada. Tras la

restricción calórica se observa una disminución de la serotonina, que podría interpretarse como un signo de estrés.

El ejercicio físico induce mejoras cognitivas y neuroquímicas similares a las obtenidas por los antioxidantes; a diferencia de éstos, el ejercicio también incrementa la coordinación motora. Cuando además del ejercicio se administró catequina se obtuvo un mayor efecto que la aplicación por separado de estas estrategias sobre los niveles de monoaminas, pero no sobre las habilidades cognitivas y motoras.

El enriquecimiento ambiental sigue una línea similar al ejercicio, con excepción de SIRT1 que no se ve afectada. Asimismo, es más eficiente cuanto antes se inicie y, en cualquier caso, los valores de mejora son ligeramente inferiores al ejercicio. La acción conjunta del enriquecimiento y una dieta rica en antioxidantes produjo un efecto sumatorio, sobre todo a nivel de las monoaminas; asimismo, se incrementó SIRT1 tras la aplicación conjunta del enriquecimiento y la dieta.

Finalmente, el tipo de estrés crónico aplicado tiene un efecto negativo en general sobre las habilidades cognitivas. Sin embargo, a nivel neuroquímico, incrementa las vías NA y DA (relacionadas con atención y motivación) y disminuye la 5-HT (signo de estrés). Sorprendentemente, el estrés aplicado a edades tempranas también incrementa SIRT1.

Tabla 1. Comparación de los principales resultados obtenidos en cada una de las estrategias aplicadas frente al deterioro cognitivo asociado a la edad en ratas, incluyendo parámetros comportamentales y neuroquímicos.

Tratamientos	Laberinto radial	Test de Barnes	Objeto nuevo	Rotarod	Vía NA hipocampo	Vía DA estriado	Vía 5-HT hipocampo	Vía 5-HT estriado	SIRT1
α -tocoferol(20 mg/kg, 28 días) - Inicio 18 meses	=	/	=	=	↑ 141	↑ 51	↑ 105	↑ 30	=
α -tocoferol(40-60 mg/kg, 28 días + 28 días) - Inicio 18 meses	↑ 47	↑	↑ 65	↑ 44	↑ 155	↑ 97	↑ 128	↑ 55	↑ 54
Catequina (20-40 mg/kg, 35 días) - Inicio 18 meses	↑ 43	↑	↑ 300	=	↑ 93	↑ 29	↑ 33	↑ 58	↑ 59
Poliphenon 60 (20-40 mg/kg, 35 días) - Inicio 18 meses	↑ 39	↑	↑ 322	=	↑ 70	↑ 32	↑ 44	↑ 58	↑ 61
Dieta rica en antioxidantes (6 meses) - Inicio 14 meses	↑ 38	↑	↑ 161	=	↑ 47	↑ 23	↑ 60	↑ 107	↑ 22
Ejercicio físico moderado (35 días) - Inicio 18 meses	↑ 64	↑	↑ 253	↑ 105	↑ 90	↑ 37	↑ 70	↑ 76	↑ 32
Ejercicio físico moderado (35 días) + Catequina (20-40 mg/kg, 35 días) - Inicio 18 meses	↑ 67	↑	↑ 287	↑ 99	↑ 132	↑ 57	↑ 104	↑ 108	↑ 26
Resveratrol(20 mg/kg, 15 días) - Inicio 10 meses	↑ 36	/	↑ 58	=	↑ 34	↑ 17	↑ 32	↑ 44	=
Restricción calórica (40 días) - Inicio 10 meses	↑ 43	/	= 36	↑ 58	↑ 44	↑ 24	↓ 13	↓ 22	=
Enriquecimiento ambiental (1-20 meses) - Inicio 1 mes	↑ 39	=	↑ 196	↑*	↑ 73	↑ 64	↑ 37	↑ 88	=
Enriquecimiento ambiental (7-20 meses) - Inicio 7 meses	↑ 35	=	↑ 230	↑*	↑ 46	↑ 32	↑ 34	↑ 70	=
Enriquecimiento ambiental (18.5-20 meses) - Inicio 18 meses	=	=	=	=	↑ 11	↑ 10	=	=	=
Enriquecimiento ambiental (1-20 meses; inicio 1 mes) + Dieta antioxidante (inicio 14 meses)	↑ 60	↑	↑ 324	=	↑ 111	↑ 75	↑ 80	↑ 152	↑ 22
Estrés moderado (1-20 meses) - Inicio 1 mes	=	↓	↓ 143	=	↑ 51	↑ 22	↓ 18	↓ 15	↑ 40
Estrés moderado (7-20 meses) - Inicio 7 meses	↑ 37	↓	↓ 140	=	↑ 38	↑ 14	↓ 20	↓ 18	=

↑ (mejora), ↓ (deterioro), = (no cambio), ↑* (observaciones subjetivas de mejora), / (test no realizado). Los valores se corresponden al % global de los cambios observados respecto al control.

5. DISCUSIÓN

Las poblaciones de todo el mundo están envejeciendo rápidamente debido al incremento de la esperanza de vida en el último siglo gracias a los avances médicos y tecnológicos, cambios en los hábitos nutricionales y estilos de vida, mejoras en la educación, así como el acceso de la población a los servicios sanitarios. Conseguir una buena salud mental es esencial para mantener una vida independiente y autónoma (World Health Organization, 2002; 2012); ello supone un desafío social urgente, sobre todo considerando que el mayor riesgo de deterioro cognitivo y demencia va asociado al envejecimiento (Prince et al., 2013; Sachs et al., 2011; World Health Organization, 2012).

Desde un punto de vista biológico, el envejecimiento es la consecuencia de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, lo que lleva a un progresivo deterioro en diferentes funciones y sistemas, incluyendo el descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, un aumento del riesgo de enfermedad y finalmente la muerte (Acuña-Castroviejo et al., 2001; López-Otín et al., 2013; Mandavilli et al., 2002; Shokolenko et al., 2014; Viña et al., 2007). Entre las causas del envejecimiento podemos destacar la acumulación del daño oxidativo (Harman, 1956) en moléculas esenciales, tales como proteínas, lípidos y ADN, que conducen a la muerte celular (Mariani et al., 2005; Scheibye-Knudsen et al., 2015) alterando la función de la mayoría de los órganos vitales (Dai et al., 2014). Cabe remarcar que el cerebro es uno de los órganos más sensibles al daño oxidativo debido a que, a pesar de su elevado consumo de oxígeno, no presenta un sistema antioxidante adicional u otros mecanismos de defensa en comparación a otros órganos (Freeman y Keller, 2012; Kedar, 2003; Mariani et al., 2005; Reiter, 1998; Yankner et al., 2008). Es por ello que los tratamientos con antioxidantes o el uso de dietas ricas en antioxidantes podrían ayudar a paliar o retrasar los efectos adversos del envejecimiento en el sistema nervioso (Ames et al., 1993; Corredor, 2006; Joseph et al., 2009; Lau et al., 2005; Liu et al., 2002; Murphy et al., 2014; Park et al., 2009). Por otra parte, el entorno de un individuo ejerce un papel clave en el proceso de envejecimiento cerebral y en el desarrollo de enfermedades relacionadas (Hung et al., 2010; Leggio et al., 2005; Mora et al., 2007; Nithianantharajah y Hannan, 2009; Van Praag et al., 2000). Por ello, terapias basadas en el enriquecimiento ambiental y el ejercicio pueden contribuir a la plasticidad cerebral (Leggio et al., 2005; Mohammed et al., 2002; Mora, 2013; Nithianantharajah y Hannan, 2006), paliando el deterioro cognitivo y motor asociado a la edad.

Aunque las alteraciones de la salud de las personas mayores pueden ser genéticas, los entornos físicos y sociales revisten gran importancia (World Health Organization, 2002). Así, el principal objetivo de esta tesis doctoral fue el estudio de diferentes tratamientos y terapias proactivas para prevenir o retrasar el deterioro cognitivo y motor asociado a la edad, así como favorecer el envejecimiento saludable. Para ello, se analizó el efecto de dichos tratamientos sobre las habilidades cognitivas y motoras de ratas de edad avanzada, el metabolismo de

neurotransmisores monoaminérgicos y los niveles de varias proteínas relacionadas con el envejecimiento.

5.1 Efectos del envejecimiento

El proceso de envejecimiento está asociado al deterioro de diversas habilidades cognitivas y motoras, así como la modificación de la actividad de numerosas rutas intracelulares relacionadas con estas funciones. Los resultados de esta tesis constatan los deterioros asociados a la edad observados en estudios anteriores (Diggles-Buckles, 1993; Driscoll y Sutherland, 2005; Esteban et al., 2010a, b; McDowd et al., 1991; Park et al., 2002; Park y Reuter-Lorenz, 2009; Salthouse, 1988; Sarubbo et al., 2015, 2018; Serrien et al., 2000; Umegaki et al., 2008; Welford, 1984; Zacks et al., 2000). Además, es importante remarcar que en los animales viejos dichos deterioros se han observado en todos los grupos control.

En esta investigación, las ratas utilizadas en los experimentos se han considerado jóvenes desde 1 mes hasta los 5 meses de vida, adultas hasta los 18 meses (momento en el que pierden la capacidad reproductora y comienza la vejez) y viejas o de edad avanzada a partir de los 18 meses. Equiparando a humanos, se considera que 1 mes de vida en una rata sería comparable a unos 3 años en humanos (Sengupta, 2012, 2013). En base a esta categorización, nuestros datos muestran que los animales de edad avanzada presentan un empeoramiento en la memoria de trabajo espacial (test del laberinto radial, dependiente de la función hipocampal y ampliamente usado en roedores) (Bernstein et al., 1985; Lebrun et al., 1990; Lohmann y Riepe, 2007; Takahashi et al., 2009) en comparación a los animales jóvenes, ya que tardan más tiempo y cometen más errores, con el consiguiente aumento de la distancia recorrida durante la ejecución de la prueba. La memoria de trabajo hace referencia a la capacidad del cerebro para codificar, mantener y manipular la información en un plazo de tiempo corto (Cowan, 2008; Klingberg, 2010). Así, la disminución en la memoria de trabajo observada durante el proceso de envejecimiento (Bopp y Verhaeghen, 2005; Borella et al., 2008; Cansino et al., 2018; Daselaar y Cabeza, 2013; Esteban et al., 2010a, b; Payer et al., 2006; Ramis et al., 2013, 2016, 2020, 2021a, b; Sarubbo et al., 2015, 2018) es considerado uno de los principales factores que contribuyen a trastornos cognitivos y neuropsiquiátricos (Bizon et al., 2012; Borella et al., 2008; Park et al., 2002). Por lo tanto, no es de extrañar que numerosas investigaciones se hayan centrado en intentar mejorar la memoria de trabajo a lo largo de la vida (Morrison y Chein, 2011; Shipstead et al., 2010; Takeuchi et al., 2010). Asimismo, los resultados obtenidos de la memoria episódica en el test de reconocimiento de objeto nuevo, basado en la habilidad natural de los roedores para explorar la novedad (Antunes y Biala, 2012; Bevins y Besheer, 2006), muestran que los animales de edad avanzada discriminan peor el objeto nuevo del familiar en comparación a los animales jóvenes, con lo que se pudo comprobar que la memoria episódica

también se ve afectada por la edad (Ramis et al., 2013, 2016, 2020, 2021a, b; Sarubbo et al., 2015, 2018). Este hecho puede relacionarse con la menor actividad motora mostrada en animales de edad avanzada frente a un ambiente novedoso, y asociarse a la bradiquinesia (lentitud de movimiento) observada en humanos, especialmente en los movimientos complejos (Huang et al., 1995; Nyakas et al., 1992; Yurek et al., 1998). En el test de *Barnes*, utilizado para analizar el aprendizaje visoespacial (Deacon y Rawlins, 2002; Harrison et al., 2006, 2009; Patil et al., 2009; Pompl et al., 1999; Ramis et al., 2016, 2021a, b; Sarubbo et al., 2018), los animales viejos también ejecutaron peor la prueba al tardar más tiempo en localizar la caja de escape y cometer más errores. Además, la estrategia más utilizada fue la aleatoria (en la que el animal no sigue ningún patrón, sino que explora agujeros al azar) (Sarubbo et al., 2018). Cabe remarcar que el uso de la estrategia directa se ha relacionado con la activación del hipocampo, mientras que la seriada se ha asociado con el estriado (Packard y Knowlton, 2002; Packard y McGaugh, 1992; Packard y Teather, 1998; Rueda-Orozco et al., 2008; White y McDonald, 2002). Así, la baja utilización de las estrategias directa y seriada en los animales de edad avanzada puede asociarse con deterioros de la actividad neuronal del hipocampo y estriado (Foster, 1999; Shapiro, 2001). Todo ello confirma que durante el envejecimiento se produce una alteración de las habilidades cognitivas, afectando especialmente a la memoria y aprendizaje (Esteban et al., 2010a, b; Glorioso y Sibille, 2011; Park et al., 2002; Park y Reuter-Lorenz, 2009; Ramis et al., 2013, 2016, 2020, 2021a, b; Sarubbo et al., 2015, 2018; Wilson et al., 2006). Si bien se ha descrito que el hipocampo reduce su volumen con la edad (Raz et al., 2004), durante el proceso de envejecimiento normal no hay evidencia de que el hipocampo contenga menor cantidad de neuronas (Burke y Barnes, 2006), lo que ha llevado a sugerir que la causa sea debida a una pérdida de sinapsis (Hedden y Gabrieli, 2004; Terry, 2000) en áreas específicas del hipocampo (Wilson et al., 2006). Además, en el hipocampo de ratas de edad avanzada la plasticidad sináptica se encuentra comprometida (Burke y Barnes, 2006; Foster, 1999; Wilson et al., 2006), causando déficits en el almacenamiento y recuperación de información sobre la organización espacial del entorno (Rosenzweig y Barnes, 2003). Asimismo, el cuerpo estriado se ve afectado con la edad, y se refleja en deterioros de varios procesos cognitivos y motores (Brasted et al., 1997; Cook y Kesner, 1988; Driscoll y Sutherland, 2005; Umegaki et al., 2008). En relación a este punto, la capacidad motora también se ve alterada durante el envejecimiento. Así, los animales de edad avanzada permanecen menos tiempo sobre la rueda giratoria del test del *rotarod*, mostrando una peor coordinación motora, equilibrio y fuerza (Esteban et al., 2010a, b; Pitozzi et al., 2012; Ramis et al., 2016, 2021a, b; Sarubbo et al., 2018). Esta disfunción motora puede relacionarse con alteraciones en los sistemas de neurotransmisión (Esteban et al., 2010a, b; Joseph., 1992; Joseph et al., 1999; Kaasinen y Rinne, 2002; Morgan et al., 1987) y/o disfunciones del estriado (Seidler et al., 2010).

En los animales viejos, en el análisis cromatográfico mediante HPLC se observa un descenso significativo en la actividad de las vías serotoninérgicas y catecolaminérgicas, tanto en el hipocampo (donde llegan terminales que sintetizan 5-HT y NA) (Berumen et al., 2012; Viljoen y Panzer, 2007) como en el estriado (5-HT y DA) (George et al., 1994; Phillips, 2003), pudiendo ser una de las causas del declive cognitivo y motor que hemos observado en las ratas viejas (Collier et al., 2004; Esteban et al., 2010a, b; Lemon et al., 2009; Ramis et al., 2016, 2020, 2021a, b; Sahakian et al., 1985; Sara et al., 1994, 1995; Sarubbo et al., 2015, 2018; Vankov et al., 1995; Yurek et al., 1998). Además, también se produce un descenso de la vía serotoninérgica en la glándula pineal (Moranta et al., 2014), en la que la enzima limitante TPH-1 es una isoforma diferente a la cerebral (TPH-2); esta disminución puede relacionarse con alteraciones en la producción de la melatonina endógena (potente antioxidante y compuesto básico para la sincronización de los ritmos biológicos) (Erren y Reiter, 2008; Poeggeler, 2005; Reiter et al., 1980, 1981). La disfunción del SNC con la edad se ha asociado a alteraciones en las concentraciones cerebrales de neurotransmisores monoaminérgicos (NA, DA, 5-HT), los cuales están involucrados en numerosas funciones cerebrales. Entre estas funciones cabe destacar su importancia sobre la regulación de las habilidades cognitivas y motoras, especialmente en el hipocampo y el estriado (Gonzalez-Burgos y Feria-Velasco, 2009; Haider et al., 2011, 2014; Li et al., 2003; Luine et al., 1990; Manahan-Vaughan y Kulla, 2003; Tsunemi et al., 2005). La reducción observada en la síntesis de monoaminas cerebrales se debe principalmente a la disminución de la actividad de las enzimas TPH-2 y TH (enzimas limitantes de la vía serotoninérgica y catecolaminérgica respectivamente). Esta reducción se ha analizado mediante el estudio de la acumulación *in vivo* de 5-HTP y DOPA tras la inhibición de la descarboxilación mediante una dosis efectiva máxima del fármaco NSD-1015 administrado 30 minutos antes del sacrificio (Carlsson et al., 1972; Nissbrandt et al., 1988). Dicha acumulación es significativamente menor en los animales de edad avanzada en comparación a los animales jóvenes. Varios estudios han sugerido que la disminución de la función enzimática de TPH y TH puede ser debida al daño oxidativo producido por ROS (Cash, 1998; De la Cruz et al., 1996; Hussain y Mitra, 2000; Kuhn y Arthur, 1996), lo que puede explicar la reducción significativa de las monoaminas centrales asociada a la edad en las regiones cerebrales indicadas anteriormente (Luine et al., 1990; Esteban et al., 2010a, b; Sarubbo et al., 2015).

Varias vías de señalización intracelular asociadas con la longevidad han mostrado también la capacidad de desempeñar importantes funciones cerebrales superiores (Herskovits y Guarente, 2014; Hoeffler y Klann, 2010; Michán et al., 2010), proporcionando una conexión entre el envejecimiento y la plasticidad potencial del SNC (Bouchard y Villeda, 2015). En los últimos años diversas investigaciones han sugerido que SIRT1 ejerce un papel clave en el proceso del envejecimiento. En relación a este punto, los datos obtenidos en nuestra investigación indican

que los niveles de SIRT1 hipocampal presentan un descenso significativo en los animales de edad avanzada en comparación a los animales jóvenes, tal y como han descrito estudios anteriores (Quintas et al., 2012; Sarubbo et al., 2018). Asimismo, reducciones en la expresión o actividad de SIRT1 pueden contribuir al envejecimiento y a los procesos inflamatorios, con consecuencias negativas sobre las capacidades cognitivas y contribuyendo al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas asociadas a esta etapa de la vida, tales como Alzheimer y Parkinson (Herskovist y Guarente, 2013, 2014; Jiang et al., 2012; Qin et al., 2006). En estudios previos sobre sirtuínas, los resultados conductuales fueron paralelos a cambios en la plasticidad sináptica o estructural (mediante modificaciones en la potenciación a largo plazo o alteraciones en la densidad de espinas dendríticas) en regiones cerebrales vulnerables a los efectos del envejecimiento (como el hipocampo) (Bouchard y Villeda, 2015; Gao et al., 2010; Michán et al., 2010). Así, SIRT1 es capaz de modular la plasticidad sináptica y los procesos de memoria durante el envejecimiento normal (Herskovits y Guarente, 2014), incluida la memoria inmediata, el condicionamiento clásico y el aprendizaje espacial en el hipocampo (Michán et al., 2010).

Durante el proceso de envejecimiento normal suele observarse un incremento de procesos inflamatorios como mecanismo de defensa contra el daño cerebral, así como la inducción de genes asociados a respuestas inmunitarias e inflamatorias a nivel cerebral (Adler et al., 2007; Berchtold et al., 2008; Cribbs et al., 2012; Soreq et al., 2017; Yeung et al., 2004) que puede afectar a las habilidades cognitivas y motoras, contribuyendo también al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Liu y Chan, 2014; Simi et al., 2007; Wonodi y Schwarcz, 2010). Así, el envejecimiento puede conllevar una sobreactivación de la vía de NF- κ B (Adler et al., 2007; Quivy y Van Lint, 2004). En relación a ello, la sobreactivación de esta vía puede producir una neuroinflamación crónica y la inducción de la generación de ROS (Bok et al., 2019; Tilstra et al., 2012); a su vez, ROS activa NF- κ B, formándose así un bucle de mayor producción de ROS e incremento de la actividad de NF- κ B (Chung et al., 2002; Mhatre et al., 2004). Varias vías son capaces de mediar la activación de NF- κ B; entre estas vías encontramos SIRT1, la cual es capaz de actuar sobre la desacetilación de la subunidad p65 de NF- κ B, disminuyendo la inflamación (Oeckinghaus y Ghosh, 2009; Yeung et al., 2004). Es por ello que la disminución de la actividad de SIRT1 observada en animales de edad avanzada puede contribuir al incremento de procesos inflamatorios. Este aumento puede ser especialmente significativo en el hipocampo, región cerebral con niveles más altos de NF- κ B (Meberg et al., 1996). La mayor susceptibilidad del hipocampo a la neuroinflamación en animales viejos puede ser debida a su mayor proporción de astrocitos y microglia respecto a otras regiones, generando una producción más alta y rápida de citoquinas proinflamatorias, acompañado a su vez de bajos niveles de moléculas antiinflamatorias (Barrientos et al., 2012; Campuzano et al., 2009; Flowers

et al., 2015; Pitossi et al., 1997). La proximidad del hipocampo a los ventrículos laterales y órganos circumventriculares muy vascularizados también puede favorecer el transporte de moléculas proinflamatorias (Katsuura et al., 1990). Por otra parte, la constante neuroinflamación asociada a la edad produce modificaciones en la síntesis de neurotransmisores (García-Bueno y Leza, 2008). En relación a este punto, se ha indicado que la neuroinflamación prolongada puede alterar la síntesis de catecolaminas y serotonina; por ejemplo, en lugar de formarse 5-HT a partir de triptófano se forma ácido quinurénico que inhibe los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (García-Bueno y Leza, 2008), receptores implicados en los procesos de memoria, produciendo a su vez deterioros de las habilidades cognitivas. Sin embargo, con nuestra metodología, los resultados de este trabajo muestran que el envejecimiento no afecta significativamente a los niveles totales de la proteína NF- κ B hipocampal. Estos datos coinciden con otros estudios previos en los que el envejecimiento tampoco modificó los niveles de NF- κ B en hipocampo de ratas viejas (Korhonen et al., 1997) ni ratones (Adler et al., 2007). Aun así, se ha descrito que los niveles de NF- κ B acetilada son significativamente superiores en hipocampos de animales de edad avanzada, siendo la proporción NF- κ B acetilada/NF- κ B total considerablemente superior en ratas viejas en comparación a ratas jóvenes (Sarubbo et al., 2018). Al igual que en los animales de edad avanzada, nuestros resultados en las diferentes terapias aplicadas no muestran cambios significativos en los niveles de NF- κ B totales en comparación a los controles viejos o a los animales jóvenes. Solamente el tratamiento crónico con α -tocoferol a dosis bajas es capaz de reducir significativamente los niveles totales de NF- κ B. A pesar de no detectarse cambios en los niveles de NF- κ B en la mayor parte de los diferentes tratamientos y terapias que hemos usado, para todos ellos se ha descrito que pueden ejercer efectos antiinflamatorios (Briones et al., 2013; Cai et al., 2007; Chen et al., 2019; Fu et al., 2018; Galli et al., 2017; Jurgens y Johnson, 2012; Liu et al., 2019b; Pervin et al., 2018, 2019; Rothenberg y Zhang, 2019; Ryan y Nolan, 2016); por ejemplo, mediante la disminución de la secreción de citoquinas proinflamatorias (Csiszar et al., 2014; Silva et al., 2020; Speisman et al., 2013; Xu et al., 2015; Zhang et al., 2016), mejorándose la función cerebral (Cotman et al., 2007) y los procesos cognitivos como la memoria (Abraham y Johnson, 2009; Williams et al., 2008). Asimismo, se ha indicado que el tratamiento con diversos polifenoles es capaz de disminuir los valores de la forma acetilada de NF- κ B y de reducir el estado proinflamatorio en animales de edad avanzada (Sarubbo et al., 2018), los cuales ya muestran unos niveles de NF- κ B acetilada elevados debido a la edad. Se ha mostrado también que el EA puede promover la neurogénesis y plasticidad a través de NF- κ B/p65 (Neidl et al., 2016; Zhang et al., 2018). Por todo ello, aunque nuestros resultados no hayan podido evidenciarlo, no se descarta que los tratamientos y terapias aplicados puedan inducir cambios en la vía de señalización de NF- κ B debido a su compleja regulación y/o especificidad del tipo celular (Dresselhaus y Meffert, 2019; Snow y Albeni, 2016).

Otra proteína implicada en los procesos de memoria asociados al hipocampo es RbAp48, especialmente en el giro dentado (Pavlopoulos et al., 2013). Nuestros datos obtenidos indican que se produce una disminución en la expresión de la proteína RbAp48 con la edad, tal y como se ha descrito anteriormente (Pavlopoulos et al., 2013; Kosmidis et al., 2018). Esta proteína tiene la capacidad de actuar sobre las histonas y modificar sus patrones de acetilación, afectando a la consolidación de la memoria (Kosmidis et al., 2018). Así, déficits de esta proteína se han correlacionado con alternaciones cognitivas durante el proceso de envejecimiento (Kosmidis et al., 2018; Pavlopoulos et al., 2013). Se ha descrito también que esta proteína puede controlar la expresión de otras proteínas asociadas a procesos cognitivos, tales como BDNF y el receptor acoplado a proteínas G 158 en el hipocampo (Kosmidis et al., 2018), afectando a la plasticidad cerebral. Cabe indicar que, a parte de la disminución con la edad, no se han detectado cambios significativos en la expresión de RbAp48 en ninguno de los tratamientos aplicados en comparación a sus controles, por lo que no podemos extraer datos concluyentes sobre el papel de la proteína RbAp48 en las mejoras observadas en nuestro estudio a nivel comportamental.

Se ha descrito que la producción de radicales libres asociados al daño oxidativo es una de las causas del envejecimiento. Además, diversas investigaciones han asociado el incremento de ROS con la aparición de disfunciones cerebrales (Berr et al., 2000; Gallagher et al., 1996; Serrano y Klann, 2004). En este sentido, el envejecimiento cerebral puede asociarse, al menos parcialmente, con un desequilibrio progresivo entre las defensas antioxidantes y las concentraciones intracelulares de ROS (Reiter, 1998). Nuestros resultados indican que los animales de edad avanzada presentan incrementos significativos de MDA (indicador de la peroxidación lipídica) en la corteza cerebral (Tejada et al., 2006), mientras que las diferentes dosis de α -tocoferol aplicadas en animales viejos reducen los niveles de MDA (Ramis et al., 2016). De igual modo, otros autores observaron concentraciones similares de MDA en la corteza y el hipocampo de ratas envejecidas, que también se redujeron después del tratamiento con tocoferol (Jolitha et al., 2006).

Con todo ello, se ha podido constatar que durante el proceso de envejecimiento se producen modificaciones adversas que afectan a la calidad de vida. Es por ello que esta investigación se ha basado en la aplicación de diversas estrategias para intentar prevenir o retrasar los deterioros observados. A continuación, se detallan los cambios producidos en cada una de las estrategias utilizadas en esta tesis.

5.2 Efectos de los tratamientos con antioxidantes sobre el proceso de envejecimiento

La intervención de ROS en el proceso de envejecimiento ha generado la búsqueda de estrategias basadas en la administración de antioxidantes que puedan retrasar o paliar los cambios producidos con la edad (Maxwell, 1995). En la presente investigación se ha analizado el efecto de tratamientos crónicos con α -tocoferol (isoforma de la vitamina E) y los polifenoles resveratrol y catequina, así como el extracto de té verde *poliphenon 60* (Ramis et al., 2016, 2020) y una dieta rica en antioxidantes (Ramis et al., 2021a).

La administración aguda de los antioxidantes resveratrol, α -tocoferol, catequina y *poliphenon 60*, al contrario que la administración crónica, no alteró la memoria de trabajo espacial en animales adultos que ya empiezan a presentar un deterioro cognitivo asociado a la edad, descartando un efecto agudo de dichos antioxidantes. A diferencia, trabajos previos del grupo pusieron de manifiesto que algunos fármacos administrados de forma aguda son capaces de producir efectos beneficiosos sobre la memoria de trabajo espacial y la memoria episódica. Por ejemplo, ratas viejas tratadas con hormona de crecimiento mostraron una mayor eficiencia a la hora de ejecutar la prueba (Ramis et al., 2013).

5.2.1 Efectos de la restricción calórica y el resveratrol en animales adultos

En animales adultos, los datos obtenidos muestran como tanto el RES como la RC son capaces de mejorar la memoria de trabajo espacial y la memoria episódica, contrarrestando los efectos adversos cognitivos asociados a las primeras etapas del proceso de envejecimiento. Dentro de estas acciones se encuentra la capacidad de actuar como estimulantes de la memoria (Bigford y Del Rossi, 2014). En el caso de la coordinación motora, el tratamiento con RES no modificó el tiempo de permanencia sobre la rueda giratoria, mientras que los animales del grupo RC mostraron una mejora en el test del *rotarod*; sin embargo, esta mejora se puede asociar a la significativa reducción de peso que sufrieron dichos animales. La RC (basada en la reducción de la ingesta calórica sin producir malnutrición) es considerada una de las terapias capaz de aumentar la esperanza de vida en muchas especies, incluyendo los mamíferos (Colman et al., 2009; Ingram et al., 2006; Ingram y Roth, 2015; Masoro, 2005; Weindruch, 1996), y de mejorar el estado de la salud del individuo, desacelerando el deterioro funcional asociado al envejecimiento y paliando o retrasando la aparición de enfermedades relacionadas (Allard et al., 2009; Ingram et al., 2006; Ingram y Roth, 2015; Omodei y Fontana, 2011). En consonancia a nuestros resultados, la RC ha mostrado ejercer efectos beneficiosos significativos frente al empeoramiento del aprendizaje y la memoria asociado a la edad en roedores (Chouliaras et al., 2011; Ingram et al., 2006) y humanos (Witte et al., 2009). En este sentido, se ha descrito que la

RC posee la capacidad para inducir los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, particularmente aquellos que están implicados en la detoxificación de ROS (Ristow y Schmeisser, 2014), que pueden conllevar mejoras en las habilidades cognitivas. Por ejemplo, la RC es capaz de retrasar tanto la peroxidación lipídica (Matsuo et al., 1993) como la acumulación de proteínas oxidadas (Dubey et al., 1996; Lee et al., 1999), reduciendo también el daño oxidativo del ADN (Chistiakov et al., 2014). En relación al antioxidante RES, estudios previos le han atribuido numerosas propiedades anti-envejecimiento (Allard et al., 2009; Bigford y Del Rossi, 2014; Das y Maulik, 2006; Frémont, 2000; Lamming et al., 2004; Pallàs et al., 2013; Robb et al., 2008; Smoliga et al., 2013), especialmente por ser un mimético de la RC (Frescas et al., 2005; Howitz et al., 2003; Picard et al., 2004; Valenzano y Cellierino, 2006; Wood et al., 2004) y mejorar la salud general en mamíferos (Baur et al., 2006). Asimismo, se ha descrito que el RES posee propiedades antioxidantes y capacidad para reducir el estrés oxidativo (Yang et al., 2015a), ayudando a mantener unos niveles adecuados de las defensas antioxidantes en regiones cerebrales asociadas a procesos cognitivos. Esta capacidad del RES para contener el estrés oxidativo puede ayudar a prevenir la pérdida de capacidades cognitivas asociadas a la edad. Al igual que la mayoría de los polifenoles, el RES tiene una capacidad antioxidante intrínseca, pero también induce las actividades y la expresión de una serie de enzimas antioxidantes (Baur y Sinclair, 2006; Kwon et al., 2010), lo cual dificulta descifrar la contribución precisa de cada mecanismo a una reducción general del daño oxidativo (Halliwell, 2007; Robb et al., 2008). Sin embargo, la baja biodisponibilidad y la débil capacidad de eliminar directamente ROS hace que la citoprotección a través de reacciones químicas directas sea poco probable (Leonard et al., 2003; Sale et al., 2004). Por lo tanto, las acciones beneficiosas del RES sobre las habilidades cognitivas pueden ser el resultado de su capacidad para iniciar una cascada de eventos intracelulares que conduzcan a una regulación positiva de los sistemas de defensa celular, que a su vez protegen contra la muerte mediada por el estrés oxidativo, como por ejemplo la vía de las sirtuínas (Robb et al., 2008; Pallàs et al., 2013), permitiendo reparar la función cerebral al alcanzar edades avanzadas.

Parte de las mejoras observadas a nivel cognitivo y motor en los grupos RC y RES pueden ser debidas a la capacidad de inducir cambios en los neurotransmisores monoaminérgicos, tanto en hipocampo como estriado. En este sentido, nuestros resultados muestran que la aplicación de la RC mejora las vías noradrenérgicas y dopaminérgicas. Así, se produce un aumento de la actividad TH, con un incremento de los niveles de DOPA y DA, por lo que la RC puede atenuar la disminución de DA asociada a la edad (Maswood et al., 2004; Roth y Joseph, 1994), relacionándose también con una mayor capacidad motora. De igual modo, los niveles de NA también están incrementados, pudiéndose asociar a una mejora cognitiva (Rojic-Becker et al., 2019). La protección de la RC sobre las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas puede

relacionarse con una regulación positiva de los factores neurotróficos, tales como BDNF (Duan et al., 2001; Maswood et al., 2004), reduciendo también los niveles celulares de estrés oxidativo (Barja, 2002) e incrementando la plasticidad cerebral (Mattson, 2000). Sin embargo, en otras áreas cerebrales no se han observado cambios tras la aplicación de la RC (Del Arco et al., 2011). En cuanto a la vía serotoninérgica, nuestros datos muestran cómo se produce una reducción en los niveles de 5-HTP y 5-HT tanto en hipocampo como en estriado. Esta disminución es congruente con la reducción en la temperatura corporal registrada en estos mismos animales, de modo semejante al descrito en ratas por otros autores (Mayers et al., 2009; Speakman y Mitchell, 2011; Swoap, 2008), e incluso en humanos (Heilbronn et al., 2006). Asimismo, la restricción de alimentos también puede conllevar cambios neuroquímicos que afectan negativamente a la regulación del estado del ánimo (Chandler-Laney et al., 2007), pudiéndose asociar a la disminución de 5-HT cerebral observada. A diferencia de la disminución de la actividad TPH-2, en la glándula pineal no se producen cambios significativos en la síntesis de 5-HT, lo que sugiere una modulación diferente de la isoforma TPH-1. Todo lo indicado anteriormente, junto a la dificultad de aplicar la RC en humanos, hace que sea necesaria la búsqueda de miméticos de la RC que no conlleven disminuciones de la temperatura ni afecten negativamente al estado de ánimo, como por ejemplo el RES (Mayers et al., 2009).

El tratamiento con RES tiene la capacidad de incrementar la actividad de las vías noradrenérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas en hipocampo y estriado, así como en la glándula pineal. Estas mejoras sobre los niveles de NA, DA, 5-HT y sus precursores en animales adultos fueron similares a los obtenidos en animales de edad avanzada (Sarubbo et al., 2015), así como tras la aplicación de otros polifenoles (Sarubbo et al., 2018). Dichas mejoras pueden asociarse a la capacidad del RES de proteger a las enzimas frente a los agentes oxidantes que causan la pérdida de funcionalidad enzimática (Bastianetto et al., 2000; Rose et al., 2014; Wang et al., 2011). En este sentido, se han descrito efectos similares sobre el sistema dopaminérgico de roedores tratados con RES tras el daño causado por diversos agentes tóxicos (Blanchet et al., 2008; Lofrumento et al., 2014; Rose et al., 2014; Wang et al., 2011). Por lo tanto, el RES puede tener un efecto neuroprotector, aumentando la actividad enzimática de TH y TPH (en sus dos isoformas), incrementando a su vez los niveles de las monoaminas cerebrales y contribuyendo a una mejora de la función cognitiva. En animales de edad avanzada se ha descrito como varios polifenoles, incluyendo el RES, tienen la capacidad de inhibir la enzima MAO-A hipocámpal, reduciendo la tasa de metabolización de 5-HT (Sarubbo et al., 2015, 2018). Así, los polifenoles pueden aumentar tanto la síntesis como la acumulación de 5-HT, prolongando la actividad sináptica de los neurotransmisores (Bandaruk et al., 2012; Ogle et al., 2013; Yáñez et al., 2006; Zhu et al., 2014). Sin embargo, en el presente estudio en animales adultos el aumento de los niveles de 5-HT y 5-HIAA parecen estar más relacionados con un

aumento de la actividad de la TPH-2, y por tanto una mejora de la síntesis y metabolismo de la 5-HT, que a una inhibición producida por la MAO-A. El RES puede ejercer sus acciones mediante diversas vías; por ejemplo, con cambios en la actividad sináptica o en la recaptación de monoaminas (Yañez et al., 2006; Xu et al., 2010). La reducción del estrés oxidativo protegiendo TH y TPH de ROS, así como las mejoras cognitivas y motoras asociadas, también pueden relacionarse con la capacidad de los antioxidantes de modificar otras vías intracelulares, tales como proteínas con efectos a nivel cognitivo o con funciones antiinflamatorias.

La RC y el RES en el hipocampo han mostrado la capacidad de suavizar la disminución de SIRT1 debida a la edad en los animales adultos, aunque no de forma significativa. Parte de la mejora cognitiva de los grupos RC y RES puede deberse a su capacidad para activar SIRT1. En relación a este punto, aunque las bases de la eficacia de la RC no están completamente definidas, gran parte de sus efectos han sido asociados a su capacidad para incrementar y activar la familia de las sirtuínas (Allard et al., 2009; Mair y Dillin, 2008; Quintas et al., 2012; Testa et al., 2014). Se ha sugerido que el declive en la expresión o actividad de SIRT1 contribuyen al envejecimiento y a la inflamación, alterando también las capacidades cognitivas (Gao et al., 2010; Herskovist y Guarente, 2013, 2014; Jiang et al., 2012; Qin et al., 2006; Salminen et al., 2008), por lo que la RC puede prevenir esta disminución asociada a la edad, presentando efectos beneficiosos sobre las funciones cognitivas. Aunque se desconocen los mecanismos responsables de la disminución de SIRT1 asociado a la edad, se ha apuntado que uno de los motivos podría ser el daño oxidativo (Wu et al., 2006). Es por ello que los antioxidantes pueden atenuar o revertir el descenso de SIRT1 en regiones cerebrales relacionadas con las habilidades cognitivas y motoras (Ramis et al., 2015a). Además, los compuestos activadores de sirtuínas pueden actuar previniendo el estrés oxidativo, preservando la estructura y funcionalidad sináptica y contribuyendo a la conservación de las capacidades cognitivas (Gräff y Tsai., 2013). Como se ha indicado anteriormente, el RES es considerado un mimético de la RC debido a su habilidad para activar las sirtuínas, especialmente SIRT1 en mamíferos (Frescas et al., 2005; Howitz et al., 2003; Picard et al., 2004; Wood et al., 2004), por lo que resulta una estrategia alternativa a la RC muy útil debido a la dificultad de aplicar las terapias de RC en humanos. En relación a ello, aunque se ha indicado que el resveratrol puede presentar una habilidad neuroprotectora por su propio efecto antioxidante, varios estudios han descrito que este efecto podría ser indirecto, a través de su capacidad para actuar a nivel transcripcional sobre la expresión de las sirtuínas (Raval et al., 2006, 2008; Sarubbo et al., 2015), favoreciendo por ejemplo su sobreexpresión (Mannari et al., 2010). Asimismo, el uso de antioxidantes como el RES u otros polifenoles puede revertir o retrasar el deterioro cognitivo, pudiendo reducir la sobreexpresión de la neuroinflamación asociada a la edad (Sarubbo et al., 2018) y regular la

plasticidad sináptica que afecta a las funciones cognitivas (Gao et al., 2010; Michán et al., 2010).

5.2.2 Efectos del α -tocoferol, catequina y poliphenon 60 en animales viejos, así como la administración de una dieta rica en antioxidantes

El presente estudio indica que los tratamientos con los antioxidantes α -tocoferol, catequina y *poliphenon 60* (extracto de té verde) en animales viejos, así como también una dieta rica en antioxidantes aplicada desde la edad adulta, ejercen efectos restaurativos sobre las tareas relacionadas con la memoria en animales de edad avanzada de forma similar a otros tratamientos crónicos con melatonina o resveratrol y otros polifenoles (Esteban et al. 2010a; Moranta et al., 2014, Sarubbo et al., 2015, 2018). Nuestros resultados indican que dichos antioxidantes produjeron una mejora significativa en la memoria de trabajo espacial, la memoria episódica y el aprendizaje visoespacial. Únicamente las dosis más altas de α -tocoferol tuvieron un efecto positivo sobre las habilidades motoras, incrementando el tiempo de permanencia sobre la rueda giratoria. En la dieta rica en antioxidantes, nuestros datos (Ramis et al., 2021a) están también en consonancia con otras investigaciones en las que la administración crónica de dietas ricas en polifenoles (por ejemplo, enriquecidas con frutos rojos) mejoran la conducta exploratoria, la memoria y el aprendizaje en roedores de edad avanzada (Blaylock y Maroon., 2012; Liu et al., 2006; Shukitt-Hale et al., 2009; Vauzour et al., 2008).

La vitamina E, micronutriente esencial para los humanos y un compuesto habitual de la dieta mediterránea, es considerada una potente sustancia antioxidante (Meydani, 1995; Schneider, 2005), cuyos niveles óptimos en el organismo son beneficiosos para la salud (Galli et al., 2017). Se ha descrito que posee la capacidad de fortalecer el sistema de defensa antioxidante, reducir la generación de ROS y preservar la integridad y fluidez de las membranas cerebrales, así como mejorar la función mitocondrial (Hong et al., 2004; Sokol et al., 1998) y las capacidades cognitivas. En relación con ello, varias investigaciones han mostrado que ejerce un papel preventivo contra el declive cognitivo asociado al envejecimiento e incluso puede paliar diversos efectos adversos de enfermedades neurodegenerativas (Joseph et al., 1998; Li et al., 2012; Navarro et al., 2005; Sano et al., 1997; Yamada et al., 1999), en consonancia a nuestros resultados. La suplementación con α -tocoferol también mostró efectos protectores contra la pérdida de la función motora asociada a la edad en ratas (Joseph et al., 1998) y ratones (Ulatowski et al., 2014; Yokota et al., 2001). A pesar de ello, otros estudios han indicado que la ingesta de vitamina E no condujo a ninguna mejora en el rendimiento motor en ratones de edad avanzada o incluso mostraron un empeoramiento (Sumien et al., 2004). Asimismo, aunque el α -tocoferol desaceleró la progresión de la enfermedad de Alzheimer, los pacientes que recibieron el tratamiento combinado con tocoferol y selegilina aumentaron el número de caídas y episodios

sincopales (Sano et al., 1997). Estos resultados divergentes pueden estar relacionados con la dosis de α -tocoferol utilizada, la duración del tratamiento y el comienzo del mismo, ya que algunos estudios sugieren que el tratamiento puede no ser efectivo a menos que se implemente antes de la aparición de pérdidas en la capacidad funcional (Luchsinger et al., 2003; Petersen et al., 2005; Sumien et al., 2004). Por lo tanto, las dosis y el período de tiempo de tratamiento utilizado en el presente estudio parecen estar dentro del rango adecuado para inducir un efecto funcional beneficioso. Por otra parte, cabe tener en cuenta que, a pesar de la abundancia natural de vitamina E en los alimentos de origen vegetal, un número muy significativo de personas no ingieren los niveles de consumo recomendados (Fulgoni et al., 2011), especialmente si no se sigue una dieta rica en verduras. Se ha descrito que los niveles adecuados de vitamina E son críticos para mantener la salud neurológica. La evidencia más llamativa de este requisito son las manifestaciones patológicas del síndrome de ataxia con deficiencia de vitamina E en humanos, los cuales presentan numerosas deficiencias neurológicas (incluyendo alteraciones en los axones y las mitocondrias neuronales, procesos de desmielinización, y problemas de comunicación neuronal) (Cavalier et al., 1998; Ouahchi et al., 1995; Ulatowski et al., 2014).

Los flavanoles, antioxidantes que forman parte del grupo de los polifenoles flavonoides, pueden ejercer efectos positivos sobre las capacidades cognitivas de mamíferos (Spencer, 2010). Entre los productos ricos en estos polifenoles (como muchos tipos de frutas incluyendo albaricoques, manzanas y uvas), los extractos de té verde han atraído una gran atención debido a su gran consumo en todo el mundo como infusión (Lakenbrink et al., 2000; Peng et al., 2014; Prasanth et al., 2019; Rietveld y Wiseman, 2003). El *poliphenon 60* es un compuesto representativo del té verde, incluyendo también catequinas (Jung et al., 2012). La ingesta de extractos de té verde se ha asociado con una variedad de efectos beneficiosos para la salud, incluyendo efectos neuroprotectores (Chen et al., 2018; Mancini et al., 2017; Pervin et al., 2018). También presentan un potencial terapéutico sobre los efectos adversos asociados a la edad y a enfermedades relacionadas (Assunção et al., 2011; Kuriyama et al., 2006; Maki et al., 2009; Matsuyama et al., 2008; Unno et al., 2004, 2007), en los que el estrés oxidativo y la inflamación se han identificado como los principales mecanismos moleculares subyacentes produciendo alteraciones cerebrales (Andrade y Assunção, 2012; Farzaei et al., 2019; Li et al., 2009; Unno et al., 2007). De hecho, los principales compuestos polifenólicos que se encuentran en los extractos de té verde poseen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Además, se ha demostrado que las catequinas cruzan la barrera hematoencefálica, alcanzando el tejido cerebral donde ejercen sus efectos neuroprotectores, mejorando la función cerebral (Andrade y Assunção, 2012; Mancini et al., 2017).

Parte de las mejoras observadas a nivel cognitivo y motor se asocian a modificaciones en los niveles de neurotransmisores monoaminérgicos. Nuestros datos indican que los antioxidantes aplicados α -tocoferol (especialmente las dosis más elevadas), catequina y *poliphenon 60* ejercen efectos beneficiosos sobre la síntesis de los neurotransmisores monoaminérgicos en el hipocampo (sistema noradrenérgico y serotoninérgico) y el estriado (sistema dopaminérgico y serotoninérgico) de ratas viejas, mejorando la función enzimática de las enzimas limitantes TPH-2 y TH. En el hipocampo, estos antioxidantes incrementan los niveles de NA y 5-HT así como sus precursores DOPA y 5-HTP. En el estriado, también se produjo un aumento en los niveles de DA y 5-HT y sus precursores DOPA y 5-HTP. La mejora observada en la capacidad motora de ratas viejas tratadas con α -tocoferol se puede correlacionar con el aumento de DA en el cuerpo estriado; sin embargo, el aumento de DA en los animales tratados crónicamente con catequina o *poliphenon 60* no desencadenó una mejora de la coordinación motora. Los antioxidantes administrados también mejoraron la vía serotoninérgica en la glándula pineal, incrementando la función enzimática de la enzima limitante TPH-1 como puede observarse en los niveles del precursor 5-HTP, efecto descrito previamente tras la administración de otros polifenoles (Sarubbo et al., 2015, 2018), lo que podría tener como consecuencia un efecto beneficioso en la producción de melatonina, que a su vez es un potente antioxidante cuyos niveles disminuyen drásticamente con la edad (Reiter et al., 1980, 1981).

En consistencia con nuestros resultados, se ha reportado que la administración de vitamina E restableció la expresión y actividad de TPH, así como el contenido de 5-HT en el hipotálamo (Rahman y Thomas, 2014) y protegió la TH en neuronas noradrenérgicas (Pasbakhsh et al., 2008) y dopaminérgicas de la sustancia nigra (Ueda et al., 2005) contra la degeneración. Por tanto, la vitamina E puede ejercer un efecto neuroprotector gracias a su capacidad para recuperar la actividad de las enzimas limitantes en la síntesis de monoaminas TH y TPH en sus dos isoformas (Walther et al., 2003). Estos resultados son consistentes con el efecto neuroprotector del α -tocoferol (Navarro et al., 2011; Socci et al., 1995) ya que una propiedad bien conocida de dicho compuesto es su capacidad para reducir la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas en el cerebro (Navarro et al., 2011; Niki et al., 1993; Yokota et al., 2001), induciendo cambios adaptativos en las defensas antioxidantes para compensar la mayor generación de radicales libres con la edad (Wu et al., 2010). De hecho, dado que el daño oxidativo es un factor importante en el envejecimiento cerebral (Forster et al., 1996), extensa literatura ha analizado el poder de los antioxidantes contra el estrés oxidativo, incluida la vitamina E y el α -tocoferol, vinculando directamente los radicales libres y el daño oxidativo con la disminución cognitiva y/o motora (La Fata et al., 2014; Socci et al., 1995; Ulatowski et al., 2014). En este sentido, la deficiencia de vitamina E se ha asociado con deterioros cognitivos y motores (Fukui et al., 2002; Ulatowski et al., 2014; Yokota et al., 2001), mientras que la

suplementación dietética a largo plazo de vitamina E puede mejorar la función cognitiva durante el envejecimiento (Joseph et al., 1998; Murray y Lynch, 1998; Navarro et al., 2005; Socci et al., 1995) al mantener una defensa antioxidante adecuada en el hipocampo (Murray y Lynch, 1998; Navarro et al., 2011) y reducir la degeneración de las células hipocampales (Hara et al., 1990). Asimismo, la eficacia antioxidante de la vitamina E aumenta después de los tratamientos a largo plazo con α -tocoferol porque el cerebro tiende a aumentar su concentración (dentro de la bicapa lipídica de las membranas) (Vatassery et al., 1999). De esta manera, la suplementación dietética con altas dosis de α -tocoferol de 2 a 8 meses aumentó los niveles de vitamina E en la corteza cerebral y el hipocampo (Martin et al., 1999, 2000a) en consonancia con lo observado en esta investigación, con un aumento en los niveles cerebrales de α -tocoferol de una manera dosis-respuesta que fue acompañado de una disminución de los niveles de MDA (Ramis et al., 2016).

Los efectos de la catequina y el *poliphenon 60* apoyan las mejoras obtenidas con otros compuestos polifenólicos (Sarubbo et al., 2015, 2018). La exposición a una mezcla de polifenoles del té verde (*poliphenon 60*) o a la catequina no sólo protege los sistemas monoaminérgicos analizados, sino que parece recuperarlos de la disminución asociada a la edad, no habiendo diferencias significativas entre los tratamientos con ambos antioxidantes. En este sentido, se ha descrito que los componentes del té son capaces de reducir el estrés oxidativo y aumentar los niveles de antioxidantes endógenos (Rai et al., 2019). Estudios previos con diversos compuestos del té verde también han mostrado recuperaciones de los niveles monoaminérgicos cerebrales. Así, un tratamiento con teaflavina incrementó la expresión de TH en la sustancia nigra de ratones con Parkinson gracias a su capacidad antioxidante y antiapoptótica (Anandhan et al., 2012). Este compuesto también mejoró el recambio dopaminérgico en la corteza frontal, mostrando además un efecto ansiolítico en roedores (Kita et al., 2019). Del mismo modo, un tratamiento con epicatequina en ratones mostró un incremento de la actividad TH en el hipocampo y la corteza (aumentando la síntesis de los neurotransmisores monoaminérgicos), así como una disminución de la expresión de MAO-A en la corteza (inhibiendo la degradación de los neurotransmisores) (Stringer et al., 2015). Otras investigaciones indicaron que el té verde normalizó los valores de 5-HT en animales sometidos a estrés (Ikram et al., 2017). Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con diversos flavonoides permite la proliferación celular, sugiriendo que los flavonoides pueden aumentar la neurogénesis a través de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, mitigando el daño oxidativo y promoviendo la supervivencia y la diferenciación celular (Acosta et al., 2010). Conocido el papel de los sistemas monoaminérgicos en la regulación de la producción de BDNF, el aumento en los niveles de monoaminas también puede resultar en un incremento de los niveles de neurotrofinas (Quesseveur et al., 2013), tales como BDNF en el hipocampo (Stringer et al., 2015). Todo ello podría contribuir en alguna medida en las mejoras observadas.

En la misma línea, la administración de una dieta rica en antioxidantes es capaz de mejorar la síntesis de monoaminas (Ramis et al., 2021a), tanto en hipocampo como en estriado y glándula pineal. En este sentido, se detectaron incrementos de los precursores DOPA y 5-HTP en hipocampo y estriado, así como de los neurotransmisores monoaminérgicos NA, DA y 5-HT y sus metabolitos. Así, los antioxidantes presentes en una dieta rica en dichos compuestos ejercen efectos beneficiosos sobre la síntesis y recambio de los neurotransmisores monoaminérgicos de ratas envejecidas (Ramis et al., 2016, 2020; Sarubbo et al., 2015, 2018), recuperándolos de la disminución asociada a la edad. De este modo, los efectos positivos en las capacidades cognitivas inducidos por dicha dieta pueden relacionarse con el incremento de los neurotransmisores monoaminérgicos, mejorando la función enzimática de las enzimas limitantes TPH y TH (Rai et al., 2019; Rahman y Thomas, 2014; Sarubbo et al., 2015, 2018; Walther et al., 2003).

Las mejoras cognitivas y motoras obtenidas pueden asociarse además con la capacidad de los antioxidantes de actuar sobre otras vías intracelulares (Faggi et al., 2019; Pan et al., 2013), tales como SIRT1 (cuyo declive puede contribuir al envejecimiento y la inflamación, alterando las capacidades cognitivas) (Gao et al., 2010; Herskovist y Guarente, 2013, 2014; Jiang et al., 2012; Qin et al., 2006; Salminen et al., 2008). Se ha podido comprobar que el α -tocoferol, la catequina y el *poliphenon 60* incrementan la expresión de SIRT1 en el hipocampo de animales de edad avanzada, alcanzando valores similares a los de animales jóvenes, de modo semejante a otros polifenoles estudiados anteriormente (Sarubbo et al., 2015, 2018). En varias investigaciones se ha demostrado también que el α -tocoferol (Nagib et al., 2018), el γ -tocoferol (Shin et al., 2017), el tocotrienol (otro isómero de la vitamina E) (Khor et al., 2015; Lee y Lim, 2018) y la vitamina E (Wu et al., 2006) son capaces de activar SIRT1 en varios tipos celulares. Igualmente, se ha descrito que una dieta rica en vitamina E puede ejercer un efecto protector en ratas con una lesión cerebral traumática leve, incrementando SIRT1 y jugando un papel importante frente a la protección del estrés oxidativo incrementando los niveles de superóxido dismutasa (Wu et al., 2010). En los polifenoles, se ha descrito que el efecto protector de estas terapias *in vivo* sobre los niveles cerebrales de SIRT1 se deben principalmente a un efecto protector contra el ataque oxidativo, especialmente teniendo en cuenta la susceptibilidad de SIRT1 frente a ROS (Yamakuci et al., 2008). Sin embargo, falta por determinar si la mejora sobre SIRT1 es debido directamente a sus propiedades antioxidantes y/o a la modulación de otras proteínas que regulen SIRT1. Otros compuestos del té verde también presentan la capacidad de actuar sobre las sirtuínas. Así, en un cultivo celular, el polifenol EGCC disminuyó el estrés oxidativo a través de la vía de señalización SIRT1/PGC-1 α , aumentando la expresión de enzimas antioxidantes (Ye et al., 2012).

En resumen, los datos experimentales de este estudio *in vivo* demuestran que el tratamiento con los antioxidantes resveratrol en animales adultos y α -tocoferol, catequina y *poliphenon 60* en animales de edad avanzada ejercen efectos positivos sobre las habilidades cognitivas. Estos efectos se relacionan con una mayor síntesis de monoaminas cerebrales mediada por TPH y TH que generalmente disminuye durante el envejecimiento. Estos resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre las intervenciones terapéuticas para retrasar o paliar las discapacidades cognitivas y motoras relacionadas con las reducciones en los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos. Las mejoras obtenidas a nivel comportamental también pueden asociarse a una mayor expresión de la proteína SIRT1. El hecho que los diferentes antioxidantes analizados sigan patrones de acción similares, así como al de otros polifenoles (Sarubbo et al., 2015, 2018), sugiere que la protección frente al estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos subyacentes a la neuroprotección conseguida tras estos tratamientos crónicos. Asimismo, sería interesante determinar si la modulación de la vía de señalización de SIRT1 gracias a estos antioxidantes sería directa o indirecta (por ejemplo, a través de la protección de sus componentes contra la oxidación o por la activación de otras moléculas que activen SIRT1) durante el envejecimiento cerebral. Por otra parte, hay que tener en cuenta que investigaciones recientes sobre los metabolitos de estos antioxidantes demostraron actividades biológicas que difieren, al menos en parte, de las de los compuestos originales (Del Rio et al., 2013; Pervin et al., 2019) y que pueden ayudar a dilucidar el papel de dichos antioxidantes. El hecho de que estos antioxidantes estén presentes en diversos alimentos sugiere que una dieta rica en dichos compuestos (como es la dieta mediterránea) puede ser beneficiosa, no sólo optimizando el rendimiento mental especialmente en individuos de edad avanzada, sino también reduciendo el riesgo de padecer algún tipo de deterioro cognitivo.

Además del uso de antioxidantes, se ha descrito que otras estrategias pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la memoria de animales envejecidos. Así, en esta investigación se ha analizado el efecto del ejercicio físico moderado sobre las habilidades cognitivas y motoras deterioradas durante el envejecimiento, así como la aplicación de programas a largo plazo de enriquecimiento ambiental frente al estrés crónico moderado impredecible.

5.3 Efectos del ejercicio sobre el proceso de envejecimiento

El deterioro cognitivo asociado a la edad también ha sido relacionado con la inactividad física (Norton et al., 2014), por lo que el ejercicio podría ejercer un efecto protector sobre las capacidades cognitivas y motoras (Ahlskog et al., 2011; Ma, 2008; Ngandu et al., 2015; Prakash et al., 2015), tal y como se observa en los datos obtenidos en esta investigación tras aplicar un programa de ejercicio físico moderado en animales de edad avanzada (Ramis et al., 2021b). El

ejercicio mejoró tanto la memoria de trabajo espacial (tardando menos tiempo y realizando menos errores en la prueba del laberinto radial) como la memoria episódica (aumentando la exploración del objeto nuevo en el test de reconocimiento de objeto nuevo). Además, los animales recordaron mejor la localización de la caja de escape en la prueba del laberinto de *Barnes*, siguiendo estrategias más eficaces que los controles. La coordinación motora de estos animales también fue mejor que los animales del grupo control; en este punto cabe indicar que los animales que realizaron el programa de ejercicio estaban más habituados al dispositivo del *rotarod*, puesto que este aparato fue el utilizado para aplicar dicho programa. A pesar de ello, se pudo observar que estos animales presentaban un comportamiento motor más complejo que los animales control. En consonancia con nuestros resultados, estudios previos han indicado que el ejercicio es capaz de mejorar la función cerebral, paliando también el deterioro cognitivo relacionado con el envejecimiento (Bronner et al., 1995; Johnson y McKnight, 1989; Mattson, 2000, 2012; Oliff et al., 1998; Radák et al., 2013). Estas mejoras se han asociado a la capacidad del ejercicio para estimular la neurogénesis (Johnson y McKnight, 1989; Oliff et al., 1998), así como la plasticidad cerebral (Cotman y Engesser-Cesar, 2002). Estos cambios se han asociado tanto a mejoras vasculares y metabólicas como a la posible capacidad del ejercicio de inducir directamente cambios estructurales y neuroquímicos en áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria (Duzel et al., 2016; Mattson, 2012). Así, se ha mostrado que el ejercicio aeróbico aumenta la angiogénesis y favorece la perfusión en el hipocampo (Pereira et al., 2007), activa la neurogénesis (Louissaint et al., 2002; Palmer et al., 2000; Pereira et al., 2007) e incrementa la plasticidad sináptica (Marlatt et al., 2010; Opendak y Gould, 2015; Van Praag, 2008; Van Praag et al., 1999; Vivar et al., 2013). De igual modo, se ha descrito que el entrenamiento con ejercicios aeróbicos es efectivo reduciendo la pérdida de volumen hipocampal asociada a la edad y va acompañado con mejoras en la función cognitiva (Erickson et al., 2011). Correr también aumenta la complejidad y el número de espinas dendríticas en varias regiones cerebrales, tales como el giro dentado (Eadie et al., 2005; Siette et al., 2013; Stranahan et al., 2007).

Nuestros resultados muestran cómo el ejercicio físico junto a la catequina también mejoró las habilidades cognitivas y motoras de animales de edad avanzada, pero no se observó un efecto sumatorio de ambas estrategias a nivel comportamental ya que los efectos del ejercicio serían similares a los obtenidos por la aplicación de las dos terapias (Ramis et al., 2021b). A diferencia de estos datos, otras investigaciones han indicado que otros flavanoles como la epicatequina incrementaron los efectos del ejercicio en la memoria espacial (Van Praag, 2009). Asimismo, se ha descrito que el ejercicio puede potenciar los efectos beneficiosos de los componentes de una dieta saludable y viceversa, tanto a nivel celular como molecular (Murphy et al., 2014; Van Praag et al., 2007), ejerciendo acciones complementarias regulando el metabolismo energético

del cerebro (Gomez-Pinilla y Tyagi, 2013) y modulando diversas vías de señalización vinculadas a la función neuronal y a la plasticidad sináptica, afectando a las habilidades cognitivas (Gomez-Pinilla y Nguyen, 2012). Es probable que ello dependa de la intensidad o duración del programa aplicado; en cualquier caso, sugiere que los cambios inducidos por ambas terapias retrasan el deterioro cognitivo asociado a la edad.

Se ha descrito que la actividad física no solo puede mejorar la función cognitiva sino también aumentar la resistencia contra los efectos nocivos del estrés en la salud mental (Ma, 2008; Nicastro y Greenwood, 2016). En este sentido, nuestros resultados indican que el ejercicio es capaz de aumentar los niveles de NA, DA, 5-HT y sus precursores, tanto en hipocampo como en estriado. En la glándula pineal se produce también un incremento de los valores de 5-HTP y 5-HT. Además, en el hipocampo y en el estriado se puede observar un efecto sumatorio tras la aplicación del ejercicio junto a la catequina, a diferencia de los efectos observados a nivel comportamental (Ramis et al., 2021b). Los datos obtenidos con el ejercicio están en consonancia con estudios previos en los que se ha mostrado que el ejercicio físico crónico en animales aumenta los niveles de NA y 5-HT en la mayor parte de las áreas cerebrales, en comparación con los controles sedentarios (Ma, 2008). Así, el ejercicio físico influye en los sistemas dopaminérgicos, noradrenérgicos y serotoninérgicos centrales, evidenciándose cambios en la síntesis y el metabolismo de las monoaminas, a pesar de la gran discrepancia de protocolos experimentales (Meeusen y De Meirleir, 1995). Sin embargo, la edad en la que se empieza a aplicar el ejercicio puede afectar a su efectividad (Arnold et al., 2017). Por otra parte, se ha descrito que el ejercicio mejora el estado antioxidante y redox del cerebro (Franzoni et al., 2017; Sallam y Laher, 2016; Somani et al., 1995, 1996), atenuando el nivel de estrés oxidativo. Este hecho puede optimizar la actividad enzimática de las enzimas limitantes en la síntesis de monoaminas TH y TPH que, como ya se ha comentado, son muy susceptibles a la oxidación.

La mejora de las capacidades motoras de los animales de edad avanzada debida al ejercicio puede relacionarse con la mayor concentración de DA en el estriado. Como la actividad de las neuronas estriatales se asocia con un refuerzo positivo para el ejercicio (Kravitz y Kreitze, 2012), es posible que una mayor actividad dopaminérgica estriatal pueda inducir una mayor motivación para el ejercicio físico (Rabelo et al., 2015). Un estudio previo muestra cómo el ejercicio moderado aumentó la expresión tanto del receptor del factor neurotrófico derivado de células gliales GFR- α 1 como de TH (mejorando los niveles de DA) en la sustancia negra (Arnold et al., 2017), aunque en dicho estudio el ejercicio disminuyó la expresión de TH en el estriado (Arnold et al., 2017). Este hecho puede sugerir que las mejoras en los niveles de DA en el estriado obtenidas fueron debidas a otros factores independientes a la expresión de TH. Entre ellos, se ha descrito también que la actividad aumentada del sistema dopaminérgico en respuesta

al ejercicio puede asociarse a un incremento en los niveles centrales de calcio, lo que aumenta la actividad de la tirosina hidroxilasa a través de la activación del sistema calcio-calmodulina (Sutoo y Akiyama, 2003). En cuanto al sistema noradrenérgico central, se ha descrito que el ejercicio voluntario incrementa los niveles de NA en varias regiones del cerebro y la médula espinal (Dunn et al., 1996). Dicho aumento también fue observado en diversas áreas cerebrales (incluyendo el hipocampo, el locus coeruleus y la amígdala) tras la aplicación de ejercicio con la cinta de correr (Sarbadhikari y Saha, 2006). La activación repetida del sistema noradrenérgico durante el ejercicio puede influir directamente en los factores de plasticidad, facilitando la activación sensorial, enfocando la atención o mejorando el aprendizaje durante el ejercicio (Nicastro y Greenwood, 2016). Estudios previos han indicado que, si la señal noradrenérgica se bloquea, el efecto del ejercicio crónico sobre la transcripción de BDNF se encuentra atenuado (García et al., 2003; Ivy et al., 2003). Así, la activación noradrenérgica y/o serotoninérgica es un elemento clave en la elevación transcripcional de BDNF durante el ejercicio (García et al., 2003; Ivy et al., 2003; Nicastro y Greenwood, 2016), estableciéndose también un posible efecto antidepressivo. En relación a este último punto, varios estudios han sugerido que el ejercicio presenta propiedades antidepressivas (Ernst et al., 2006; Ota y Duman, 2013), modificando las vías noradrenérgicas y serotoninérgicas. En consonancia con lo anteriormente descrito, el ejercicio parece elevar los niveles de TPH en los núcleos del rafe (Lim et al., 2001; Min et al., 2003) y aumenta la liberación de 5-HT (Xu et al., 2008); aunque se ha descrito que los efectos del ejercicio en el sistema 5-HT parecen ser altamente dependientes de los subtipos de receptores y las áreas cerebrales examinadas (García et al., 2003). Asimismo, se ha indicado que el ejercicio moderado incrementa los niveles de triptófano tanto en el plasma como en el hipocampo (Chaouloff et al., 1986, 1989), lo que puede aumentar la producción de 5-HT (Ernst et al., 2006). Por otra parte, 5-HT parece ejercer un papel modulador sobre la fatiga (Newsholme et al., 1987) ya que el aumento de 5-HT durante el ejercicio modifica la tolerancia al dolor o al malestar, afectando al rendimiento mental y físico (Cordeiro et al., 2017; Meeusen et al., 2006). El aumento en los niveles de triptófano también se asocia a los mayores niveles de 5-HT en la glándula pineal (Esteban et al., 2004), cuyo incremento puede derivar en una mejora de los niveles de melatonina y, por consiguiente, de los ritmos circadianos del organismo y las propiedades antioxidantes de la hormona. Se ha descrito que el ejercicio puede influir en los niveles de melatonina (Escames et al., 2012), aunque estos efectos se ven afectados por numerosos parámetros (por ejemplo, la duración e intensidad del ejercicio o la hora de entreno). Por otro lado, la melatonina también puede influir en el rendimiento físico, existiendo interacciones mutuas entre el ejercicio y la producción de melatonina que pueden ser beneficiosas (Escames et al., 2012).

La catequina, como se ha descrito anteriormente, ejerce un efecto protector sobre TH y TPH, reduciendo ROS (Rai et al., 2019), lo que puede favorecer el efecto sumatorio observado a nivel de las monoaminas cerebrales en el grupo de animales que realizaron ejercicio y recibieron catequina. La catequina también es capaz de activar, de forma directa o indirecta, otros mecanismos que pueden llevar a la conservación de las vías monoaminérgicas deterioradas con la edad (Acosta et al., 2010; Rai et al., 2019), restableciendo sus valores. Así, es posible que el efecto sumatorio observado entre el ejercicio y la catequina pueda ser debido a que cada tratamiento sea capaz de activar o potenciar diferentes mecanismos de acción.

Por otra parte, el ejercicio también es capaz de conferir protección contra los efectos nocivos del estrés oxidativo (Nicastro y Greenwood, 2016; Ozbeyli et al., 2015), lo que resulta en la activación de vías que reduzcan el estrés oxidativo (como SIRT1) y una disminución en la incidencia de enfermedades relacionadas (Radak et al., 2005; Sarbadhikari y Saha, 2006). Nuestros datos muestran como los niveles de SIRT1 tanto en el grupo de ejercicio como en el de ejercicio junto a catequina se encuentran incrementados en comparación al grupo control de su misma edad, aunque no se detecta un efecto sumatorio entre el ejercicio y la catequina, al igual que no se observó en los resultados comportamentales (Ramis et al., 2021b). En relación a estos datos, el ejercicio es capaz de activar la vía de las sirtuínas en diversos tejidos del organismo, incluyendo cerebro, corazón, músculo esquelético y tejidos adiposos (Suwa y Sakuma, 2013). Igualmente, el ejercicio se ha asociado a una mejora de la función mitocondrial (Dietrich et al., 2008; Kirchner et al., 2008; Steiner et al. 2011) a través de la modulación de las vías SIRT1 y proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el hipocampo (Bayod et al., 2015), así como la activación de sirtuínas en otras regiones cerebrales (Suwa y Sakuma, 2013) como la sustancia nigra (Muñoz et al., 2018). Los mayores niveles de SIRT1 también se relacionan con la regulación del receptor PGC-1 α , promoviendo su actividad específica como factor transcripcional en genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos y las vías respiratorias mitocondriales, estimulando la biogénesis mitocondrial (Steiner et al. 2011) y mejorando la funcionalidad cerebral. Asimismo, la activación de SIRT1 se relaciona con el incremento de BDNF hipocampal y la mejora de las habilidades cognitivas (El Hayek et al., 2019). Por tanto, la activación de sirtuínas a través del ejercicio en el SNC puede resultar beneficiosa contra enfermedades neuronales que incluyen déficit cognitivo y demencia, protegiendo contra el estrés oxidativo y la apoptosis a través, a su vez, de la modulación de otras vías celulares tales como NF- κ B y BDNF (Suwa y Sakuma, 2013). Por el contrario, en otros estudios se ha mostrado que el ejercicio no cambió o incluso disminuyó el nivel de expresión de SIRT1 en varios tejidos, como el cerebelo o el músculo esquelético (Gurd et al., 2011, Hokari et al., 2010; Palacios et al., 2009; Suwa y Sakuma, 2013). Se ha especulado que el ejercicio puede inducir un aumento transitorio de la proteína SIRT1 en algunos tejidos, seguido de una

disminución prolongada (Gurd et al., 2011). También es posible que el ejercicio aumente la biogénesis mitocondrial a través del aumento de la actividad intrínseca de SIRT1, sin un aumento del nivel de expresión (Hokari et al., 2010). Aunque las razones de esta discrepancia no están claras, se debe tener en cuenta la diversidad de protocolos experimentales existentes. De forma similar, la combinación del ejercicio con una dieta enriquecida en flavonoides puede promover la expresión de genes asociados a la plasticidad cerebral, disminuyendo la expresión de genes que comprometen dicha plasticidad, incluyendo aquellos relacionados con la inflamación y la muerte celular (Van Praag et al., 2007).

Analizando en conjunto estos resultados, el ejercicio moderado y la acción conjunta del ejercicio y la dieta enriquecida en polifenoles pueden resultar muy útiles como terapias para retrasar o paliar el deterioro cognitivo y motor asociado al envejecimiento, mejorando los neurotransmisores monoaminérgicos y los niveles de SIRT1. Por tanto, un estilo de vida físicamente activo y la acción conjunta con una dieta rica en antioxidantes puede resultar una de las formas más efectivas y sencillas de mantener un cuerpo y una mente saludables. Es por ello que parece necesario impulsar la aplicación de programas de actividad física (determinando los parámetros adecuados de frecuencia, duración e intensidad del ejercicio), combinados con una dieta rica en antioxidantes que puedan paliar el deterioro cognitivo y motor asociado a la edad.

5.4 Efectos del enriquecimiento ambiental sobre el proceso de envejecimiento

El EA se basa en una modificación de las condiciones en las que se mantienen los animales, creando un entorno que permite una mayor interacción cognitiva, potenciando el aprendizaje y la memoria mediante estimulaciones sensoriales, cognitivas y motoras (Harburger et al., 2007; Mora et al., 2007). La aplicación del EA desde 1 mes hasta los 20 meses de edad (grupo EA 1 - 20) y desde 7 meses hasta los 20 meses de edad (grupo EA 7 - 20) es capaz de mejorar las capacidades cognitivas y motoras cuando dichos animales van envejeciendo, en comparación a los controles. Así, los animales sometidos a EA presentan mejoras en la memoria de trabajo espacial, ejecutando la prueba del laberinto radial de forma más eficiente. Del mismo modo, se observa un efecto positivo sobre la memoria episódica ya que los animales de los grupos EA son capaces de discriminar mejor el objeto nuevo frente al familiar. Sin embargo, no hubo cambios en el test de *Barnes*, aunque cabe indicar que los animales sometidos a EA tenían más interés en explorar el dispositivo en busca de la novedad que de entrar en la caja de escape ante el estímulo negativo (luz potente). En este aspecto, se ha descrito que los animales mantenidos en ambientes enriquecidos muestran una mejor estrategia de exploración, interaccionan más con los objetos y necesitan menos tiempo para adaptarse a ambientes nuevos o para recuperarse de

una situación estresante (Mohammed et al., 2002). Así, a lo largo de la habituación al dispositivo y del aprendizaje de la localización del *target* los animales del grupo EA se adaptaron mejor al estímulo negativo, permitiéndoles seguir explorando el dispositivo en busca de algún otro factor novedoso. Esta “exploración extra” después de que el animal localice el *target* sin introducirse en él puede suponer una desventaja en los parámetros evaluados en este test. Es por ello que en animales mantenidos en EA podría resultar necesario analizar el tiempo transcurrido hasta que el animal localiza el agujero de escape por primera vez (latencia primaria), así como los errores cometidos (errores primarios) (conceptos propuestos por Harrison et al., 2006). En cuanto a las habilidades motoras no se detectaron cambios significativos entre los grupos de análisis. Sin embargo, a nivel cualitativo los animales sometidos a EA presentaban un comportamiento motor mucho más complejo (por ejemplo, corriendo hacia atrás sobre la rueda giratoria o explorando el dispositivo a la vez que corren). Por el contrario, cuando se aplicó el programa de EA en animales viejos (a partir de 18,5 meses) no se observó ninguna mejora significativa. Así, el EA puede requerir un tiempo de aplicación largo para conseguir mejoras cognitivas y debe iniciarse a más tardar a edades intermedias. La acción conjunta del EA desde edades tempranas y la dieta rica en antioxidantes (los cuales, por separado, ejercen mejoras en las habilidades cognitivas de animales viejos) produjo un efecto sumatorio en algunas de las pruebas realizadas para evaluar las capacidades cognitivas.

Estudios previos han indicado que animales mantenidos en ambientes enriquecidos muestran una menor actividad basal al ser expuestos a ambientes novedosos (Bowling et al., 1993). Igualmente, se ha descrito que el EA puede favorecer una adaptación emocional más rápida ante situaciones nuevas, siendo menos reactivos al estrés o más capaces de sobrellevarlo (Fox et al., 2006; Segovia et al., 2009), presentando igualmente una disminución de comportamientos similares a la ansiedad y la depresión (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Ilin y Richter-Levin, 2009; Schloesser et al., 2010). También se ha indicado que los animales del grupo EA muestran una mejor estrategia exploratoria, permitiéndoles obtener información de manera más eficiente y reducir el tiempo de habituación (Larsson et al., 2002; Schrijver et al., 2002; Zimmermann et al., 2001). Asimismo, el EA es capaz de mejorar la memoria y el aprendizaje espacial asociados al hipocampo (Duffy et al., 2001; Gagné et al., 1998; Kempermann et al., 1997; Lee et al., 2003; Mohammed et al., 2002; Tang et al., 2001; Van Praag et al., 2000; Williams et al., 2001), así como la memoria emocional y de reconocimiento (Tang et al., 2001). Parte de estos efectos beneficiosos del enriquecimiento ha sido asociado a la capacidad del EA de modificar la plasticidad cerebral (Cassarino y Setti, 2015; Harburger et al., 2007; Leggio et al., 2005; Nithianantharajah y Hannan, 2006), tanto en animales jóvenes como envejecidos (Harburger et al., 2007; Mora, 2013); en relación a este punto, diversas investigaciones han indicado que el EA es capaz de modificar la estructura cerebral (Globus et al., 1973; Greenough y Volkman,

1973; Mohammed et al., 2002). Varios estudios también han apuntado que los efectos del EA pueden asociarse al concepto de reserva cognitiva, que sugiere que distintas experiencias de vida pueden afectar la estructura cerebral y estimular la neuroplasticidad (aumentando el número de neuronas y sinapsis, disminuyendo la apoptosis y regulando el soporte neurotrófico) (Cassarino y Setti, 2015; Steffener et al., 2014; Stern, 2002, 2009; Tucker y Stern, 2014), compensando las deficiencias asociadas a la edad (Fratiglioni et al., 2004). De esta forma, se ha descrito que el EA es capaz de mejorar el deterioro cognitivo gracias a su habilidad de inducir la expresión de neurotrofinas relacionadas con la plasticidad sináptica, especialmente BDNF (Ickes et al., 2000; Jha et al., 2011; Pham et al., 2002; Polito et al., 2014; Silva et al., 2020; Van Praag et al., 2000), incrementando el aprendizaje espacial y el comportamiento exploratorio (Falkenberg et al., 1992). Por otra parte, otros estudios han mostrado que los animales mantenidos bajo EA presentan reducciones en los marcadores de estrés oxidativo en el hipocampo y en la corteza cerebral (Cechetti et al., 2012; Herring et al., 2010; Mármol et al., 2015, 2017; Montes et al., 2019), lo cual puede favorecer la funcionalidad cerebral; sin embargo, todavía siguen sin estar claros los mecanismos de acción mediante los cuales ejercen este efecto positivo sobre la capacidad antioxidante. Diversas investigaciones han sugerido que la inclusión de una rueda giratoria en la jaula u otros elementos que permitan a los roedores trepar y explorar, aumentando la complejidad del entorno en el que se encuentran, pueden mejorar la plasticidad estructural, la función cognitiva y aumentar la resistencia al estrés (Fan et al., 2007; Fischer, 2016; Ji et al., 2015; Markham et al., 2009; Veena et al., 2009); también se ha relacionado el EA con una mejora sobre la plasticidad en estructuras corticales involucradas en funciones motoras (Biernaskie y Corbett, 2001). Sin embargo, varios trabajos han indicado que los cambios producidos con el ejercicio físico prolongado serían, al menos en parte, diferentes a los obtenidos mediante el EA (basado en un comportamiento motor voluntario) (Kobilo et al., 2011; Mustruph et al., 2012; Nyhuis et al., 2010), pudiéndose desencadenar cambios funcionales y moleculares diferentes bajo ambos tratamientos (Nicastro y Greenwood, 2016). Cabe tener en cuenta que la metodología seguida en los estudios de EA es muy variada, existiendo una gran diversidad de protocolos (Simpson y Kelly, 2011). Entre los diferentes estudios varía el tamaño de las jaulas en las que se encuentran los animales, el número de animales por jaula, el tiempo que dura el tratamiento, la edad de inicio del tratamiento, la frecuencia de modificación de los objetos y estímulos, la presencia o ausencia de ruedas de ejercicio, la cepa y el sexo de los animales (Simpson y Kelly, 2011). Esta variedad de protocolos dificultaría la comparación de resultados entre las investigaciones, tanto a nivel comportamental como a nivel molecular, siendo necesario establecer o definir los protocolos que permiten obtener resultados más beneficiosos para paliar el deterioro asociado a la edad. En cuanto a la acción de la dieta rica en antioxidantes combinada con el enriquecimiento, se puede haber producido la activación de los mecanismos descritos tanto para los antioxidantes como

para el EA, así como otros mecanismos complementarios, incluyendo una mejor defensa antioxidante y una mayor plasticidad cerebral.

Respecto a los efectos neuroquímicos, nuestros resultados son congruentes con otras observaciones que indican que el EA en roedores es capaz de producir cambios conductuales asociados a modificaciones celulares y neuroquímicas, que pueden retrasar o paliar el deterioro cognitivo y motor asociado a la edad (Nithianantharajah y Hannan, 2009; Van Praag et al., 2000). La aplicación de EA desde 1 y 7 meses de edad incrementa los niveles de los neurotransmisores monoaminérgicos a edades avanzadas, con una mayor actividad del sistema noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico en el hipocampo y el cuerpo estriado, efectos que también se observaron en la glándula pineal. Además, en el caso de la TH, como se observa en el precursor DOPA, la edad de inicio del EA influye en la mejora obtenida tanto en hipocampo como estriado, siendo más eficiente la aplicación del EA desde edades tempranas. Lo mismo ocurre en el caso de la TPH-1 en la glándula pineal, como se observa en el precursor 5-HTP, donde el porcentaje de mejora también se ve influenciado por la edad de inicio del EA, al contrario de lo que ocurre con la TPH-2 en el hipocampo y estriado. Por otra parte, cuando el EA se aplica a edades avanzadas, a pesar de no detectarse cambios significativos en las pruebas comportamentales, se producen algunas modificaciones en los sistemas monoaminérgicos tanto en hipocampo como estriado, aunque no en la glándula pineal. Por tanto, el EA es más eficiente cuanto antes se inicie para obtener mayores efectos en los niveles de monoaminas.

La mejora en los niveles de neurotransmisores tras el EA puede asociarse al efecto protector del enriquecimiento sobre el estrés oxidativo (Cechetti et al., 2012; Herring et al., 2010; Mármol et al., 2015, 2017; Montes et al., 2019), especialmente sobre TPH y TH. Otros estudios han mostrado que el EA facilita la estimulación sensorial, cognitiva y motora, con una mayor neurogénesis del hipocampo y una plasticidad sináptica mejorada, así como con incrementos en los sistemas de neurotransmisión (Brown et al., 2003; Kempermann et al., 1997; Mora et al., 2007; Rosenzweig y Bennett, 1996; Van Praag et al., 2000). Por tanto, las mejoras obtenidas en las vías monoaminérgicas en hipocampo y estriado pueden asociarse a la mayor neurogénesis en dichas áreas, así como al incremento de la plasticidad sináptica en el cerebro. En particular, se ha descrito que el EA es capaz de aumentar la concentración de NA en la corteza parieto-temporo-occipital, el cerebelo y la protuberancia/bulbo raquídeo en ratones, sin cambios en DA y 5-HT en estas regiones (Naka et al., 2002). También se ha descrito que el EA es capaz de modular la liberación de NA en el hipocampo de ratón a través de los receptores N-metil-D-aspartato presinápticos (Grilli et al., 2009). Además, la novedad sería una característica clave en ambientes cognitivamente enriquecedores y de mejora de la neuroplasticidad hipocampal, efectos que se pueden asociar claramente a mejoras en el sistema noradrenérgico (Kitchigina et al., 1997; Sierra-Mercado et al., 2008; Veyrac et al., 2009). Por tanto, la activación de las vías

noradrenérgicas en determinadas áreas cerebrales puede ser un mecanismo importante por el cual el EA ejerce sus efectos positivos sobre la función cognitiva (Robertson, 2013). Por otra parte, se ha indicado que el EA puede incrementar el contenido de DA en la corteza posterior y el hipotálamo en ratas (O'Shea et al., 1983). La mayor exploración y locomoción inducida por la novedad puede producir también una mayor transmisión de DA estriatal. Dado que la DA en el estriado también se asocia a la recompensa y motivación (Bowman et al., 2003, Lucas et al., 2004), un incremento en los niveles de DA se asocian con un mejor rendimiento de la tarea orientada a la recompensa, como en la prueba del laberinto radial. En otro estudio se mostró además como el EA aumentó las tasas de renovación del hipocampo de DA y 5-HT en ratas, tanto machos como hembras (Kokras et al., 2019). En este sentido, se ha descrito que el EA es capaz de incrementar los niveles de sinaptofisina en el hipocampo, una proteína presináptica requerida para la fusión de vesículas y la liberación de neurotransmisores (Kokras et al., 2019). Se ha sugerido también que la mayor transmisión serotonérgica se asociaría a la plasticidad inducida por el EA (Baroncelli et al., 2010; Brenes et al., 2008). Asimismo, los efectos positivos en la vía serotonérgica pueden asociarse a la mayor resistencia al estrés y la disminución de comportamientos similares a la ansiedad y a la depresión observada en los animales sometidos a EA (Barbelivien et al., 2006, Fernández-Teruel et al., 1997). Por otra parte, el EA produce mejoras en la vía serotonérgica de la glándula pineal; en relación a este punto, no se han descrito efectos específicos del EA. Previamente, otros estudios han indicado que la actividad física puede incrementar los niveles de melatonina (Escames et al., 2012), mejorando la regulación de los ritmos cronobiológicos, por lo que el EA podría actuar mediante mecanismos similares al ejercicio físico.

La acción conjunta del enriquecimiento y una dieta rica en antioxidantes mejoró las vías monoaminérgicas. Los antioxidantes presentes en la dieta ejercen efectos beneficiosos sobre la síntesis y recambio de los neurotransmisores monoaminérgicos, como ha sido observado en éste y en otros trabajos (Ramis et al., 2016, 2020; Sarubbo et al., 2015, 2018), mejorando la función de las enzimas limitantes TPH y TH (Rai et al., 2019; Rahman y Thomas, 2014; Sarubbo et al., 2015, 2018; Walther et al., 2003). Además de la protección de las enzimas, otro posible efecto puede ser la recuperación de parte de los terminales monoaminérgicos y su neurotransmisión, disminuidos durante el proceso de envejecimiento, gracias al efecto positivo del EA sobre la neurogénesis (Acosta et al., 2010).

Finalmente, nuestros datos muestran como la aplicación de EA, en los tres grupos de enriquecimiento analizados, no produce cambios en los niveles de SIRT1 en comparación al grupo control de su misma edad. En este sentido, se ha sugerido que las mejoras cognitivas del EA no afectan a la expresión de sirtuínas hipocampal y cortical, incluyendo SIRT1 (Polito et al., 2014). Tal y como se ha indicado anteriormente, el ejercicio es capaz de mejorar la función

mitocondrial a través de activar la modulación de la vía SIRT1 (Bayod et al., 2015; Suwa y Sakuma, 2013). Sin embargo, este resultado difiere con el obtenido tras el EA, pudiéndose deber a que en nuestro programa de EA no se han utilizado ruedas giratorias (que permiten realizar un ejercicio más intenso), sino varios elementos que permitían a los roedores trepar y explorar, con un comportamiento motor voluntario diferente, dando como resultado la activación mecanismos celulares diferentes (Kobilo et al., 2011; Mustroph et al., 2012; Nyhuis et al., 2010). En el caso del grupo EA junto con una dieta rica en antioxidantes si se produjo un incremento significativo en los niveles SIRT1, en la misma línea que los producidos por los diferentes antioxidantes analizados (Mannari et al., 2010; Nagib et al., 2018; Sarubbo et al., 2015, 2018; Ye et al., 2012). Es por ello que las mejoras observadas en SIRT1 en el grupo Dieta y EA se consideran debidas al efecto de los antioxidantes de la dieta y no al enriquecimiento.

5.5 Efectos del estrés crónico moderado sobre el proceso de envejecimiento

A diferencia del enriquecimiento ambiental, se ha descrito que el estrés crónico puede desencadenar efectos adversos sobre los procesos cognitivos y motores, acelerando los efectos del envejecimiento. Sin embargo, el ES aplicado en nuestro estudio ha mostrado que en el test del laberinto radial los animales del grupo ES 1-20 (sometidos a estrés moderado impredecible desde un mes de edad) y del grupo ES 7-20 (estrés aplicado desde una edad intermedia) al alcanzar edades avanzadas son capaces de realizar la tarea de forma similar a los controles. En este punto, es posible que haya una relación recíproca entre la recompensa y el procesamiento del estrés a nivel cerebral; así, la exposición a recompensas (como sucede en el test del laberinto radial) puede amortiguar el efecto de los factores estresantes (Ulrich-Lai y Herman, 2009). En cuanto a la memoria episódica, evaluada mediante el test de reconocimiento de objeto nuevo en el que no hay recompensa, los animales sometidos a ES (iniciado a edad temprana e intermedia) tenían una peor capacidad de discriminación del objeto nuevo, llegando incluso a presentar una tendencia a explorar más el objeto familiar respecto a los animales del grupo control, resultados en consonancia con investigaciones previas (Bowman et al., 2009; Gomez et al., 2012; Luine et al., 2017; Orsetti et al., 2007). En la prueba del laberinto de *Barnes*, a pesar de no haber diferencias significativas entre los grupos EA 1-20 y ES 7-20 y sus controles en el tiempo y errores cometidos, los animales sometidos a ES siguieron peores estrategias que sus respectivos controles para localizar el *target*, utilizando principalmente la aleatoria. A nivel cualitativo cabe señalar que en las pruebas analizadas los animales sometidos a ES presentaban una tendencia a caminar de forma más rápida y aleatoria, buscando constantemente un escape (por ejemplo, levantándose en los brazos del laberinto radial o en el campo abierto e incrementando también el número de defecaciones y micciones). Este comportamiento puede relacionarse a estados de

ansiedad y/o depresión, los cuales han sido asociados a un estrés crónico (Lu et al., 2019; Mahar et al., 2014). En cuanto a la capacidad motora, el ES aplicado desde el primer mes de vida produjo una tendencia a disminuir el tiempo que los animales se mantienen sobre la rueda giratoria; en este test, los animales intentaban escapar de la rueda giratoria, siguiendo también un movimiento más errante.

La respuesta al estrés implica la activación de un conjunto de respuestas hormonales y neuronales que contribuyen a recuperar la homeostasis (Mora, 2013; Mora et al., 2012; Selye, 1976; Ulrich-Lai y Herman, 2009), desencadenando una respuesta fisiológica compleja que incluye la liberación de diversos neuromoduladores y hormonas, tanto en el cerebro como en otros órganos y glándulas del organismo (Mora, 2013; Mora et al., 2012) para mantener dicha homeostasis (Ulrich-Lai y Herman, 2009). Este tipo de procesos destinados a mantener o restablecer activamente la homeostasis se denominan respuestas alostáticas (Garrido, 2011). El término alostasis se refiere a la capacidad del cuerpo para producir hormonas y otros mediadores (tales como neurotransmisores y citoquinas) que ayudan a un animal a adaptarse a una nueva situación o desafío (Sterling y Eyer, 1988). El estrés, por tanto, es capaz de generar una respuesta adaptativa. Sin embargo, si esta respuesta se mantiene durante más tiempo del necesario o si se activa de forma crónica, pueden aparecer efectos nocivos en el cuerpo (como inmunosupresión, disfunción muscular periférica o muerte neuronal). Este proceso conduce a respuestas fisiológicas desadaptativas, denominándose carga alostática. Dicha carga puede considerarse la base para explicar por qué el estrés es un factor de riesgo importante durante el envejecimiento cerebral (McEwen y Wingfield, 2003). La carga alostática no es igual para todos los individuos, los cuales pueden presentar diferentes capacidades para adaptarse a los factores estresantes, mostrando una vulnerabilidad desigual a la exposición de los glucocorticoides generados durante el estrés (dando como resultado respuestas conductuales y fisiológicas diversas). La capacidad de adaptarse con éxito a diferentes factores estresantes se denomina resiliencia. Por tanto, un individuo con mayor capacidad de resiliencia sigue mostrando respuestas adaptativas al estrés durante más tiempo que otro con menor resiliencia (Feder et al., 2009). Por otra parte, se ha sugerido que una exposición crónica a factores estresantes durante la mediana edad puede conducir a mayores probabilidades de acelerar el envejecimiento cerebral (Sandi y Touyarot, 2006). En este sentido, estudios previos han indicado que el estrés crónico produce una aceleración o incremento del deterioro cognitivo asociado a la edad (Lupien et al., 1997; McEwen, 2002; Garrido, 2011), produciendo déficits de memoria y aprendizaje espacial (Castilla-Ortega et al., 2011; Luine et al., 1994; Sandi et al., 2003; Venero et al., 2002; Wang et al., 2018), cuyo deterioro se asocia a la supresión de la neurogénesis hipocampal (Castilla-Ortega et al., 2011; Gould y Tanapat, 1999; Mahar et al., 2014) y a la reducción de los niveles de algunas proteínas relacionadas con la neuroplasticidad hipocampal, tales como BDNF (Joëls

et al., 2004; Mineur et al., 2007; Oomen et al., 2007; Shen et al., 2018; Willner, 2017). Anteriormente se ha indicado que la exposición a una recompensa puede amortiguar el efecto del estrés (Ulrich-Lai y Herman, 2009); sin embargo, varios estudios sobre procesos cognitivos de tipo espacial asociados con recompensa (agua o comida) han indicado que el estrés crónico perjudicó dichas habilidades (Luine et al., 1994; Ramkumar et al., 2008; Sunanda et al., 2000; Veena et al., 2009). En cambio, algunas investigaciones han mostrado que la función neuronal y la cognición no se ven afectadas por el estrés (Beylin y Shors, 1998; Warren et al., 1991) o incluso estarían mejoradas (de Kloet et al., 1999; Joëls et al., 2006), aunque la duración del estrés en estos estudios fue inferior a los mencionados anteriormente (Conrad, 2010). Por tanto, la interacción entre el estrés y las funciones cognitivas, como la memoria, es mucho más compleja a la descrita inicialmente (Sandi y Pinelo-Nava, 2007). Estas diferencias en las respuestas también pueden ser debidas a la variabilidad de protocolos existentes, tanto en la fuente del estrés como en su intensidad y duración (Sandi y Pinelo-Nava, 2007), desencadenándose diferentes mecanismos de respuesta, tanto comportamentales como moleculares. Asimismo, también puede influir si el estrés aplicado es o no predecible por el animal y el contexto en el que se experimenta el estrés (es decir, si el estrés es o no contingente al procesamiento de la tarea cognitiva) (Cuadrado-Tejedor et al., 2011; de Kloet et al., 1999; Joëls et al., 2006; Sandi, 1998).

El estrés es capaz de producir cambios neuronales, tanto a nivel funcional como anatómico (Abbot, 2004; Garrido et al., 2012; McEwen, 2010). Nuestros datos neuroquímicos muestran como el ES es capaz de inducir cambios en las vías monoaminérgicas analizadas, no habiendo diferencias considerables entre los grupos ES 1-20 y ES 7-20. Así, el ES incrementó la actividad TH, como puede observarse en los niveles de DOPA tanto en hipocampo como en estriado. Al contrario, en el sistema serotoninérgico se observó una tendencia a disminuir esta vía, especialmente en el caso de 5-HT modulada por la TPH-2. Esta dinámica no se mostró en la glándula pineal, en la que se detectó un aumento en esta vía modulada por TPH-1, posiblemente como una compensación a la interrupción del ritmo circadiano debido a los constantes cambios de los ciclos de luz aplicados en el programa de estrés. De esta forma, estos resultados muestran una regulación diferente de ambas isoformas de TPH. Los cambios neuroquímicos observados en el hipocampo y estriado pueden influir sobre las habilidades cognitivas de estos animales. Se ha demostrado que las neuronas monoaminérgicas en el núcleo acumbens, el hipocampo y la corteza prefrontal desempeñan un papel fundamental en la respuesta al estrés y a los comportamientos similares a la depresión (Willner, 2017). En este sentido, se ha descrito que el estrés agudo es capaz de incrementar la liberación de NA, DA y 5-HT en varias áreas cerebrales como hipocampo, corteza prefrontal y amígdala (Abercrombie et al., 1988, 1989; Goldstein et al., 1996; Moghaddam, 1993), lo que sugiere que cambios en la neurotransmisión en estas áreas

del cerebro pueden modular la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (Herman et al., 2005). Sin embargo, el estrés crónico puede reclutar vías de acción distintas a las involucradas en la respuesta aguda al estrés. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, estudios previos han indicado que el estrés crónico impredecible induce un incremento de la vía dopaminérgica, aumentando los niveles de dopamina y sus metabolitos en el núcleo accumbens (Lu et al., 2019). El estrés crónico aumenta también la expresión de TH en el locus coeruleus, lo que es consistente con una mayor capacidad de liberación de noradrenalina (Smith et al., 1991; Watanabe et al., 1995). Sin embargo, en otra investigación se ha indicado que la aplicación de estrés crónico impredecible conlleva una reducción de los niveles de NA en hipocampo (Gao et al., 2018; Liu et al., 2018). De forma similar a lo observado en nuestro estudio, se ha descrito que los niveles de serotonina se encuentran disminuidos en hipocampo y corteza prefrontal (Bekris et al., 2005; Hei et al., 2019; Liu et al., 2018; Lu et al., 2019; Luo et al., 2008; Mahar et al., 2014), mostrando también cambios en la expresión y actividad de la enzima TPH (Lu et al., 2019; Mahar et al., 2014). Así, el ES conlleva una disminución de la vía serotoninérgica en hipocampo (Mahar et al., 2014), mostrando una función serotoninérgica deteriorada que puede asociarse a estados depresivos. En relación a este punto, tratamientos con antidepresivos pueden mejorar los cambios de comportamiento inducidos por el estrés crónico (Lu et al., 2019; Mahar et al., 2014). A menudo, la divergencia entre algunos resultados puede ser debida a la duración del tratamiento, los factores estresantes aplicados y su carácter predecible o impredecible. Diferentes protocolos pueden activar varios mecanismos de acción para intentar conducir a una adaptación de estos animales al estrés, afectando a su capacidad de resiliencia. Por ejemplo, se puede producir una regulación a la baja en la señalización de glucocorticoides en varias regiones cerebrales, asociada a una pérdida de sensibilidad (Mizoguchi et al., 2003; Ulrich-Lai y Herman, 2009). Esta respuesta adaptativa y patológica al ES puede inducir una disfunción del sistema monoaminérgico en varias áreas cerebrales, conllevando una hiperactividad del sistema dopaminérgico y noradrenérgico y una disminución de la vía serotoninérgica en determinadas regiones cerebrales. En este sentido, el estrés y los estados depresivos han sido asociados con incrementos del estado inflamatorio (Fu et al., 2019; Gao et al., 2018; Guo et al., 2019; Li et al., 2017; Liu et al., 2018; Lu et al., 2019). Además, la inflamación y el aumento de citoquinas con el ES pueden relacionarse a la hiperactividad de la función dopaminérgica en el núcleo accumbens y la hipofunción serotoninérgica descrita en algunos estudios en hipocampo y corteza prefrontal (Lu et al., 2019).

Por otra parte, nuestros datos muestran que la aplicación del ES desde edades tempranas produce un incremento en los niveles de SIRT1, aumento no observado cuando el estrés se inicia a edades intermedias. Estudios previos sobre sirtuínas en animales han obtenido resultados contradictorios respecto a la función de las sirtuínas en el estrés, la depresión y la

ansiedad. Por ejemplo, se ha descrito que el estrés crónico produce una reducción en la expresión de SIRT1 en el hipocampo (Abe-Higuchi et al., 2016; Shen et al., 2018), proteína que jugaría también un papel clave en la plasticidad sináptica; de forma interesante, el tratamiento con el antioxidante resveratrol es capaz de revertir esta disminución (Shen et al., 2018). A diferencia, en ratones *knockout* para SIRT1 cerebral, la disminución de SIRT1 condujo a una reducción de la ansiedad y una mayor resiliencia al estrés, mientras que la sobreexpresión global de SIRT1 produjo una mayor ansiedad y vulnerabilidad al estrés y depresión (Libert et al., 2011). En cambio, otros estudios han obtenido que el estrés crónico produce la hiperactivación de SIRT1 en ratas, modulando los efectos moleculares y conductuales del estrés crónico (Ferland y Schrader, 2011; Ferland et al., 2013). En este sentido, se ha descrito que SIRT1 es capaz de desacetilar a HSF1 (del inglés *transcription factor heat shock factor 1*), el cual puede incrementar la transcripción génica de chaperonas moleculares que ayudan a mantener la homeostasis de proteínas intracelulares (Westerheide et al., 2009). Asimismo, HSF1 hipocampal está involucrado en la plasticidad neuronal, así como en la respuesta conductual al estrés (Uchida et al., 2011); por tanto, la vía SIRT1-HSF1 puede ser uno de los mecanismos activados para controlar la plasticidad neuronal en respuesta al estrés. Sin embargo, nuevos estudios son necesarios para dilucidar el papel de SIRT1 en la regulación de la respuesta al estrés (Abe-Higuchi et al., 2016).

5.6 Consideraciones finales

En esta investigación nos hemos centrado en dos tipos de estrategias, una dietética y otra conductual, las cuales pueden ser complementarias para prevenir, retrasar o atenuar el deterioro cognitivo asociado a la edad: el uso de antioxidantes presentes en la dieta (vitamina E y polifenoles), el ejercicio físico y el enriquecimiento ambiental. Estas estrategias han ejercido efectos beneficiosos sobre el rendimiento cognitivo de ratas en edades avanzadas. De forma general, estas mejoras pueden estar relacionadas con la potenciación de las vías monoaminérgicas en regiones implicadas en procesos cognitivos y motores (hipocampo y estriado), así como con una mayor expresión de la proteína SIRT1 hipocampal, a excepción del enriquecimiento ambiental en el que esta proteína no se vio modulada.

En base a lo comentado anteriormente, podemos concluir que cambios en el estilo de vida pueden ejercer efectos positivos sobre el rendimiento cognitivo, retrasando la senescencia cerebral y, por tanto, mejorar la calidad de vida a edades avanzadas. Esta investigación apoya otras evidencias que establecen una relación beneficiosa entre alimentación, ejercicio físico y mental, y la salud. El mejor conocimiento de las respuestas moleculares asociadas a dichos beneficios puede permitir el desarrollo de terapias anti-envejecimiento más específicas y efectivas que prolonguen los años de vida sana.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales de la presente tesis doctoral son:

1. Los tratamientos crónicos con antioxidantes (resveratrol, α -tocoferol, catequina, *poliphenon 60* y una dieta rica en antioxidantes), el ejercicio físico y el enriquecimiento ambiental sostenido desde edades tempranas en ratas, reducen significativamente el deterioro de la memoria y el aprendizaje causados por el envejecimiento.
2. La mejora en la memoria y el aprendizaje inducida por los antioxidantes, el ejercicio físico y el enriquecimiento ambiental en ratas viejas, puede relacionarse con la recuperación de las tres vías monoaminérgicas en el hipocampo y el estriado, debido a una mayor actividad de las enzimas limitantes (TH y TPH) y consecuentemente de los niveles de neurotransmisores monoaminérgicos NA, DA y 5-HT.
3. Por el contrario, el estrés moderado impredecible aplicado crónicamente produce un efecto adverso en las habilidades cognitivas en ratas viejas. Además, produce una disminución de la vía serotoninérgica, con incrementos de las vías noradrenérgica y dopaminérgica.
4. Los tratamientos crónicos con antioxidantes (resveratrol, α -tocoferol, catequina, *poliphenon 60* y una dieta rica en antioxidantes) y el ejercicio físico, estimulan la recuperación de los niveles hipocampales de SIRT1 reducidos por la edad. Esto no ocurre con el enriquecimiento ambiental, lo que sugiere que en esta estrategia deben participar otras vías diferentes a SIRT1 en la recuperación de las capacidades cognitivas.
5. La proteína RbAp48, reducida durante el envejecimiento, no se ha recuperado tras la aplicación de ninguna de las estrategias estudiadas, por lo que no parece tener un papel esencial en la mejora de las capacidades cognitivas descritas.

The general conclusions of the present doctoral thesis are:

1. Chronic treatments with antioxidants (resveratrol, α -tocopherol, catechin, poliphenon 60 and a diet rich in antioxidants), physical exercise and environmental enrichment sustained from an early age in rats, significantly reduce memory and learning impairments caused by aging.
2. The improvement in memory and learning induced by antioxidants, physical exercise and environmental enrichment in old rats, can be related to the recovery of the three monoaminergic pathways in hippocampus and striatum, due to an increased activity of limiting enzymes (TH and TPH) and consequently of the monoaminergic neurotransmitters NA, DA and 5-HT levels.
3. In contrast, moderate unpredictable stress applied chronically produces an adverse effect on the cognitive abilities in older rats. In addition, it produces a decrease in the serotonergic pathway, with increases in the noradrenergic and dopaminergic pathways.
4. Chronic treatments with antioxidants (resveratrol, α -tocopherol, catechin, poliphenon 60 and a diet rich in antioxidants) and physical exercise, stimulate the recovery of age-reduced SIRT1 levels in the hippocampus. This does not occur with environmental enrichment, which suggests this strategy involves other pathways than SIRT1 in the recovery of cognitive abilities.
5. The RbAp48 protein, reduced during aging, has not been recovered after the application of any of the strategies studied, so it does not seem to play an essential role in the improvement of the described cognitive abilities.

7. ANEXOS

Anexo A. Programas de enriquecimiento ambiental, estrés moderado impredecible y dieta rica en antioxidantes

Tabla A1. Cronograma de los objetos proporcionados a los animales (desde 1 hasta 20 meses de edad) en el programa de enriquecimiento ambiental a largo plazo, así como los factores estresantes aplicados a los animales en el programa de estrés crónico moderado impredecible a largo plazo. Los objetos en el grupo de enriquecimiento ambiental se cambiaron una vez a la semana (normalmente los miércoles), coincidiendo con el cambio de las jaulas de los animales. En el caso de los animales sometidos a estrés, eran mantenidos en las condiciones de luz y temperatura estándar, salvo en los períodos de tiempo en los que se indica lo contrario.

Mes	Semana	Objetos enriquecimiento ambiental	Factores estresantes
1	1ª Semana	Tubos de cartón + cubos de plástico + tacos de madera	Ciclo de 1 h luz/ 1 h oscuridad (cambio cada hora) durante 3 días
	2ª Semana	Cajas de cartón + bolos de plástico + cuerdas	Temperatura a 16 °C durante 5 días
	3ª Semana	Tubos de pvc + bolas de papel con trozo de plátano (3 g) + cubos de plástico	Ciclo de luz/oscuridad 14/10 h durante 7 días
	4ª Semana	Tubos de cartón + bolos de plástico + tacos de madera	Globos llenos de agua colgados de las tapas de las jaulas
	5ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de manzana + pelotas de plástico	Alarma cada 30 minutos durante 3 días
2	6ª Semana	Tubos de cartón + cubos de plástico + cascabel	Temperatura a 26 °C durante 4 días
	7ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel + cuerdas + cascabel	Ciclo de luz/oscuridad 20/4 h durante 7 días
	8ª Semana	Tubos de pvc + pelotas de plástico + cuerdas	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días
	9ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de melocotón + aros de plástico	Alarma cada 30 minutos durante 3 días
3	10ª Semana	Tubos de plástico + pelotas de plástico + cuerdas	Ciclos de luz/oscuridad de 36/12 h durante 7 días
	11ª Semana	Cajas de cartón + tubos de cartón + tapones de plástico	Alarma cada 10 minutos durante 1 día y cada 30 minutos durante 2 días
	12ª Semana	Aros de plástico + bolas de papel con trozo de manzana (4 g) + tacos de madera	Temperatura a 16 °C durante 4 días + olor a lejía en la sala
	13ª Semana	Cajas de cartón + tubos de cartón + pelotas de plástico	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día durante 5 días
4	14ª Semana	Tubos de cartón + cajas de cartón + cuerdas	Ciclo de 1 h luz/ 1 h oscuridad (cambio cada hora) durante 3 días
	15ª Semana	Tubos de cartón + aros de plástico + juguete de plástico	Temperatura a 26 °C durante 5 días
	16ª Semana	Tubos de pvc + bolas de papel con aroma de cereza + cuerdas + cascabel	Ciclo de 8 h luz/ 8 h oscuridad (cambio cada 8 horas) durante 5 días
	17ª Semana	Cajas de cartón + tubos de cartón + cuerdas	Globos llenos de agua colgados de las tapas de las jaulas
5	18ª Semana	Tubos de cartón + pelotas de plástico + pelotas de madera	Canicas en lugar de viruta durante 2 días
	19ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel + tubos de pvc + cuerdas	Ciclos de luz/oscuridad de 36/12 h durante 5 días
	20ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel con trozo de naranja (3 g) + tacos de madera	Temperatura a 16 °C durante 4 días + alarma cada 2 horas durante 4 días
	21ª Semana	Cajas de cartón + aros de plástico + tapones de plástico	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días

6	22ª Semana	Tubos de cartón + cubos de plástico + cuerdas	Temperatura a 35 °C durante 5 horas 3 días seguidos
	23ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de manzana + cuerdas + cascabel	Ciclo de 5 h luz/ 5 h oscuridad (cambio cada 5 horas) durante 5 días
	24ª Semana	Tubos de pvc + pelotas de plástico + tacos de madera	Temperatura a 16 °C durante 4 días + olor a lejía en la sala
	25ª Semana	Tubos de cartón + tubos de plástico + aros de plástico	Alarma cada 30 minutos durante 3 días
	26ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con aroma de vainilla + cubos de plástico	Globos llenos de agua colgados de las tapas de las jaulas
7	27ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel + tacos de madera	Temperatura a 16 °C durante 4 días + alarma cada 2 horas durante 4 días
	28ª Semana	Cajas de cartón + tubos de cartón + cuerdas	Ciclos de luz/oscuridad de 36/12 h durante 5 días
	29ª Semana	Tubos de pvc + tapones de plástico + pelotas de plástico	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días
	30ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de cereza + cascabel	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día durante 5 días
8	31ª Semana	Tubos de cartón + tubos de plástico + aros de plástico	Ciclo de 1 h luz/ 1 h oscuridad (cambio cada hora) durante 3 días
	32ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de melocotón + tacos de madera	Alarma cada hora durante 5 días
	33ª Semana	Tubos de pvc + aros de plástico + cuerdas	Temperatura a 35 °C durante 5 horas 3 días seguidos
	34ª Semana	Cajas de cartón + tubos de plástico + cascabel	Ciclos de luz/oscuridad de 36/12 h durante 5 días
9	35ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel + pelotas de madera	Sin sistema de ventilación durante 1 día + alarma cada hora durante 3 días
	36ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel con aroma de vainilla + pelotas de plástico	Ciclo de 5 h luz/ 5 h oscuridad (cambio cada 5 horas) durante 5 días
	37ª Semana	Cajas de cartón + cubos de plástico + tapones de plástico	Oscilación de temperatura de 16 °C a 28 °C en 24 h durante 5 días
	38ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con trozo de naranja (4 g) + cuerdas	Ciclo de 3 h luz/ 3 h oscuridad (cambio cada 3 horas) durante 4 días
	39ª Semana	Tubos de plástico + tubos de pvc + tacos de madera	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días
10	40ª Semana	Cajas de cartón + aros de plástico + cuerdas	Viruta mojada durante 3 días + alarma cada hora durante 3 días
	41ª Semana	Tubos de cartón + bolos de plástico + cascabel	Luz continua durante 4 días
	42ª Semana	Cajas de cartón + tubos de pvc + pelotas de madera	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día durante 5 días
	43ª Semana	Aros de plástico + bolos de plástico + cuerdas + cascabel	Oscilación de temperatura de 16 °C a 28 °C en 24 h durante 5 días
11	44ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel con aroma de manzana + cascabel	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días
	45ª Semana	Tubos de cartón + tubos de plástico + tapones de plástico	Sin sistema de ventilación durante 1 día + alarma cada hora durante 3 días
	46ª Semana	Pelotas de plástico + cuerdas + tacos de madera	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días
	47ª Semana	Cajas de cartón + cubos de plástico + cuerdas	Ciclo de 5 h luz/ 5 h oscuridad (cambio cada 5 horas) durante 5 días
12	48ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con un trozo de manzana (3 g) + aros de plástico	Alarma cada hora durante 5 días
	49ª Semana	Tubos de plástico + aros de plástico + cuerdas	Oscilación de temperatura de 16 °C a 28 °C en 24 h durante 5 días

	50ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con aroma de cereza + pelotas de plástico	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día durante 5 días
	51ª Semana	Tubos de plástico + bolos de plástico + cuerdas	Luz continua durante 4 días + sin acceso al agua durante 1 día
13	52ª Semana	Cajas de cartón + tubos de pvc + tacos de madera	Temperatura a 27 °C durante 5 días
	53ª Semana	Tubos de cartón + pelotas de plástico + aros de plástico	Ciclo de luz/oscuridad 20/4 h durante 5 días
	54ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel con aroma de melocotón + bolos de plástico	Viruta mojada durante 3 días + alarma cada hora durante 3 días
	55ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel + cubos de plástico	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días
14	56ª Semana	Cajas de cartón + tapones de plástico + cuerdas	Temperatura a 15 °C durante 5 días
	57ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con trozo de plátano (4 g) + pelotas de madera	Ciclo de luz/oscuridad 6/18 h durante 5 días
	58ª Semana	Tubos de cartón + tubos de pvc + aros de plástico	Ciclo de 5 h luz/ 5 h oscuridad (cambio cada 5 horas) durante 5 días
	59ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel + pelotas de plástico	Viruta mojada durante 3 días + alarma cada hora durante 3 días
	60ª Semana	Tubos de pvc + aros de plástico + cuerdas	Luz continua durante 4 días
15	61ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con nueces (3 g) + aros de plástico	Temperatura a 16 °C durante 5 días
	62ª Semana	Cajas de cartón + bolos de plástico + cascabel	Canicas en lugar de viruta durante 2 días
	63ª Semana	Pelotas de plástico + tapones de plástico + tacos de madera	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días
	64ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con almendras (3 g) + aros de plástico	Globos llenos de agua colgados de las tapas de las jaulas
16	65ª Semana	Tubos de plástico + pelotas de plástico + cuerdas	Ciclos de luz/oscuridad de 36/12 h durante 5 días
	66ª Semana	Cajas de cartón + tapones de plástico + cubos de plástico	Alarma cada 45 minutos durante 3 días
	67ª Semana	Tubos de pvc + bolas de papel + pelotas de madera	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días
	68ª Semana	Tubos de plástico + bolos de plástico + cascabel	Oscilación de temperatura de 16 °C a 28 °C en 24 h durante 5 días
17	69ª Semana	Tubos de cartón + aros de plástico + cuerdas	Ciclo de 5 h luz/ 5 h oscuridad (cambio cada 5 horas) durante 5 días
	70ª Semana	Tubos de pvc + bolas de papel con almendras (4 g) + tacos de madera	Viruta mojada durante 3 días + alarma cada hora durante 3 días
	71ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel con aroma de vainilla + pelotas de plástico	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días
	72ª Semana	Cajas de cartón + aros de plástico + cubos de plástico	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días
	73ª Semana	Tubos de cartón + pelotas de plástico + bolos de plástico	Sin acceso al agua (lunes, miércoles y viernes)
18	74ª Semana	Tubos de plástico + tapones de plástico + cuerdas + cascabel	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días
	75ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de cereza + pelotas de plástico	Ciclo de luz/oscuridad 20/4 h durante 5 días
	76ª Semana	Tubos de cartón + cubos de plástico + tacos de madera	Viruta mojada durante 3 días + alarma cada hora durante 3 días
	77ª Semana	Tubos de plástico + aros de plástico + cuerdas	Alarma cada 45 minutos durante 3 días
19	78ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con plátano (3 g) + tacos de madera	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días

	79ª Semana	Cajas de cartón + bolos de plástico + cascabel	Sin acceso al agua (lunes, miércoles y viernes)
	80ª Semana	Tubos de pvc + bolas de papel con trozo de naranja (3 g) + cuerdas	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días
	81ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel + cubos de plástico + pelotas de madera	Ciclo de 1 h luz/ 1 h oscuridad (cambio cada hora) durante 3 días
20	82ª Semana	Tubos de cartón + aros de plástico + bolos de plástico + cuerdas	Viruta mojada durante 3 días + alarma cada hora durante 3 días
	83ª Semana	Sacrificio de los animales	Sacrificio de los animales

Tabla A2. Cronograma de los objetos proporcionados a los animales (desde 7 hasta 20 meses de edad) en el programa de enriquecimiento ambiental intermedio, así como los factores estresantes aplicados a los animales en el programa de estrés crónico moderado impredecible. Los objetos en el grupo de enriquecimiento ambiental se cambiaron dos veces a la semana (normalmente los lunes y los jueves). En el caso de los animales sometidos a estrés, eran mantenidos en las condiciones de luz y temperatura estándar, salvo en los períodos de tiempo en los que se indica lo contrario.

Mes	Semana	Objetos enriquecimiento ambiental	Factores estresantes
7	1ª Semana	Aros de plástico + pelotas de plástico + cascabel	Luz continua durante 3 días
		Tubos de cartón + cubos de plástico + cuerdas	Ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h + alarma cada 2 horas durante 3 días
	2ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de vainilla	Canicas en lugar de viruta durante 2 días
		Tubos de pvc + pelotas de plástico + tacos de madera	Sin acceso al agua durante 1 día + temperatura a 18 °C durante 1 día
	3ª Semana	Tubos de plástico + bolos de plástico + cuerdas	Alarma cada 30 minutos durante 2 días
		Aros de plástico + bolas de papel con trozo naranja (3 g) + cascabel	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 4 días
	4ª Semana	Cajas de cartón + pelotas de plástico + tacos de madera	Ciclo de luz/oscuridad de 18/6 h durante 5 días
Tubos de cartón + bolas de papel con aroma de cereza + aros de plástico		Temperatura a 16 °C durante 2 días	
8	5ª Semana	Tubos de plástico + bolos de plástico + cuerdas	Ciclo de luz/oscuridad de 8/16 h durante 5 días
		Cajas de cartón + tapones de plástico + cascabel	Temperatura a 25 °C durante 5 días
	6ª Semana	Aros de plástico + cubos de plástico + tacos de madera	Alarma cada 20 minutos durante 1 día
		Tubos de cartón + pelotas de plástico + cuerdas	Ciclo de 1 h luz/ 1 h oscuridad (cambio cada hora) durante 3 días
	7ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de melocotón + cascabel	Alarma cada 30 minutos durante 2 días + temperatura a 16 °C durante 2 días
		Tubos de pvc + aros de plástico + tacos de madera	Ciclo luz/oscuridad de 20/4 h durante 5 días
	8ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel con trozo de manzana (4 g) + cascabel	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 5 días
		Tapones de plástico + pelotas plástico + cuerdas	Temperatura a 26 °C durante 4 días
	9ª Semana	Tubos de pvc + bolas de papel con aroma de cereza + aros de plástico	Ciclo de 5 h luz/ 5 h oscuridad (cambio cada 5 horas) durante 3 días
		Tubos de plástico + cubos de plástico + tacos de madera	Alarma cada 45 minutos durante 1 día
9	10ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con aroma de manzana + cuerdas	Globos llenos de agua colgados de las tapas de las jaulas
		Cajas de cartón + aros de plástico + cascabel	Temperatura a 15 °C durante 4 días

	11ª Semana	Pelotas de plástico + cuerdas + tacos de madera	Luz continua durante 3 días + sin acceso al agua durante 1 día
		Tubos de cartón + bolas de papel con trozo de plátano (4 g) + aros de plástico	Canicas en lugar de viruta durante 2 días
	12ª Semana	Cajas de cartón + tubos de plástico + cuerdas	Ciclo de 5 h luz/ 5 h oscuridad (cambio cada 5 horas) durante 5 días
		Tubos de plástico + cubos de plástico + tacos de madera	Alarma cada 20 minutos durante 1 día
	13ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con trozo de manzana (4 g) + cuerdas	Ciclos de luz/oscuridad de 36/12 h durante 5 días
		Tubos de cartón + aros de plástico + tacos de madera	Temperatura a 26 °C durante 4 días
10	14ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel + cuerdas + cascabel	Alarma cada 45 minutos durante 2 días
		Cajas de cartón + pelotas de plástico + tacos de madera	Sin acceso al agua durante 1 día
	15ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con aroma de vainilla + aros de plástico	Ciclo de luz/oscuridad 14/10 h durante 7 días
		Tubos de plástico + cubos de plástico + tacos de madera	Alarma cada 30 minutos durante 2 días
	16ª Semana	Cajas de cartón + tapones de plástico + cuerdas	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 4 días
		Tubos de plástico + bolas de papel con trozo de naranja (3 g) + cascabel	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día
	17ª Semana	Tubos de pvc + pelotas de plástico + tacos de madera	Globos llenos de agua colgados de las tapas de las jaulas
		Tubos de cartón + bolas de papel + cubos de plástico	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días
	11	18ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con trozo de plátano (3 g) + cuerdas
Aros de plástico + bolos de plástico + tacos de madera			Ciclo de luz/oscuridad 20/4 h durante 4 días
19ª Semana		Tubos de cartón + bolas de papel + tapones de plástico	Canicas en lugar de viruta durante 2 días
		Tubos de plástico + pelotas de plástico + cascabel	Ciclo de 1 h luz/ 1 h oscuridad (cambio cada hora) durante 3 días
20ª Semana		Tubos de pvc + aros de plástico + tacos de madera	Temperatura a 16 °C durante 4 días + alarma cada 2 horas durante 4 días
		Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de vainilla	Sin acceso al agua durante 1 día
21ª Semana		Tubos de cartón + bolas de papel con almendras (3 g)	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día
	Tubos de plástico + pelotas de plástico + cuerdas	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días	
12	22ª Semana	Tubos de pvc + tapones de plástico + aros de plástico	Temperatura a 25 °C durante 5 días
		Cajas de cartón + bolas de papel + tacos de madera	Ciclos de luz/oscuridad de 36/12 h durante 5 días
	23ª Semana	Tubos de cartón + pelotas de plástico + cuerdas	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 4 días
		Aros de plástico + bolos de plástico + tacos de madera	Luz continua durante 3 días
	24ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con aroma de manzana	Temperatura a 16 °C durante 5 días
		Cubos de plástico + tapones de plástico + cuerdas	Viruta mojada durante 3 días
	25ª Semana	Tubos de pvc + pelotas de plástico + tacos de madera	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día
Tubos de plástico + aros de plástico + cascabel		Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días	
13	26ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con nueces (3 g) + aros de plástico	Alarma cada 45 minutos durante 1 día
		Cajas de cartón + bolos de plástico + pelotas de madera	Temperatura a 35 °C durante 5 horas 3 días seguidos

	27ª Semana	Tubos de plástico + bolas de papel + cuerdas	Canicas en lugar de viruta durante 2 días
		Tubos de cartón + cubos de plástico + aros de plástico	Luz continua durante 3 días
	28ª Semana	Tubos de pvc + bolos de plástico + cuerdas	Temperatura a 16 °C durante 4 días + alarma cada 2 horas durante 4 días
		Cajas de cartón + tapones de plástico + cubos de plástico	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 4 días
	29ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con nueces (3 g) + aros de plástico	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día
		Tubos de pvc + bolas de papel + tacos de madera	Temperatura a 25 °C durante 5 días
30ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con almendras (3 g) + aros de plástico	Alarma cada 45 minutos durante 1 día	
	Tubos de plástico + tapones de plástico + cascabel	Ciclos de luz/oscuridad de 36/12 h durante 5 días	
14	31ª Semana	Tubos de cartón + aros de plástico + cuerdas	Temperatura a 16 °C durante 5 días
		Tubos de pvc + bolas de papel + tacos de madera	Ciclo de 1 h luz/ 1 h oscuridad (cambio cada hora) durante 3 días
	32ª Semana	Cajas de cartón + tapones de plástico + aros de plástico	Temperatura a 35 °C durante 5 horas 3 días seguidos
		Tubos de cartón + bolas de papel con trozo de manzana (3 g) + cuerdas	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día durante 3 días
	33ª Semana	Tubos de pvc + bolos de plástico + pelotas de plástico	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 4 días
		Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de cereza + cascabel	Ciclo de 5 h luz/ 5 h oscuridad (cambio cada 5 horas) durante 3 días
34ª Semana	Tubos de plástico + aros de plástico + tacos de madera	Viruta mojada durante 3 días	
	Tubos de pvc + cubos de plástico + cuerdas	Luz continua durante 3 días	
15	35ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel + cascabel	Temperatura a 16 °C durante 4 días
		Tubos de plástico + tapones de plástico + tacos de madera	Canicas en lugar de viruta durante 2 días
	36ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con trozo de naranja (4 g) + cubos de plástico	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días
		Aros de plástico + bolos de plástico + tacos de madera	Globos llenos de agua colgados de las tapas de las jaulas
	37ª Semana	Tubos de cartón + cubos de plástico + cuerdas	Ciclos de luz/oscuridad de 36/12 h durante 5 días
		Tubos de plástico + bolas de papel + aros de plástico	Alarma cada 45 minutos durante 1 día
38ª Semana	Cajas de cartón + cuerdas + cascabel	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 4 días	
	Tubos de pvc + bolas de papel con aroma de vainilla + tacos de madera	Temperatura a 35 °C durante 12 horas	
16	39ª Semana	Tubos de plástico + pelotas de plástico + cuerdas	Temperatura a 16 °C durante 4 días + alarma cada 2 horas durante 4 días
		Tubos de cartón + tapones de plástico + pelotas de madera	Luz continua durante 3 días
	40ª Semana	Tubos de plástico + bolos de plástico + cascabel	Temperatura a 27 °C durante 4 días
		Cajas de cartón + bolas de papel + tapones de plástico	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día
	41ª Semana	Tubos de cartón + bolas de papel con trozo de plátano (4 g) + aros de plástico	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días
		Tubos de pvc + pelotas de plástico + tacos de madera	Oscilación de temperatura de 16 °C a 28 °C en 24 h durante 4 días
42ª Semana	Aros de plástico + tapones de plástico + cuerdas	Viruta mojada durante 3 días	
	Tubos de cartón + cubos de plástico + pelotas de madera	Sin acceso al agua durante 1 día + temperatura a 18 °C durante 3 días	
17	43ª Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de melocotón + cascabel	Ciclos de luz/oscuridad de 36/12 h durante 5 días
		Tubos de cartón + bolos de plástico + tapones de plástico	Globos llenos de agua colgados de las tapas de las jaulas

	44 ^a Semana	Tubos de pvc + aros de plástico + tacos de madera	Ciclo de 5 h luz/ 5 h oscuridad (cambio cada 5 horas) durante 3 días	
		Tubos de plástico + bolas de papel + cuerdas	Temperatura a 27 °C durante 4 días	
	45 ^a Semana	Tubos de cartón + pelotas de plástico + cascabel	Viruta mojada durante 3 días	
		Cajas de cartón + bolas de papel con trozo de naranja (3 g) + tacos de madera	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días	
	46 ^a Semana	Tapones de plástico + bolos de plástico + cuerdas	Temperatura a 16 °C durante 4 días	
		Tubos de pvc + aros de plástico	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 4 días	
18	47 ^a Semana	Cubos de plástico + tapones de plástico + pelotas de madera	Ciclo de 1 h luz/ 1 h oscuridad (cambio cada hora) durante 3 días	
		Tubos de plástico + bolas de papel con aroma de vainilla + bolos de plástico	Temperatura a 35 °C durante 12 horas	
	48 ^a Semana	Tubos de cartón + aros de plástico + cascabel	Alarma cada hora durante 3 días	
		Cubos de plástico + tapones de plástico + pelotas de madera	Ciclos de luz/oscuridad de 20/4 h durante 5 días	
	49 ^a Semana	Tubos de pvc + bolas de papel + cuerdas	Oscilación de temperatura de 16 °C a 28 °C en 24 h durante 4 días	
		Tubos de cartón + cubos de plástico + pelotas de plástico	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 4 días	
	50 ^a Semana	Cajas de cartón + bolas de papel con trozo de manzana (3 g) + tacos de madera	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días	
		Tubos de plástico + aros de plástico + cuerdas	Viruta mojada durante 3 días	
	51 ^a Semana	Tapones de plástico + pelotas de madera + cascabel	Alarma cada hora durante 3 días	
		Tubos de pvc + bolas de papel con aroma de cereza + aros de plástico	Temperatura a 16 °C durante 5 días	
	19	52 ^a Semana	Tubos de cartón + bolos de plástico + tapones de plástico	Ciclos de luz/oscuridad de 20/4 h durante 5 días
			Tubos de plástico + bolas de papel + cuerdas	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 4 días
53 ^a Semana		Cajas de cartón + aros de plástico + tacos de madera	Temperatura a 35 °C durante 12 horas	
		Tubos de pvc + pelotas de plástico + cascabel	Alarma cada hora durante 3 días	
54 ^a Semana		Tubos de cartón + bolas de papel con aroma de vainilla + aros de plástico	Ciclo de luz/oscuridad 8/16 h durante 5 días	
		Tubos de plástico + cubos de plástico + tacos de madera	Oscilación de temperatura de 16 °C a 28 °C en 24 h durante 5 días	
55 ^a Semana		Cajas de cartón + bolas de papel + bolos de plástico	Viruta mojada durante 3 días	
		Tubos de pvc + aros de plástico + pelotas de madera	Alarma cada hora durante 3 días	
20	56 ^a Semana	Tubos de plástico + bolas de papel con trozo de naranja (3 g) + cascabel	Luz continua durante 3 días	
		Tubos de cartón + aros de plástico + bolos de plástico + cuerdas	Ruido estridente durante 3 minutos / 6 veces al día	
	57 ^a Semana	Tubos de pvc + cubos de plástico + tacos de madera	Pulverizador de agua, al menos 5 veces al día, durante 4 días	
		Cajas de cartón + bolas de papel con aroma de melocotón + pelotas de plástico	Ciclo de 5 h luz/ 5 h oscuridad (cambio cada 5 horas) durante 3 días	
	58 ^a Semana	Tubos de cartón + aros de plástico + cuerdas	Temperatura a 35 °C durante 6 horas	
		Sacrificio de los animales	Sacrificio de los animales	

Tabla A3. Cronograma de los objetos proporcionados a los animales (desde 18.5 hasta 20 meses de edad) en el programa de enriquecimiento ambiental en animales viejos. Los objetos en el grupo de enriquecimiento ambiental se cambiaron tres veces por semana (normalmente lunes, miércoles y viernes).

Semana	Días	Objetos enriquecimiento ambiental
1	Viernes	Tubos de cartón + aros de plástico + cubos de plástico
	Lunes	Tubos de pvc + bolas de papel + pelotas de madera + trozo de tela
	Miércoles	Tubos de plástico + bolas de papel + cubos de plástico + tacos de madera
2	Viernes	Tubo de cartón + tubo de plástico + bolas de papel con trozo de manzana (3 g) + aros de plástico
	Lunes	Tubos de pvc + bolas de papel con aroma de cereza + cubos de plástico + tacos madera
	Miércoles	Tubo de cartón + tubo de plástico + cuerdas + pelotas de madera
3	Viernes	Tubos de pvc + bolas de papel con aroma de canela + cubos de plástico + aros de plástico
	Lunes	Tubos de cartón + bolas de papel con trozo de plátano (3 g) + cuerdas
	Miércoles	Tubos de plástico + bolas de papel + taco de madera + pelotas de plástico
4	Viernes	Tubos de cartón + aros de plástico + cuerdas + trozo de tela
	Lunes	Tubo de pvc + tubo de plástico + tubo de cartón + tacos de madera
	Miércoles	Tubos de cartón + bolas de papel con aroma de cereza + cuerdas + aros de plástico
5	Viernes	Tubos de cartón + bolas de papel con trozo de manzana (3 g) + cubo de plástico
	Lunes	Tubo de plástico + pelota de plástico + tacos de madera + trozo de tela
	Miércoles	Tubos de cartón + bolas de papel con aroma de cereza + cuerdas + aros de plástico
6	Viernes	Tubo de plástico + tubo de cartón + tacos de madera + trozo de tela
	Lunes	Tubos de cartón + bolas de papel con aroma de vainilla + pelotas de plástico
	Miércoles	Tubos de pvc + bolas de papel con aroma de cereza + cubos de plástico + tacos madera
7	Viernes	Sacrificio de los animales

Tabla A4. Cronograma de los alimentos, así como su cantidad, proporcionados a los animales sometidos a una dieta rica en antioxidantes (a partir de los 14 meses de edad de los animales), tanto en el grupo Dieta como en el grupo Dieta + EA.

Semana	Día	Alimento y cantidad para cada animal
1	Lunes	Surtido de cereza, fresa, grosella y mora (15 g) + Mandarina (5 g)
	Miércoles	Plátano (10 g) + Manzana (10 g) + Zumo de granada, cereza, mora, manzana, uva y frambuesa (25 ml diluido en 25 ml agua)
	Viernes	Mandarina (5 g) + Ciruela (10 g) + Cereales de arroz y trigo con chocolate (10 g)
2	Lunes	Piña (20 g) + Zumo de manzana, melocotón, piña, mango (70 ml diluido en 30 ml agua)
	Miércoles	Cacahuets (5 g) + Nueces (5 g) + Copos de avena (15 g)
	Viernes	Cereales de arroz y trigo con fresa y mora (20 g) + Té rojo con frambuesa y fresa (60 ml)

3	Lunes	Nueces (5 g) + Mandarina (5 g) + Ciruela (5 g) + Surtido de fresa, cereza, arándanos y mora (10 g)
	Miércoles	Cacahuets (10 g) + Plátano (10 g) + Zumo de manzana, melocotón, piña, mango (40 ml diluido en 20 ml agua)
	Viernes	Nueces (5 g) + Plátano (5 g) + Naranja (5 g) + Tomate (10 g)
4	Lunes	Pan (10 g) + Aceite de oliva (1/2 cuchara) + Tomate (10 g)
	Miércoles	Ciruela (10 g) + Cacahuets (5 g) + Uva (10 g)
	Viernes	Uvas (12 g) + Maíz (2 g) + Pan (10 g) + Té rojo con ciruela (60 ml)
5	Lunes	Tomate (5 g) + Nueces (5 g) + Uvas (10 g) + Maíz (2 g)
	Miércoles	Tomate (10 g) + Aceite de oliva (1/2 cuchara pequeña) + Cereales de arroz y trigo con chocolate (15 g)
	Viernes	Papaya con uvas (15 g) + Pipas de calabaza y pipas de girasol (10 g) + Té rojo con frambuesa y fresa (70 ml)
6	Lunes	Uvas (5 g) + Nueces (5 g) + Mandarina (5 g) + Tomate (5 g)
	Miércoles	Cereales de arroz y trigo con chocolate (20 g) + Nueces (5 g)
	Viernes	Uvas (10 g) + Nueces (10 g) + Zumo de naranja (30 ml + 20 ml agua)
7	Lunes	Cereales de arroz y trigo con fresa y mora (20 g) + Té verde con vainilla (70 ml)
	Miércoles	Surtido de brócoli y zanahoria (10 g) + Cereales de arroz y trigo con fresa y mora (10 g) + Nueces (4 g)
	Viernes	Brócoli (10 g) + Uva (10 g) + Zumo de granada, cereza, mora, manzana, uva y frambuesa (40 ml diluido en 30 ml agua)
8	Lunes	Surtido de zanahoria, brócoli y coliflor (20 g) + Pan (5 g)
	Miércoles	Uva (10 g) + Surtido de nueces, pasas, albaricoques, pipas de calabaza y almendra (10 g) + Té blanco (60 ml)
	Viernes	Copos de avena (20 g) + Zumo de granada, cereza, mora, manzana, uva y frambuesa (30 ml diluido en 20 ml agua)
9	Lunes	Surtido de nueces, pasas, albaricoques, pipas de calabaza y almendra (10 g) + Chocolate con almendras (10 g)
	Miércoles	Surtido de fresa, cereza, arándanos y mora (10 g) + Pan (5 g) + Tomate (5 g) + Aceite de oliva (1/2 cucharada)
	Viernes	Surtido de zanahoria, brócoli y coliflor (10 g) + Cereales de arroz y trigo con fresa y mora (15 g) + Té verde con limón (70 ml)
10	Lunes	Pipas de girasol (5 g) + Copos de avena (20 g) + Zumo de uva, fresa, cereza, arándanos y mora (5 ml diluido en 45 ml agua)
	Miércoles	Manzana (20 g) + Chocolate con almendras (5 g)
	Viernes	Copos de avena (22 g) + Pimiento verde (3 g) + Té rojo con fresa, cereza y manzana (60 ml)
11	Lunes	Surtido de brócoli, coliflor y zanahoria (22 g) + Zumo de arándanos, grosella y saúco (30 ml diluido en 20 ml agua)
	Miércoles	Surtido de fresa, cereza, grosella y mora (15 g) + Surtido de pipas de calabaza, almendras y nueces (5 g)
	Viernes	Copos de avena (10 g) + Pistachos (5 g) + Surtido de zanahoria, brócoli y coliflor (10 g) + Zumo de uva (10 ml)
12	Lunes	Cereales de arroz y trigo con fresa y mora (10 g) + Copos de avena (10 g) + Té verde con limón (60 ml)
	Miércoles	Cereales de arroz y trigo con fresa y mora (15 g) + Surtido de almendras y pistachos (5 g)
	Viernes	Tomate (10 g) + Lechuga (5 g) + Surtido de cereza, fresa y mora (8 g) + Té verde (60 ml)
13	Lunes	Surtido de cereza, fresa y mora (10 g) + Copos de avena (10 g) + Surtido de pipas de calabaza, almendras y nueces (5g)
	Miércoles	Cereales de arroz y trigo con fresa y mora (10 g) + Surtido de brócoli, zanahoria y coliflor (15 g)
	Viernes	Manzana (25 g) + Zumo de uva, fresa, cereza, arándanos y mora (40 ml diluido en 30 ml agua)

14	Lunes	Surtido de cereza, fresa y mora (8 g) + Copos de avena (15 g)
	Miércoles	Cereales de arroz y trigo con fresa y mora (15 g) + Pipas de girasol (10 g)
	Viernes	Surtido de brócoli, coliflor y zanahoria (20 g) + Manzana (5 g) + Té verde (70 ml)
15	Lunes	Naranja (20 g) + Zumo de arándanos (30 ml diluido en 30 ml agua)
	Miércoles	Pan (10 g) + aceite de oliva (1/2 cucharada) + Tomate (10 g) + Surtido de pipas de calabaza, almendras y nueces (5 g)
	Viernes	Cereales de avena con fresa y mora (15 g) + Naranja (10 g) + Té verde con limón (70 ml)
16	Lunes	Manzana (10 g) + Fresas (10 g) + Ciruelas (5 g)
	Miércoles	Surtido de patata, zanahoria y judía verde (10 g) + Aceite de oliva (1/2 cucharada) + Cereal de trigo (10 g)
	Viernes	Tomate (5 g) + Cereales de avena con fresa y mora (15 g) + Té rojo con fresa, cereza y manzana (70 ml)
17	Lunes	Pipas de calabaza (10 g) + Zanahoria (10 g) + Ciruelas (5 g)
	Miércoles	Surtido de pipas de calabaza, almendras y nueces (15 g) + Copos de avena (10 g)
	Viernes	Lechuga (5 g) + Tomate (15 g) + Zumo de uva, fresa, cereza, arándanos y mora (40 ml diluido en 30 ml agua)
18	Lunes	Cereza (3 g) + Manzana (20 g) + Zumo de uva, fresa, cereza, arándanos y mora (30 ml diluido en 40 ml agua)
	Miércoles	Surtido de brócoli, coliflor y zanahoria (20 g) + Surtido de cereza, fresa y mora (5 g)
	Viernes	Champiñones (15 g) + Maíz (5 g) + Pimiento verde (5 g) + Té verde (70 ml)
19	Lunes	Pipas de calabaza (10 g) + Almendras (10 g) + Plátano (5 g)
	Miércoles	Chocolate con naranja (5 g) + Arándanos (10 g) + Uvas (5 g) + Zumo de fresa y cereza (40 ml diluido en 30 ml agua)
	Viernes	Manzana (15 g) + Surtido de pipas de calabaza, almendras y nueces (10 g) + Té negro (70 ml)
20	Lunes	Manzana (5 g) + Surtido de cereza, fresa y mora (15 g) + Zumo de fresa y cereza (40 ml diluido en 30 ml agua)
	Miércoles	Surtido de judías, brócoli y zanahoria (15 g) + Pimiento verde (5 g) + Guisantes (5 g)
	Viernes	Surtido de cereza, fresa y mora (15 g) + Surtido de pipas de calabaza, almendras y nueces (10 g) + Té verde y negro (70 ml)

Anexo B. Publicaciones relacionadas con la tesis

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

Publicaciones

Ramis MR, Sarubbo F, Terrasa JL, Moranta D, Aparicio S, Miralles A, Esteban S. Chronic α -tocopherol increases central monoamines synthesis and improves cognitive and motor abilities in old rats. *Rejuvenation Res.*, 2016; 19(2): 159-171

Ramis MR, Sarubbo F, Tejada S, Jiménez M, Esteban S, Miralles A, Moranta D. Chronic Polyphenon-60 or Catechin treatments increase brain monoamines syntheses and hippocampal SIRT1 levels improving cognition in aged rats. *Nutrients*, 2020; 12(2): 326

Ramis MR, Sarubbo F, Moranta D, Tejada S, Lladó J, Miralles A, Esteban S. Cognitive and neurochemical changes following polyphenol-enriched diet in rats. *Nutrients*, 2021; 13(1): 59

Ramis MR, Sarubbo F, Moranta D, Tejada S, Lladó J, Miralles A, Esteban S. Neurochemical and cognitive beneficial effects of moderate physical activity and catechin in aged rats. *Antioxidants*, 2021; 10(4): 621

Manuscritos en preparación de los resultados de esta tesis:

Ramis MR et al. Effects of environmental enrichment programs preventing aging cognitive decline in rats. Behavioral and neurochemical study. En preparación

Ramis MR et al. Impact of unpredictable long-term mild stress on memory and monoaminergic systems. En preparación

Otras publicaciones

Ramis MR, Esteban S, Miralles A, Tan D-X, Reiter RJ. Protective effects of melatonin and mitochondria-targeted antioxidants against oxidative stress: A review. *Curr Med Chem.*, 2015; 22 (22): 2690-2711

Ramis MR, Esteban S, Miralles A, Tan D-X, Reiter RJ. Caloric restriction, resveratrol and melatonin: role of SIRT1 and implications for ageing and related-diseases. *Mech Ageing Dev.*, 2015; 146 -148: 28-41

Ramis M, Sarubbo F, Sola J, Aparicio S, Garau C, Miralles A, Esteban S. Cognitive improvement by acute growth hormone is mediated by NMDA and AMPA receptors and MEK pathway. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013; 45: 11-20

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

Sarubbo F, Ramis MR, Kienzer C, Aparicio S, Esteban S, Miralles A, Moranta D. Chronic silymarin, quercetin and naringenin treatments increase monoamines synthesis and hippocampal Sirt1 levels improving cognition in aged rats. *J Neuroimmune Pharmacol.*, 2018; 13(1): 24-38

Esteban S, Garau C, Aparicio S, Moranta D, Barcelo P, Ramis M, Tresguerres JA, Rial R. Improving effects of long-term growth hormone treatment on monoaminergic neurotransmission and related behavioral tests in aged rats. *Rejuvenation Res.*, 2010; 13: 707-716

Moranta D, Barcelo P, Aparicio S, Garau C, Sarubbo F, Ramis M, Nicolau C, Esteban S. Intake of melatonin increases tryptophan hydroxylase type 1 activity in aged rats: Preliminary study. *Exp Gerontol.*, 2014; 49: 1-4

Comunicaciones en congresos

Ramis M, Sarubbo F, Terrasa JL, Moranta D, Aparicio S, Miralles A, Reiter RJ, Esteban S. Effects of polyphenol treatments and environmental enrichment programs preventing aging cognitive decline in rats. 43 Annual Meeting of American Aging Association, San Antonio - Texas, Estados Unidos, 30 mayo - 2 junio 2014

Ramis M, Miralles A, Terrasa JL, Sarubbo F, Aparicio S, Esteban S. Comparative effects of trans-resveratrol and α -Tocopherol chronic treatment on cognitive ability in aged rats. Joint FEPS & XXXVI Spanish Physiological Society Congress 2012, Santiago de Compostela, España, 8-11 septiembre 2012

Esteban S, Terrasa JL, Ramis M, Sarubbo F, Miralles A, Aparicio S. Effects of chronic treatment with α -tocopherol on cognitive abilities in old rats. 45th European Brain and Behaviour Society Meeting, Munich, Alemania, 6-9 septiembre 2013

Miralles A, Ramis MR, Sarubbo F, Ullate J, Moranta D, Esteban S. Improvement of cognitive abilities by α -tocopherol in old rats was paralleled with modulation of SIRT1 in the hippocampus. II International Congress of Psychobiology, Ávila, España, 19-21 julio 2017

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

Moranta D, Ramis M, Sarubbo F, Aparicio S, Esteban S, Miralles A. Long-term treatment with polyphenon 60 or catechin improves cognition in aged rats, and revert the age-induced reduction of SIRT1 protein in rat hippocampus. II International Congress of Psychobiology, Ávila, España, 19-21 julio 2017

Miralles A, Ramis M, Sarubbo F, Aparicio S, Moranta D, Esteban S. Effect of catechin on central monoamines synthesis, SIRT1 expression and cognition in aged rats. 10th Forum Neuroscience (FENS), Copenhagen, Dinamarca, 2-6 julio 2016

Esteban S, Ramis MR, Sarubbo S, Barceló M, Moranta D, Miralles A. Effect of diet rich in antioxidants on central monoamines synthesis, SIRT1 expression and cognition in aged rats. 10th Forum Neuroscience (FENS), Copenhagen, Dinamarca, 2-6 julio 2016.

Ramis M, Sarubbo F, Terrasa JL, Aparicio S, Miralles A, Esteban S. Effects of early long term enrichment program on cognitive abilities in aged rats. 45th European Brain and Behaviour Society Meeting, Munich, Alemania, 6-9 septiembre 2013

Miralles A, Ramis M, Sarubbo F, Terrasa JL, Arbona L, Esteban S. Comparison of enrichment and impoverishment environmental programs on cognitive abilities in adult rats. 45th European Brain and Behaviour Society Meeting, Munich, Alemania, 6-9 septiembre 2013

Esteban S, Ramis MR, Sarubbo F, Ruiz L, Rojic D, Aparicio S, Miralles A. Effect of early long term enrichment program on central monoamines synthesis and cognition in aged rats. Meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) 2015 congress, Kaunas, Lituania, 26-29 agosto 2015

Ramis MR, Sarubbo F, Lynton E, López N, Enseñat MA, Miralles A, Esteban S. Effect of chronic exercise on central monoamines synthesis and cognition in aged rats. Meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) 2015 congress, Kaunas, Lituania, 26-29 agosto 2015

Esteban S, Hernández-Hernández E, Montserrat FP, de la Cruz AB, Cabot A, Ramis MR, Miralles A, Moranta D. Motherhood improves cognition in female aged rats. Role of 5-HT1A receptors. II International Congress of Psychobiology, Ávila, España, 19-21 julio 2017

8. BIBLIOGRAFÍA

Las referencias bibliográficas utilizadas a lo largo del desarrollo de la tesis doctoral han sido:

Abbas S, Wink M. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.*, 2009; 75(3): 216-221

Abbot A. Aging: growing old gracefully. *Nature*, 2004; 428: 116-118

Abe-Higuchi N, Uchida S, Yamagata H, Higuchi F, Hobara T, Hara K, Kobayashi A, Watanabe Y. Hippocampal sirtuin 1 signaling mediates depression-like behavior. *Biol Psychiatry.*, 2016; 80(11): 815-826

Abercrombie ED, Keefe KA, Daniel SD, Zigmond MJ. Differential effects of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem.*, 1989; 52: 1655-1658

Abercrombie ED, Keller RW Jr, Zigmond MJ. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. *Neuroscience*, 1988; 27: 897-904

Abraham J, Johnson R. Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice. *Rejuvenation Res.*, 2009; 12(6): 445-453

Acosta S, Jernberg J, Sanberg CD, Sanberg PR, Small BJ, Gemma C, Bickford PC. NT-020, a natural therapeutic approach to optimize spatial memory performance and increase neural progenitor cell proliferation and decrease inflammation in the aged rat. *Rejuvenation Res.*, 2010; 13(5): 581-588

Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res.*, 2001; 30(2): 65-74

Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menéndez-Peláez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res.*, 1994; 16(2): 100-112

Adachi K, Izumi M, Mitsuma T. Effect of vitamin E deficiency on rat brain monoamine metabolism. *Neurochem Res.*, 1999; 24:1307-1311

Adams W, Kusljic S, Van den Buuse M. Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: effects on locomotor hyperactivity, prepulse inhibition and learning and memory. *Neuropharmacology*, 2008; 55: 1048-1055

Adler A, Sinha S, Kawahara T, Zhang J, Segal E, Chang H. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- κ B activity. *Genes Dev.*, 2007; 21(24): 3244-3257

Adler UC, Marques AH, Calil HM. Inflammatory aspects of depression. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2008; 7(1): 19-23

Ahlskog JE, Geda YE, Graff-Radford NR, Petersen RC. Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin Proc.*, 2011; 86: 876-878

Alexeyev MF, Ledoux SP, Wilson GL. Mitochondrial DNA and aging. *Clin Sci. (Lond)*, 2004; 107(4): 355-364

Allard JS, Perez E, Zou S, de Cabo R. Dietary activators of Sirt1. *Mol Cell Endocrinol.*, 2009; 299(1): 58-63

Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res.*, 2003; 34(1): 1-10

Álvaro-Bartolomé M, Esteban S, García-Gutiérrez MS, Manzanares J, Valverde O, García-Sevilla JA. Regulation of Fas receptor/Fas-associated protein with death domain apoptotic complex and associated signalling systems by cannabinoid receptors in the mouse brain. *Br J Pharmacol.*, 2010; 160(3): 643-656

- Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppasamy P, Santoro G, Elia PP, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, Chiariello M. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem.*, 1993; 268(25): 18532-18541
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90(17): 7915-7922
- An L, Zhang T. Vitamins C and E reverse melamine-induced deficits in spatial cognition and hippocampal synaptic plasticity in rats. *Neurotoxicology*, 2014; 44: 132-139
- Anandhan A, Tamilselvam K, Radhiga T, Rao S, Essa MM, Manivasagam T. Theaflavin, a black tea polyphenol, protects nigral dopaminergic neurons against chronic MPTP/probenecid induced Parkinson's disease. *Brain Res.*, 2012; 1433: 104-113
- Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 2003; 423 (6936): 181-185
- Andrade JP, Assunção M. Protective Effects of Chronic Green Tea Consumption on Age-related Neurodegeneration. *Curr Pharm Des.*, 2012; 18: 4-14
- Andrews-Hanna JR, Snyder AZ, Vincent JL, Lustig C, Head D, Raichle ME, Buckner RL. Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron*, 2007; 56: 924-935
- Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.*, 2012; 13: 93-110
- Anuari de l'envelliment. Illes Balears, 2014. Dra. Carmen Orte Socias. Universitat de les Illes Balears. https://gifes.uib.es/digitalAssets/401/401709_303780_3-anuari.pdf
- Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science*, 2004; 305(5686): 1010-1013
- Arnold JC, Cantu MA, Kasanga EA, Nejtek VA, Papa EV, Bugnariu N, Salvatore MF. Aging-related limit of exercise efficacy on motor decline. *PLoS One*, 2017; 12(11): e0188538
- Arranz L, de Castro NM, Baeza I, Maté I, Viveros MP, de la Fuente M. Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: longterm exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res.*, 2010; 13: 415-428
- Arts ICW, van de Putte B, Hollman PCH. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J Agric Food Chem.*, 2000a; 48: 1746-1751
- Arts ICW, van de Putte B, Hollman PCH. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J Agric Food Chem.*, 2000b; 48: 1752-1757
- Assunção M, Santos-Marques MJ, Carvalho F, Lukoyanov NV, Andrade JP. Chronic green tea consumption prevents age-related changes in rat hippocampal formation. *Neurobiol Aging*, 2011; 32: 707-717
- Atkinson RC, Shiffrin RM. Chapter: Human memory: A proposed system and its control processes. *The psychology of learning and motivation*. Vol. 2. In: KW Spence & JT Spence, New York: Academic Press, 1968; 89-195
- Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M. Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell*, 1995; 81(6): 905-915
- Baddeley A. Working Memory. *Science*, 1992; 255: 556-559

- Baker RG, Hayden M, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.*, 2011; 13(1): 11-22
- Bandaruk Y, Mukai R, Kawamura T, Nemoto H, Terao J. Evaluation of the inhibitory effects of quercetin-related flavonoids and tea catechins on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria. *J Agric Food Chem.*, 2012; 60(41): 10270-10277
- Barbelivien A, Herbeaux K, Oberling P, Kelche C, Galani R, Majchrzak M. Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the Rat. *Behav Brain Res.*, 2006; 169: 231-238
- Bardo MT, Klebaur J, Valone J, Deaton C. Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology*, 2001; 155: 278-284
- Barja G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Res Rev.*, 2002; 1(3): 397-411.
- Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol.*, 1979; 93: 74-104
- Baroncelli L, Bonaccorsi J, Milanese M, Bonifacino T, Giribaldi F, Manno I, Cenni MC, Berardi N, Bonanno G, Maffei L, Sale A. Enriched experience and recovery from amblyopia in adult rats: impact of motor, social and sensory components. *Neuropharmacology*, 2012; 62: 2388-2397
- Baroncelli L, Sale A, Viegi A, Maya Vetencourt JF, De Pasquale R, Baldini S, Maffei L. Experience-dependent reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Exp Neurol.*, 2010; 226(1): 100-109
- Barrett GL, Bennie A, Trieu J, Ping S, Tsafoulis C. The chronology of age-related spatial learning impairment in two rat strains, as tested by the Barnes maze. *Behav Neurosci.*, 2009; 123: 533-538
- Barrientos R, Frank M, Watkins L, Maier S. Aging-related changes in neuroimmune-endocrine function: Implications for hippocampal-dependent cognition. *Horm Behav.*, 2012; 62(3): 219-227
- Bastianetto S, Zheng W, Quirion R. Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. *Br J Pharmacol.*, 2000; 131(4): 711-720
- Baur JA. Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochim Biophys Acta*, 2010; 1804(8): 1626-1634
- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.*, 2006; 5: 493-506
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 2006; 444(7117): 337-342
- Bayod S, Guzmán-Brambila C, Sanchez-Roige S, Lalanza JF, Kaliman P, Ortuño-Sahagun D, Escorihuela RM, Pallàs M. Voluntary exercise promotes beneficial anti-aging mechanisms in SAMP8 female brain. *J Mol Neurosci.*, 2015; 55(2): 525-532.
- Bekris S, Antoniou K, Daskas S, Papadopoulou-Daifoti Z. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behav Brain Res.*, 2005; 161(1): 45-59
- Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci.*, 2004; 20: 1341-1347

- Bennett CB, Snipe JR, Westmoreland JW, Resnick MA. SIR functions are required for the toleration of an unrepaired double-strand break in a dispensable yeast chromosome. *Mol Cell Biol.*, 2001; 21(16): 5359-5373
- Bennett JC, McRae PA, Levy LJ, Frick KM. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol Learn Mem.*, 2006; 85: 139-152
- Berardi N, Braschi C, Capsoni S, Cattaneo A, Maffei L. Environmental enrichment delays the onset of memory deficits and reduces neuropathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer-like neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.*, 2007; 11: 359-370
- Berchtold NC, Cribbs DH, Coleman PD, Rogers J, Head E, Kim R, Beach T, Miller C, Troncoso J, Trojanowski JQ, Zielke HR, Cotman CW. Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105: 15605-15610
- Bernier M, Paul RK, Martin-Montalvo A, Scheibye-Knudsen M, Song S, He HJ, Armour SM, Hubbard BP, Bohr VA, Wang L, Zong Y, Sinclair DA, de Cabo R. Negative regulation of STAT3 protein-mediated cellular respiration by SIRT1 protein. *J Biol Chem.*, 2011; 286(22): 19270-19279
- Bernstein D, Olton DS, Ingram DK, Waller SB, Reynolds MA, London ED. Radial maze performance in young and aged mice: neurochemical correlates. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1985; 22(2): 301-307
- Berr C, Balansard B, Arnaud J. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. *Etude du vieillissement arteriel. J Am Geriatr Soc.*, 2000; 48: 1285-1291
- Berumen L, Rodríguez A, Mileli R, García-Alcocer G. Serotonin receptors in hippocampus. *Scientific World Journal*, 2012; 2012: 823493
- Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory". *Nat Protoc.*, 2006; 1(3): 1306-1311
- Beylin AV, Shors TJ. Stress enhances excitatory trace eyeblink conditioning and opposes acquisition of inhibitory conditioning. *Behav Neurosci.*, 1998; 112(6): 1327-1338
- Biernaskie J, Corbett D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci.*, 2001; 21(14): 5272-5280
- Bigford G, Del Rossi G. Supplemental substances derived from foods as adjunctive therapeutic agents for treatment of neurodegenerative diseases and disorders. *Adv Nutr.*, 2014; 5(4): 394-403
- Bishop NA, Lu T, Yankner BA. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 2010; 464: 529-535
- Bizon JL, Foster TC, Alexander GE, Glisky EL. Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models. *Front Aging Neurosci.*, 2012; 4: 19
- Blanchet J, Longpré F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bronchti G, Martinoli M. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008; 32(5): 1243-1250
- Blaylock RL, Maroon J. Natural plant products and extracts that reduce immunoexcitotoxicity-associated neurodegeneration and promote repair within the central nervous system. *Surg Neurol Int.*, 2012; 3: 19
- Bok E, Jo M, Lee S, Lee BR, Kim J, Kim HJ. Dietary restriction and neuroinflammation: a potential mechanistic link. *Int J Mol Sci.*, 2019; 20(3): E464
- Bopp KL, Verhaeghen P. Aging and verbal memory span: a meta-analysis. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.*, 2005; 60: 223-233

- Borella E, Carretti B, De Beni R. Working memory and inhibition across the adult life-span. *Acta Psychol. (Amst)*, 2008; 128: 33-44
- Boronat MA, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *Br J Pharmacol.*, 2001; 134(6): 1263-1270
- Bouchard J, Villeda SA. Aging and brain rejuvenation as systemic events. *J Neurochem.*, 2015; 132(1): 5-19
- Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.*, 1972; 128(3): 617-630.
- Bowling SL, Rowlett JK, Bardo MT. The effect of environmental enrichment on amphetamine-stimulated locomotor activity, dopamine synthesis and dopamine release. *Neuropharmacology*, 1993; 32: 885-893.
- Bowman RE, Beck KD, Luine VN. Chronic stress effects on memory: Sex differences in performance and monoaminergic activity. *Hormones and Behavior*, 2003; 43: 48-59
- Bowman RE, Micik R, Gautreaux C, Fernandez L, Luine VN. Sex dependent changes in anxiety, memory, and monoamines following one week of stress. *Physiol Behav.*, 2009; 97 (1): 21-29
- Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev.*, 1995; 9(23): 2888-2902
- Brasted P, Humby T, Dunnett S, Robbins T. Unilateral lesions of the dorsal striatum in rats disrupt responding in egocentric space. *J Neurosci*, 1997; 17(22): 8919-8926
- Brenes JC, Rodríguez O, Fornaguera J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2008; 89: 85-93
- Briones TL, Woods J, Rogozinska M. Decreased neuroinflammation and increased brain energy homeostasis following environmental enrichment after mild traumatic brain injury is associated with improvement in cognitive function. *Acta Neuropathol Commun.*, 2013; 1: 57
- Bronner LL, Kanter DS, Manson JE. Primary prevention of stroke. *New Engl J Med.*, 1995; 333: 1392-1400
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci.*, 2003; 17: 2042-2046
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 2004; 303(5666): 2011-2015
- Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, 2002; 35: 625-641
- Burke S, Barnes C. Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2006; 7(1): 30-40
- Cai F, Li C, Wu J, Min Q, Ouyang C, Zheng M, Ma S, Yu W, Lin F. Modulation of the oxidative stress and nuclear factor kappaB activation by theaflavin 3,3'-gallate in the rats exposed to cerebral ischemia-reperfusion. *Folia Biol. (Praha)*, 2007; 53(5): 164-172

Campuzano O, Castillo-Ruiz M, Acarin L, Castellano B, Gonzalez B. Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *J Neurosci Res.*, 2009; 87(11): 2484-2497

Cansino S, Torres-Trejo F, Estrada-Manilla C, Martínez-Galindo JG, Hernández-Ramos E, Ayala-Hernández M, Gómez-Fernández T, Ramírez-González MD, Ruiz-Velasco S. Factors that positively or negatively mediate the effects of age on working memory across the adult life span. *Geroscience*, 2018; 40(3): 293-303

Carlsson A. Perspectives on the discovery of central monoaminergic neurotransmission. *Annu Rev Neurosci.*, 1987; 10: 19-40

Carlsson A, Davis JN, Kehr W, Lindqvist M, Atack CV. Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.*, 1972; 275(2): 153-168

Cash C. Why tryptophan hydroxylase is difficult to purify: a reactive oxygen-derived species-mediated phenomenon that may be implicated in human pathology. *Gen Pharmacol.*, 1998; 30(4): 569-574

Cassarino M, Setti A. Environment as 'Brain Training': A review of geographical and physical environmental influences on cognitive ageing. *Ageing Res Rev.*, 2015; 23(Pt B): 167-182

Castilla-Ortega E, Hoyo-Becerra C, Pedraza C, Chun J, Rodríguez De Fonseca F, Estivill-Torrús G, Santín LJ. Aggravation of chronic stress effects on hippocampal neurogenesis and spatial memory in LPA₁ receptor knockout mice. *PLoS One*, 2011; 6(9):e25522

Cavalier L, Ouahchi K, Kayden HJ, Di Donato S, Reutenauer L, Mandel JL, Koenig M. Ataxia with isolated vitamin E deficiency: heterogeneity of mutations and phenotypic variability in a large number of families. *Am J Hum Genet.*, 1998; 62:301-310

Cechetti F, Worm PV, Lovatel G, Moysés F, Siqueira IR, Netto CA. Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Life Sci.*, 2012; 91(1-2): 29-36.

Chandler-Laney PC, Castaneda E, Pritchett CE, Smith ML, Giddings M, Artiga AI, Boggiano MM. A history of caloric restriction induces neurochemical and behavioral changes in rats consistent with models of depression. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2007; 87(1): 104-114

Chang HM, Wu UI, Lan CT. Melatonin preserves longevity protein (sirtuin 1) expression in the hippocampus of total sleep-deprived rats. *J Pineal Res.*, 2009; 47(3): 211-220

Chaouloff F, Kennett GA, Serrurier B, Merino D, Curzon G. Amino acid analysis demonstrates that increased plasma free tryptophan causes the increase of brain tryptophan during exercise in the rat. *J Neurochem.*, 1986; 46: 1647-1650

Chaouloff F, Laude D, Elghozi JL. Physical exercise: evidence for differential consequences of tryptophan on 5-HT synthesis and metabolism in central serotonergic cell bodies and terminals. *J Neural Transm.*, 1989; 78: 121-130

Chen JC, Ho FM, Pei-Dawn Lee Chao, Chen CP, Jeng KC, Hsu HB, Lee ST, Wen Tung Wu, Lin WW. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur J Pharmacol.*, 2005; 521: 9-20

Chen L, Lou Y, Pan Z, Cao X, Zhang L, Zhu C, Liang J. Treadmill and wheel exercise protect against JNK/NF- κ B induced inflammation in experimental models of knee osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2019; 523(1): 117-122

Chen SQ, Wang ZS, Ma YX, Zhang W, Lu JL, Liang YR, Zheng XQ. Neuroprotective effects and mechanisms of tea bioactive components in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 2018; 23(3): E512

- Chio CC, Lin HJ, Tian YF, Chen YC, Lin MT, Lin CH, Chang CP, Hsu CC. Exercise attenuates neurological deficits by stimulating a critical HSP70/NF- κ B/IL-6/synapsin I axis in traumatic brain injury rats. *J Neuroinflammation.*, 2017; 14(1): 90
- Chistiakov DA, Sobenin IA, Revin VV, Orekhov AN, Bobryshev YV. Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *Biomed Res Int.*, 2014; 2014: 238463.
- Choi J, Conrad CC, Dai R, Malakowsky CA, Talent JM, Carroll CA, Weintraub ST, Gracy RW. Vitamin E prevents oxidation of antiapoptotic proteins in neuronal cells. *Proteomics*, 2003; 3: 73-77
- Chouliaras L, van den Hove DL, Kenis G, De la Cruz J, Lemmens MA, van Os J, Steinbusch HW, Schmitz C, Rutten BP. Caloric restriction attenuates age-related changes of DNA methyltransferase 3a in mouse hippocampus. *Brain Behav Immun.*, 2011; 25(4): 616-623
- Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microsc Res Tech.*, 2002; 59: 264-272
- Chytrova G, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Exercise contributes to the effects of DHA dietary supplementation by acting on membrane-related synaptic systems. *Brain Res.*, 2010; 1341: 32-40
- Cifras de población, Proyecciones de población INE - España. Instituto Geográfico Nacional de España, 2020. https://www.ine.es/infografias/infografia_dia_poblacion.pdf
- Cirillo G, Curcio M, Vittorio O, Iemma F, Restuccia D, Spizzirri U, Picci N. Polyphenol conjugates and human health: a perspective review. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 2014; 56(2): 326-337
- Civitaresse AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med.*, 2007; 4(3): e76
- Clark JM. Contributions of inhibitory mechanisms to unified theory in neuroscience and psychology. *Brain Cogn.*, 1996; 30: 127-152
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*, 2004; 305(5682): 390-392
- Collier TJ, Greene JG, Felten DL, Stevens SY, Collier KS. Reduced cortical noradrenergic neurotransmission is associated with increased neophobia and impaired spatial memory in aged rats. *Neurobiol Aging*, 2004; 25: 209-221
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 2009; 325(5937): 201-204
- Conrad CD. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2010; 34(5): 742-755
- Contreras-Vidal J, Teulings H, Stelmach G. Elderly subjects are impaired in spatial coordination in fine motor control. *Acta Psychol.*, 1998; 100(1-2): 25-35
- Cook D, Kesner R. Caudate nucleus and memory for egocentric localization. *Behav Neural Biol.*, 1988; 49(3): 332-343
- Cools R. Dopaminergic control of the striatum for high-level cognition. *Curr Opin Neurobiol.*, 2011; 21: 402-407
- Cordeiro LMS, Rabelo PCR, Moraes MM, Teixeira-Coelho F, Coimbra CC, Wanner SP, Soares DD. Physical exercise-induced fatigue: the role of serotonergic and dopaminergic systems. *Braz J Med Biol Res.*, 2017; 50(12): e6432.

- Corredor C. Antioxidantes. Metabolismo, nutrición y shock. In: JF Patiño Restrepo (Ed.), Bogotá: Editorial médica panamericana, 2006; 293
- Cotman CW, Engesser-Cesar C. Exercise enhances and protects brain function. *Exerc Sport Sci Rev.*, 2002; 30(2): 75-79
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.*, 2007; 30(9): 464-472
- Cowan N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog Brain Res.*, 2008; 169: 323-338
- Coyle J, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 1993; 262(5134): 689-695
- Cribbs DH, Berchtold NC, Perreau V, Coleman PD, Rogers J, Tenner AJ, Cotman CW. Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: A microarray study. *J Neuroinflamm.*, 2012; 9: 179
- Cristòfol R, Porquet D, Corpas R, Coto-Montes A, Serret J, Camins A, Pallàs M, Sanfeliu C. Neurons from senescence-accelerated SAMP8 mice are protected against frailty by the sirtuin 1 promoting agents melatonin and resveratrol. *J Pineal Res.*, 2012; 52(3): 271-281
- Cruz-Sánchez FF, Cardozo A, Castejón C, Tolosa E, Rossi ML. Aging and the nigro-striatal pathway. *J Neural Transm Suppl.*, 1997; 51: 9-25
- Csiszar A, Gautam T, Sosnowska D, Tarantini S, Banki E, Tucsek Z, Toth P, Losonczy G, Koller A, Reglodi D, Giles CB, Wren JD, Sonntag WE, Ungvari Z. Caloric restriction confers persistent anti-oxidative, pro-angiogenic, and anti-inflammatory effects and promotes anti-aging miRNA expression profile in cerebrovascular endothelial cells of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2014; 307(3): H292-H306
- Cuadrado-Tejedor M, Ricobaraza A, Del Río J, Frechilla D, Franco R, Pérez-Mediavilla A, Garcia-Osta A. Chronic mild stress in mice promotes cognitive impairment and CDK5-dependent tau hyperphosphorylation. *Behav Brain Res.*, 2011; 220(2): 338-343
- Dabhade P, Kotwal S. Tackling the aging process with bio-molecules: a possible role for caloric restriction, food-derived nutrients, vitamins, aminoacids, peptides, and minerals. *J Nutr Gerontol Geriatr.*, 2013; 32(1): 24-40
- Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Healthspan* 2014; 3(6): 1-22
- Dal-Pan A, Pifferi F, Marchal J, Picq JL, Aujard F, RESTRIKAL Consortium. Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate. *PLoS One*, 2011; 6(1): e16581
- Darling W, Cooke J, Brown S. Control of simple arm movements in elderly humans. *Neurobiol Aging*, 1989; 10(2): 149-157
- Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv.*, 2006; 6(1): 36-47
- Daselaar S, Cabeza R. Age-related decline in working memory and episodic memory. The Oxford handbook of cognitive neuroscience. In Ochsner KN & Kosslyn S editors, Oxford handbooks online, Oxford University Press, 2013
- de Kloet ER. Stress in the brain. *Eur J Pharmacol.*, 2000; 405: 187-198
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.*, 1999; 22(10): 422-426

- De la Cruz CP, Revilla E, Venero JL, Ayala A, Cano J, Machado A. Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. *Free Radic Biol Med.*, 1996; 20: 53-61
- Deacon RMJ. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp.*, 2013; 75: e2609
- Deacon RMJ, Rawlins JNP. Learning impairments of hippocampal-lesioned mice in a paddling pool. *Behav Neurosci.*, 2002; 116: 472-478
- Del Arco A, Segovia G, Marta De Blas M, Garrido P, Acuña-Castroviejo D, Pamplona R, Mora F. Prefrontal cortex, caloric restriction and stress during aging: Studies on dopamine and acetylcholine release, BDNF and working memory. *Behav Brain Res.*, 2011; 216(1): 136-145
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, 2013; 18(14): 1818-1892
- Delaney C, Campbell M. The blood brain barrier: Insights from development and ageing. *Tissue Barriers*, 2017; 5(4): e1373897
- Delini-Stula A, Mogilnicka E, Hunn C, Dooley DJ. Novelty-oriented behavior in the rat after selective damage of locus coeruleus projections by DSP-4, a new noradrenergic neurotoxin. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1984; 20: 613-618
- Dexter DT, Nanayakkara I, Goss-Sampson MA, Muller DP, Harding AE, Marsden CD, Jenner P. Nigral dopaminergic cell loss in vitamin E deficient rats. *Neuroreport*, 1994; 5(14): 1773-1776
- Di Benedetto S, Muller L, Wenger E, Duzel S, Pawelec G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci Biobehav Rev.*, 2017; 75: 114-128
- Diamond DM, Park CR, Woodson JC. Stress generates emotional memories and retrograde amnesia by inducing an endogenous form of hippocampal LTP. *Hippocampus*, 2004; 14(3): 281-291
- Diamond MC. Enriching heredity: The impact of the environment on the anatomy of the brain. New York, US: Free Press, 1988
- Dias-Ferreira E, Sousa JC, Melo I, Morgado P, Mesquita AR, Cerqueira JJ. Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decisionmaking. *Science*, 2009; 325: 621-625
- Dietrich MO, Andrews ZB, Horvath TL. Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation. *J Neurosci.*, 2008; 28: 10766-10771
- Diggles-Buckles V. Age-related slowing. Sensorimotor impairment in the elderly. In: GE Stelmach & V Homberg (Eds.), Kluwer Academic, 1993; 73-87
- Doonan R, McElwee JJ, Matthijssens F, Walker GA, Houthoofd K, Back P, Matscheski A, Vanfleteren JR, Gems D. Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.*, 2008; 22(23): 3236-3241
- Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy (mini-review). *Cancer Lett.*, 2004; 215: 129-140
- Dresselhaus EC, Meffert MK. Cellular specificity of NF- κ B function in the nervous system. *Front Immunol.*, 2019; 10: 1043
- Driscoll I, Sutherland R. The aging hippocampus: navigating between rat and human experiments. *Rev Neurosci.*, 2005; 16(2): 87-121
- Dröge W, Schipper HM. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell*, 2007; 6(3): 361-370

- Duan W, Guo Z, Mattson MP. Brain-derived neurotrophic factor mediates an excitoprotective effect of dietary restriction in mice. *J Neurochem.*, 2001; 76(2): 619-626
- Dubey A, Forster MJ, Lal H, Sohal RS. Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. *Arch Biochem Biophys.*, 1996; 333(1): 189-197
- Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 2005; 27(2): 101-110
- Duffy SN, Craddock KJ, Abel T, Nguyen PV. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn Mem.*, 2001; 8: 26-34
- Dunn AL, Reigle TG, Youngstedt SD, Armstrong RB, Dishman RK. Brain norepinephrine and metabolites after treadmill training and wheel running in rats. *Med Sci Sports Exerc.*, 1996; 28: 204-209
- Dunn JD, Orr SE. Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation. *Exp Brain Res.*, 1984; 54: 1-6
- Duzel E, van Praag H, Sendtner M. Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? *Brain*, 2016; 139(Pt 3): 662-673
- Eacott MJ, Norman G. Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? *J Neurosci.*, 2004; 24(8): 1948-1953
- Eadie BD, Redila VA, Christie BR. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *J Comp Neurol.*, 2005; 486: 39-47
- Eckmann J, Eckert SH, Leuner K, Muller WE, Eckert GP. Mitochondria: mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration. *Int J Biochem Cell Biol.*, 2013; 45(1): 76-80
- El Hayek L, Khalifeh M, Zibara V, Abi Assaad R, Emmanuel N, Karnib N, El-Ghandour R, Nasrallah P, Bilen M, Ibrahim P, Younes J, Abou Haidar E, Barmo N, Jabre V, Stephan JS, Sleiman SF. Lactate mediates the effects of exercise on learning and memory through SIRT1-dependent activation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurosci.*, 2019; 39(13): 2369-2382
- Elgersma Y, Silva AJ. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol.*, 1999; 9(2): 209-213
- Engelhart MJ, Geerlings MI, Ruitenberg A, van Swieten JC, Hofman A, Witteman JCM, Breteler MMB. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA*, 2002; 287(24): 3223-3229
- Engineer ND, Percaccio CR, Pandya PK, Moucha R, Rathbun DL, Kilgard MP. Environmental enrichment improves response strength, threshold, selectivity, and latency of auditory cortex neurons. *J Neurophysiol.*, 2004; 92: 73-82
- Erdő F, Denes L, de Lange E. Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2017; 37(1): 4-24
- Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, Wojcicki TR, Mailey E, Vieira VJ, Martin SA, Pence BD, Woods JA, McAuley E, Kramer AF. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108(7): 3017-3022
- Erren T, Reiter RJ. A generalized theory of carcinogenesis due to chronodisruption. *Neuro Endocrinol Lett.*, 2008; 29(6): 815-821
- Ernst C, Olson AK, Pinel JP, Lam RW, Christie BR. Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis? *J Psychiatry Neurosci.*, 2006; 31(2): 84-92

- Escames G, Ozturk G, Baño-Otálora B, Pozo MJ, Madrid JA, Reiter RJ, Serrano E, Concepción M, Acuña-Castroviejo D. Exercise and melatonin in humans: reciprocal benefits. *J Pineal Res.*, 2012; 52: 1-11
- Escorihuela RM, Fernandez-Tereul A, Tobena A, Vivas NM, Marmol F, Badia A, Dierssen M. Early environmental stimulation produces long-lasting changes on β -adrenoceptor transduction systems. *Neurobiol Learn Mem.*, 1995a; 64: 49-57
- Escorihuela RM, Tobena A, Fernandez-Tereul A. Environmental enrichment and postnatal handling prevent spatial learning deficits in aged hypoemotional (Roman high-avoidance) and hyperemotional (Roman low-avoidance) rats. *Learn Mem.*, 1995b; 2: 40-48
- Esteban S, Garau C, Aparicio S, Moranta D, Barcelo P, Fiol MA, Rial R. Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *J Pineal Res.*, 2010a; 48: 170-177
- Esteban S, Garau C, Aparicio S, Moranta D, Barcelo P, Ramis M, Tresguerres JA, Rial R. Improving effects of long-term growth hormone treatment on monoaminergic neurotransmission and related behavioral tests in aged rats. *Rejuvenation Res.*, 2010b; 13: 707-716
- Esteban S, Nicolau C, Garmundi A, Rial RV, Rodríguez AB, Ortega E, Ibars CB. Effect of orally administered L-tryptophan on serotonin, melatonin and the innate immune response. *Mol Cell Biochem.*, 2004; 267(1-2): 39-46
- Faggi L, Porrini V, Lanzillotta A, Benarese M, Mota M, Tsoukalas D, Parrella E, Pizzi M. A Polyphenol-enriched supplement exerts potent epigenetic-protective activity in a cell-based model of brain ischemia. *Nutrients*, 2019; 11(2): 345
- Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindfors N. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett.*, 1992; 138(1): 153-156
- Fan Y, Liu Z, Weinstein PR, Fike JR, Liu J. Environmental enrichment enhances neurogenesis and improves functional outcome after cranial irradiation. *Eur J Neurosci.*, 2007; 25: 38-46
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Couraud PO, Romero I, Weksler B, de Freitas V, Mateus N, Calhau C. Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. *Food Funct.*, 2011; 2: 39-44
- Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience*, 2004; 124: 71-79
- Farzaei MH, Bahramsoltani R, Abbasabadi Z, Braidy N, Nabavi SM. Role of green tea catechins in prevention of age-related cognitive decline: Pharmacological targets and clinical perspective. *J Cell Physiol.*, 2019; 234: 2447-2459
- Feder A, Nestler EJ, Charney DS. Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci.*, 2009; 10: 446-457
- Ferland CL, Schrader LA. Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: A potential role of sirtuins. *Neuroscience*, 2011; 174: 104-114
- Ferland CL, Hawley WR, Puckett RE, Wineberg K, Lubin FD, Dohanich GP, Schrader LA. Sirtuin activity in dentate gyrus contributes to chronic stress-induced behavior and extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 cascade changes in the hippocampus. *Biol Psychiatry*, 2013; 74(12): 927-935
- Fernández Muñoz JN, Imsero. Informe 2012. Las personas mayores en España. Datos estadísticos estatales y por comunidades autónomas. Colección Documentos; Serie Documentos Estadísticos N° 22027. Imsero - Instituto de Mayores y Servicios Sociales, 2014.

- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, González B, Tobeña A. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav Genet.*, 1997; 27(6): 513-526
- Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr.*, 2007; 137(6 Suppl 1): 1539S-1547S, discussion 1548S
- Finch CE. Neuron atrophy during aging: programmed or sporadic. *Trends Neurosci.*, 1993; 16: 104-110
- Fischer A. Environmental enrichment as a method to improve cognitive function. What can we learn from animal models? *Neuroimage*, 2016; 131: 42-47
- Fischer TW, Kleszczynski K, Hardkop LH, Kruse N, Zillikens D. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *J Pineal Res.*, 2013; 54(3): 303-312
- Flight MH. Memory: RBAP48 drives age-related memory loss. *Nat Rev Neurosci.*, 2013; 14(10): 670-671
- Flowers A, Lee JY, Acosta S, Hudson C, Small B, Sanberg CD, Bickford P. NT-020 treatment reduces inflammation and augments Nrf-2 and Wnt signalling in aged rats. *J Neuroinflammation*, 2015; 12(1): 174
- Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, 2002; 23: 795-807
- Forster MJ, Dubey A, Dawson KM, Stutts WA, Lal H, Sohal RS. Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93: 4765-4769
- Foster TC. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Rev.*, 1999; 30: 236-249
- Fox C, Merali Z, Harrison C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res.*, 2006; 175: 1-8
- Franzoni F, Federighi G, Fusi J, Agosta V, Cerri E, Banducci R, Petrocchi A, Bernardi R, Innocenti A, Pruneti C, Daniele S, Pellegrini S, Martini C, Scuri R, Galetta F. Physical exercise improves total antioxidant capacity and gene expression in rat hippocampal tissue. *Arch Ital Biol.*, 2017; 155(1-2): 1-10
- Fratiglioni L, Paillard-Borg S, Winblad B. An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol.*, 2004; 3(6): 343-353
- Freeman L, Keller J. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: Regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochim Biophys Acta*, 2012; 1822(5): 822-829
- Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*, 2000; 66(8): 663-673
- Frescas D, Valenti L, Accili D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem.*, 2005; 280(21): 20589-20595
- Fu G, Wang H, Cai Y, Zhao H, Fu W. Theaflavin alleviates inflammatory response and brain injury induced by cerebral hemorrhage via inhibiting the nuclear transcription factor kappa β -related pathway in rats. *Drug Des Devel Ther.*, 2018; 12: 1609-1619
- Fu H, Liu L, Tong Y, Li Y, Zhang X, Gao X, Yong J, Zhao J, Xiao D, Wen K, Wang H. The antidepressant effects of hesperidin on chronic unpredictable mild stress-induced mice. *Eur J Pharmacol.*, 2019; 853: 236-246

- Fukui K, Omoi NO, Hayasaka T, Shinnkai T, Suzuki S, Abe K, Urano S. Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann NY Acad Sci.*, 2002; 959: 275-284
- Fukui K, Takatsu H, Shinkai T, Suzuki S, Abe K, Urano S. Appearance of amyloid beta-like substances and delayed-type apoptosis in rat hippocampus CA1 region through aging and oxidative stress. *J Alzheimers Dis.*, 2005; 8(3): 299-309
- Fulgoni VL 3rd, Keast DR, Auestad N, Quann EE. Nutrients from dairy foods are difficult to replace in diets of Americans: food pattern modeling and an analyses of the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2006. *Nutr Res.*, 2011; 31(10): 759-765
- Gagné J, Gélinas S, Martinoli MG, Foster TC, Ohayon M, Thompson RF, Baudry M, Massicotte G. AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment. *Brain Res.*, 1998; 799:16-25.
- Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res.*, 2013; 54(3): 245-257
- Gallagher M, Landfield PW, McEwen B. Hippocampal neurodegeneration in aging. *Science*, 1996; 274: 484-485
- Galli F, Azzi A, Birringer M, Cook-Mills JM, Eggersdorfer M, Frank J, Cruciani G, Lorkowski S, Özer NK. Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radic Biol Med.*, 2017; 102: 16-36
- Gao H, Zhu X, Xi Y, Li Q, Shen Z, Yang Y. Anti-depressant-like effect of atractylenolide I in a mouse model of depression induced by chronic unpredictable mild stress. *Exp Ther Med.*, 2018; 15(2): 1574-1579
- Gao J, Wang WY, Mao YW, Gräff J, Guan JS, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC, Tsai LH. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature*, 2010; 466(7310): 1105-1109
- Garcia C, Chen MJ, Garza AA, Cotman CW, Russo-Neustadt A. The influence of specific noradrenergic and serotonergic lesions on the expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor transcripts following voluntary physical activity. *Neuroscience*, 2003; 119(3): 721-732
- García JJ, López-Pingarrón L, Almeida-Souza P, Tres A, Escudero P, García-Gil FA, Tan DX, Reiter RJ, Ramírez JM, Bernal-Pérez M. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *J Pineal Res.*, 2014; 56(3): 225-237
- García-Bueno A, Leza J. Mecanismos inflamatorios/antiinflamatorios en el cerebro tras la exposición a estrés. *Rev Neurolog.*, 2008; 46(11): 675-683
- García-Fuster MJ, Miralles A, García-Sevilla JA. Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. *Neuropsychopharmacology*, 2007; 32: 399-411
- García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA. Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: Functional interactions with casein kinase I α , Gai proteins, and ERK1/2 signaling. *Neuropharmacology*, 2008; 55: 886-899
- Garrido P. Aging and stress: past hypotheses, present approaches and perspectives. *Aging Dis.*, 2011; 2(1): 80-99
- Garrido P, de Blas M, Del Arco A, Segovia G, Mora F. Aging increases basal but not stress-induced levels of corticosterone in the brain of the awake rat. *Neurobiol Aging*, 2012; 33(2): 375-382
- George J, Bernard W, Agranoff R, Wayne A, Perry B. Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. In: R Press (Ed.), New York, 1994

- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J.*, 2007; 26(7): 1913-1923
- Globus A, Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond MC. Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J Comp Physiol Psychol.*, 1973; 82(2): 157-181.
- Glorioso C, Sibille E. Between destiny and disease: genetics and molecular pathways of human central nervous system aging. *Prog Neurobiol.*, 2011; 93(2): 165-181
- Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J.*, 2005; 19(10): 1329-1331
- Goldstein LE, Rasmusson AM, Bunney BS, Roth RH. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J Neurosci.*, 1996; 16(15): 4787-4798
- Gomez JL, Lewis M, Luine VN. The interaction of chronic restraint stress and voluntary alcohol intake: Effects on spatial memory in male rats. *Alcohol*, 2012; 46(5): 499-504
- Gómez-Pinilla F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci.*, 2008; 9(7): 568-578
- Gomez-Pinilla F. The combined effects of exercise and foods in preventing neurological and cognitive disorders. *Prev Med.*, 2011; 52(Suppl 1): S75-S80
- Gomez-Pinilla F, Nguyen T. Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutr Neurosci.*, 2012; 15(3): 127-133
- Gomez-Pinilla F, Tyagi E. Diet and cognition: interplay between cell metabolism and neuronal plasticity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2013; 16(6): 726-733
- González-Burgos I, Feria-Velasco A. Serotonin-dopamine interaction: experimental evidence and therapeutic relevance. *Arch Neurocienc.*, 2009; 14(1): 40-57
- Gonzalez-Burgos I, Feria-Velasco A. Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res.*, 2008; 172: 603-623
- Gould E, Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*, 1999; 46(11): 1472-1479
- Gräff J, Tsai L. Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat Rev Neurosci.*, 2013; 14(2): 97-111
- Greaves LC, Elson JL, Nootboom M, Grady JP, Taylor GA, Taylor RW, Mathers JC, Kirkwood TB, Turnbull DM. Comparison of mitochondrial mutation spectra in ageing human colonic epithelium and disease: absence of evidence for purifying selection in somatic mitochondrial DNA point mutations. *PLoS Genet.*, 2012; 8(11): e1003082
- Green A, Cain E, Michael T, Bardo MT. Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacology*, 2003; 170: 235-241
- Green EJ, Greenough WT. Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: Evidence from hippocampal slices maintained in vitro. *J Neurophysiol.*, 1986; 55: 739-750
- Greene LS, Williams HG. Aging and coordination from the dynamic pattern perspective. Changes in sensory motor behavior in aging. Vol. 114. In: A Ferrandez & N Teasdale (Eds.), North Holland, Amsterdam: Elsevier Science, 1996; 89-131
- Greenough WT, Volkman FR. Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Exp Neurol.*, 1973; 40: 491-504

- Greenough WT, McDonald JW, Parnisari RM, Camel JE. Environmental conditions modulate degeneration and new dendrite growth in cerebellum of senescent rats. *Brain Res.*, 1986; 380: 136-143
- Greenwood PM, Parasuraman R. Neuronal and cognitive plasticity: a neurocognitive framework for ameliorating cognitive aging. *Front Aging Neurosci.*, 2010; 2: 150
- Grilli M, Zappettini S, Zanardi A, Lagomarsino F, Pittaluga A, Zoli M, Marchi M. Exposure to an enriched environment selectively increases the functional response of the pre-synaptic NMDA receptors which modulate noradrenaline release in mouse hippocampus. *J Neurochem.*, 2009; 110(5): 1598-1606
- Guarente L. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev.*, 2000; 14(9): 1021-1026
- Guo LT, Wang SQ, Su J, Xu LX, Ji ZY, Zhang RY, Zhao QW, Ma ZQ, Deng XY, Ma SP. Baicalin ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behavior through inhibition of toll-like receptor 4 expression via the PI3K/AKT/FoxO1 pathway. *J Neuroinflamm.*, 2019; 16(1): 95
- Gurd BJ, Yoshida Y, McFarlan JT, Holloway GP, Moyes CD, Heigenhauser GJF, Spriet L, Bonen A. Nuclear SIRT1 activity, but not protein content, regulates mitochondrial biogenesis in rat and human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2011; 301(1): R67-75
- Gutteridge JM, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2010; 393(4): 561-564.
- Haenold R, Weih F, Herrmann KH, Schmidt KF, Krempler K, Engelmann C, Nave KA, Reichenbach JR, Löwel S, Witte OW, Kretz A. NF- κ B controls axonal regeneration and degeneration through cell-specific balance of RelA and p50 in the adult CNS. *J Cell Sci.*, 2014; 127(Pt 14): 3052-3065
- Haider S, Khaliq S, Ahmed SP, Haleem DJ. Long-term tryptophan administration enhances cognitive performance and increases 5HT metabolism in the hippocampus of female rats. *Amino Acids*, 2006; 31: 421-425
- Haider S, Khaliq S, Haleem DJ. Enhanced serotonergic neurotransmission in the hippocampus following tryptophan administration improves learning acquisition and memory consolidation in rats. *Pharmacol Rep.*, 2007; 59: 53-57
- Haider S, Saleem S, Perveen T, Tabassum S, Batool Z, Sadir S, Liaquat L, Madiha S. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age (Dordr)*, 2014; 36(3): 9653
- Haider S, Tabassum S, Ali S, Saleem S, Khan AK, Haleem DJ. Age-related decreases in striatal DA produces cognitive deficits in male rats. *J Pharmacol Nutri Sci.*, 2011; 1: 20-27
- Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.*, 2006; 20(21): 2913-2921
- Hain R, Bieseler B, Kindl H, Schröder G, Stöcker R. Expression of stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant Mol Biol.*, 1990; 15(2): 325-335
- Halder J, Bhaduri AN. Protective role of black tea against oxidative damage of human red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1998; 244(3): 903-907
- Halliwell B. Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutr Rev.*, 1997; 55(1): S44-S49
- Halliwell B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res.*, 2007; 73(2): 341-347
- Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo M, Kewitt K, Walter CA, Richardson A. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98(18): 10469-10474

- Hannan AJ. Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Neurobiol Appl Neurobiol.*, 2014; 40(1): 13-25
- Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Hara Y, Shido O. Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by A β 1-40 in rats. *J Nutr Biochem.*, 2008; 19: 619-626
- Hara H, Kato H, Kogure K. Protective effect of alphatocopherol on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *Brain Res.*, 1990; 510: 335-338
- Harati H, Majchrzak M, Cosquer B, Galani R, Kelche C, Cassel JC, Barbelivien A. Attention and memory in aged rats: impact of lifelong environmental enrichment. *Neurobiol Aging*, 2011; 32(4): 718-736
- Harburger LL, Lambert TJ, Frick KM. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behav Brain Res.*, 2007; 185(1): 43-48
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.*, 1956; 11(3): 298-300
- Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res.*, 2009; 198(1): 247-251
- Harrison FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, McDonald MP. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn Mem.*, 2006; 13: 809-819
- Hasher L, Zacks RT. Working memory, comprehension and aging: A review and a new view. The psychology of learning and motivation. In: GH Bower (Ed.), San Diego, CA: Academic Press, 1988; 22: 193-225
- Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.*, 2012; 26(3): 203-234
- Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 2008; 132(3):344-362
- Hector KL, Lagisz M, Nakagawa S. The effect of resveratrol on longevity across species: a meta-analysis. *Biol Lett.*, 2012; 8(5): 790-793
- Hedden T, Gabrieli JD. Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat Rev Neurosci.*, 2004; 5: 87-96
- Hei M, Chen P, Wang S, Li X, Xu M, Zhu X, Wang Y, Duan J, Huang Y, Zhao S. Effects of chronic mild stress induced depression on synaptic plasticity in mouse hippocampus. *Behav Brain Res.*, 2019; 365: 26-35
- Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, Greenway FL, Smith SR, Deutsch WA, Williamson DA, Ravussin E, Pennington CALERIE Team. Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2006; 295(13): 1539-1548
- Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a good look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.*, 2011; 21(10), 569-576
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.*, 2003; 24: 151-180
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat.*, 2005; 29(8): 1201-1213

- Hernández JM. Cromatografía líquida de alta eficacia. Ed Cont Lab Clin., 2005; 8: 49-62
- Herring A, Ambrée O, Tomm M, Habermann H, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Exp Neurol.*, 2009; 216(1): 184-192
- Herring A, Blome M, Ambrée O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. Reduction of cerebral oxidative stress following environmental enrichment in mice with Alzheimer-like pathology. *Brain Pathol.*, 2010; 20(1): 166-175
- Herrmann O, Baumann B, De Lorenzi R, Muhammad S, Zhang W, Kleesiek J, Malfertheiner M, Köhrmann M, Potrovita I, Maegele I, Beyer C, Burke JR, Hasan MT, Bujard H, Wirth T, Pasparakis M, Schwaninger M. IKK mediates ischemia-induced neuronal death. *Nat Med.*, 2005; 11(12): 1322-1329
- Herskovits A, Guarente L. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Cell Research*, 2013; 23(6): 746-758
- Herskovits AZ, Guarente L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron*, 2014; 81(3): 471-483
- Hibberd C, Yau JLW, Seckl JR. Glucocorticoids and the aging hippocampus. *J Anat.*, 2000; 197: 553-562
- Hoeffler CA, Klann E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci.*, 2010; 33(2): 67-75
- Hokari F, Kawasaki E, Sakai A, Koshinaka K, Sakuma K, Kawanaka K. Muscle contractile activity regulates Sirt3 protein expression in rat skeletal muscles. *J Appl Physiol.*, 2010; 109(2): 332-340
- Holloszy JO, Kohrt WM. Exercise. Handbook of physiology, Aging. In: EJ Masoro (Ed.), New York: Oxford Press, 1995; 633-666
- Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB, Rhee SJ. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin induced diabetic rats. *Clin Chim Acta*, 2004; 340: 107-115
- Horio Y, Hayashi T, Kuno A, Kunimoto R. Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease. *Clin Sci. (Lond)*, 2011; 121(5): 191-203
- Howard AC, Anna K, McNeil AK, McNeil PL. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. *Nat Commun.*, 2011; 20: 597
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 2003; 425(6954): 191-196
- Huang RL, Wang CT, Tai MY, Tsai YF, Peng MT. Effects of age on dopamine release in the nucleus accumbens and amphetamine-induced locomotor activity in rats. *Neurosci Lett.*, 1995; 200: 61-64
- Huang ZG, Liang C, Han SF, Wu ZG. Vitamin E ameliorates ox-LDL-induced foam cells formation through modulating the activities of oxidative stress-induced NF-kappaB pathway. *Mol Cell Biochem.*, 2012; 363(1-2): 11-19
- Hubel DH, Wiesel TN. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proc. R. Soc. Lond.* 1977; B 198: 1-59
- Hudson EK, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Croteau DL, Anson RM, Bohr VA, Hansford RG. Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free Radic Res.*, 1998; 29(6): 573-579
- Hung CW, Chen YC, Hsieh WL, Chiou SH, Kao CL. Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev.*, 2010; 9(1): S36-46

- Hussain AM, Mitra AK. Effect of aging on tryptophan hydroxylase in rat brain: Implications on serotonin level. *Drug Metab Dispos.*, 2000; 28: 1038-1042
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol.*, 2000; 164(1): 45-52
- Ide K, Matsuoka N, Yamada H, Furushima D, Kawakami K. Effects of tea catechins on Alzheimer's disease: Recent updates and perspectives. *Molecules*, 2018; 23(9): E2357
- Ikram H, Mirza B, Haleem DJ. Neurochemical and behavioral effects of green tea (*Camellia sinensis*) as observed in animals exposed to restraint stress. *Pak J Pharm Sci.*, 2017; 30(2): 487-492
- Ilin Y, Richter-Levin G. Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by Juvenile stress. *PLoS One*, 2009; 4(1): e4329
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 2000; 403(6771): 795-800
- Ingold KU, Bowry VW, Stocker R, Walling C. Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90(1): 45-49
- Ingram DK, Roth GS. Calorie restriction mimetics: can you have your cake and eat it, too? *Ageing Res Rev.*, 2015; 20C: 46-62
- Ingram DK, Anson RM, de Cabo R, Mamczarz J, Zhu M, Mattison J, Lane MA, Roth GS. Development of calorie restriction mimetics as a prolongevity strategy. *Ann N Y Acad Sci.*, 2004; 1019: 412-423
- Ingram DK, Spangler EL, Iijima S, Ikari H, Kuo H, Greig NH, London ED. Rodent models of memory dysfunction in Alzheimer's disease and normal aging: moving beyond the cholinergic hypothesis. *Life Sci.*, 1994; 55: 2037-2049
- Ingram DK, Zhu M, Mamczarz J, Zou S, Lane MA, Roth GS, de Cabo R. Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell*, 2006; 5(2): 97-108
- Ivy AS, Rodriguez FG, Garcia C, Chen MJ, Russo-Neustadt AA. Noradrenergic and serotonergic blockade inhibits BDNF mRNA activation following exercise and antidepressant. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2003; 75(1): 81-88
- Jacobson L, Sapolsky RM. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Rev.*, 1991; 12: 118-134
- Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, Younkin LH, Younkin SG, Borchelt DR, Savonenko AV. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 2005; 25: 5217-5224
- Jha S, Dong B, Sakata K. Enriched environment treatment reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis and protein levels of brain-derived neurotrophic factor in mice lacking its expression through promoter IV. *Transl Psychiatry.*, 2011; 1(9): e40
- Ji MH, Wang XM, Sun XR, Zhang H, Ju LS, Qiu LL, Yang JJ, Jia M, Wu J, Yang J. Environmental enrichment ameliorates neonatal sevoflurane exposure-induced cognitive and synaptic plasticity impairments. *J Mol Neurosci.*, 2015; 57: 358-365
- Jiang CH, Tsien JZ, Schultz PG, Hu Y. The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98(4): 1930-1934

- Jiang M, Wang J, Fu J, Du L, Jeong H, West T, Duan W. Neuroprotective role of Sirt1 in mammalian models of Huntington's disease through activation of multiple Sirt1 targets. *Nat Med.*, 2012; 18(1): 153-158
- Jiang Q. Natural forms of vitamin E: Metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic Biol Med.*, 2014; 72: 76-90
- Joëls M, Karst H, Alfarez D, Heine VM, Qin Y, van Riel E, Verkuyl M, Lucassen PJ, Krugers HJ. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress*, 2004; 7(4): 221-231
- Joëls M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ. Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci.*, 2006; 10(4): 152-158
- Johnson PF, McKnight SL. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Ann Rev Biochem.*, 1989; 58: 799-839
- Jolitha AB, Subramanyam MVV, Devi SA. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: Studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Exp Gerontol.*, 2006; 41(8): 753-763
- Joseph J. The putative role of free radicals in the loss of neuronal functioning in senescence. *Integr Physiol Behav Sci.*, 1992; 27(3): 216-227
- Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D. Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J Neurosci.*, 2009; 29(41): 12795-12801
- Joseph JA, Denisova NA, Bielinski D, Fisher DR, Shukitt-Hale B. Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention. *Mech Ageing Dev.*, 2000; 116(2-3): 141-153
- Joseph JA, Fisher DR, Cheng V, Rimando AM, Shukitt-Hale B. Cellular and behavioral effects of stilbene resveratrol analogues: implications for reducing the deleterious effects of aging. *J Agric Food Chem.*, 2008; 56(22): 10544-10551
- Joseph J, Shukitt-Hale B, Denisova N, Bielinski D, Martin A, McEwen J, Bickford P. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci.*, 1999; 19(18): 8114-8121
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Prior RL, Cao G, Martin A, Tagliamonte G, Bickford PC. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci.*, 1998; 18: 8047-8055
- Jung MK, Ha S, Son J, Song JH, Houh Y, Cho E, Chun JH, Yoon SR, Yang Y, Bang SI, Kim M, Park HJ, Cho D. Polyphenon-60 displays a therapeutic effect on acne by suppression of TLR2 and IL-8 expression via down-regulating the ERK1/2 pathway. *Arch Dermatol Res.*, 2012; 304: 655-663
- Jurgens HA, Johnson RW. Environmental enrichment attenuates hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection. *Brain Behav Immun.*, 2012; 26(6): 1006-1016
- Kaasinen V, Rinne J. Functional imaging studies of dopamine system and cognition in normal aging and Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev.*, 2002; 26(7): 785-793
- Kaeberlein M, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK. Sir2-independent lifespan extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biol.*, 2004; 2(9): E296
- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. Constitutive NF- κ B activity in neurons. *Mol Cell Biol.*, 1994; 14(6): 3981-3992
- Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov.*, 2004; 3(1): 17-26

- Katsuura G, Arimura A, Kovacs K, Gottschall P. Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin 1 beta-induced ACTH release. *Am J Physiol.*, 1990; 258(1 Pt 1): E163-171
- Kaur T, Pathak CM, Pandhi P, Khanduja KL. Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain Cogn.*, 2008; 67: 25-30
- Kedar NP. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? *J Postgrad Med.*, 2003; 49(3): 236-245
- Keller B, García-Sevilla JA. Regulation of hippocampal Fas receptor and death-inducing signaling complex after kainic acid treatment in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 2015; 63: 54-62
- Kemp A, Manahan-Vaughan D. Beta-adrenoreceptors comprise a critical element in learning facilitated long-term plasticity. *Cereb Cortex*, 2008; 18: 1326-1334
- Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained five fold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol.*, 2002; 52: 135-143
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 1997; 386(6624): 493-495
- Kennedy BK, Steffen KK, Kaeberlein M. Ruminations on dietary restriction and aging. *Cell Mol Life Sci.*, 2007; 64(11): 1323-1328
- Kennedy SR, Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA. Ultra-sensitive sequencing reveals an age-related increase in somatic mitochondrial mutations that are inconsistent with oxidative damage. *PLoS Genet.*, 2013; 9(9): e1003794
- Ketcham CJ y Stelmach GE. Chapter 3: Movement Control in the Older Adult. Technology for adaptive aging. / National research council (US) steering committee for the workshop on technology for adaptive aging. In: RW Pew & SB Van Hemel (Eds.), Washington, DC: National Academies Press (US), 2004
- Khor SC, Mohd Yusof YA, Wan Ngah WZ, Makpol S. Tocotrienol-rich fraction prevents cellular aging by modulating cell proliferation signaling pathways. *Clin Ter.*, 2015; 166: e81-90
- Khurana S, Venkataraman K, Hollingsworth A, Piche M, Tai TC. Polyphenols: Benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*, 2013; 5(10): 3779-3827
- Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, Delalle I, Baur JA, Sui G, Armour SM, Puigserver P, Sinclair DA, Tsai LH. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.*, 2007; 26(13): 3169-3179
- Kim H, Kim YS, Kim SY, Suk K. The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production. *Neurosci Lett.*, 2001; 309(1): 67-71
- Kim J, Baxter M. Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts. *Trends Neurosci.*, 2001; 24(6): 324-330
- Kirchner L, Chen WQ, Afjehi-Sadat L, Viidik A, Skalicky M, Hoyer H, Lubec G. Hippocampal metabolic proteins are modulated in voluntary and treadmill exercise rats. *Exp Neurol.*, 2008; 212: 145-151
- Kireev RA, Vara E, Tresguerres JA. Growth hormone and melatonin prevent age-related alteration in apoptosis processes in the dentate gyrus of male rats. *Biogerontology*, 2013; 14(4): 431-442
- Kita M, Uchida S, Yamada K, Ano Y. Anxiolytic effects of theaflavins via dopaminergic activation in the frontal cortex. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2019; 83(6): 1157-1162

- Kitani K, Osawa T, Yokozawa T. The effects of tetrahydrocurcumin and green tea polyphenol on the survival of male C57BL/6 mice. *Biogerontology*, 2007; 8(5): 567-573
- Kitchigina V, Vankov A, Harley C, Sara SJ. Novelty-elicited, noradrenaline-dependent enhancement of excitability in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci.*, 1997; 9: 41-47
- Klingberg T. Training and plasticity of working memory. *Trends Cogn Sci.*, 2010; 14: 317-324
- Kobilo T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem.*, 2011; 18(9): 605-609
- Kokras N, Sotiropoulos I, Besinis D, Tzouveka EL, Almeida OFX, Sousa N, Dalla C. Neuroplasticity-related correlates of environmental enrichment combined with physical activity differ between the sexes. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 2019; 29(1): 1-15
- Kolb B, Whishaw IQ. Brain plasticity and behavior. *Ann Rev Psychol.*, 1998; 49: 43-64
- Kolb B, Gibb R, Gorni G. Experience-dependent changes in dendritic arbour and spine density in neocortex vary qualitatively with age and sex. *Neurobiol Learn Mem.*, 2003; 79: 1-10
- Kolthur-Seetharam U, Dantzer F, McBurney MW, de Murcia G, Sassone-Corsi P. Control of AIF-mediated cell death by the functional interplay of SIRT1 and PARP-1 in response to DNA damage. *Cell Cycle*, 2006; 5(8): 873-877
- Koprowska M, Krotewicz M, Romaniuk A, Strzelczuk M. Age-related changes in fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats. *Acta Neurobiol Exp. (Wars)*, 2004; 64: 131-142
- Korhonen P, Helenius M, Salminen A. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF- κ B in rat brain. *Neurosci Lett.*, 1997; 225: 61-64
- Kosmidis S, Polyzos A, Harvey L, Youssef M, Denny CA, Dranovsky A, Kandel ER. RbAp48 protein is a critical component of GPR158/OCN signaling and ameliorates age-related memory loss. *Cell Rep.*, 2018; 25(4): 959-973
- Kravitz AV, Kreitzer AC. Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. *Physiology*, 2012; 27: 167-177
- Krazem A, Marighetto A, Higuere P, Jaffard R. Age-dependent effects of moderate chronic ethanol administration on different forms of memory expression in mice. *Behav Brain Res.*, 2003; 147(1-2): 17-29
- Kuhn DM, Arthur RE. Inactivation of brain tryptophan hydroxylase by nitric oxide. *J Neurochem.*, 1996; 67: 1072-1077
- Kuriyama S, Hozawa A, Ohmori K, Shimazu T, Matsui T, Ebihara S, Awata S, Nagatomi R, Arai H, Tsuji I. Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project. *Am J Clin Nutr.*, 2006; 83: 355-361
- Kwon KJ, Kim HJ, Shin CY, Han SH. Melatonin potentiates the neuroprotective properties of resveratrol against beta-amyloid-induced neurodegeneration by modulating AMP-activated protein kinase pathways. *J Clin Neurol.*, 2010; 6(3): 127-137
- La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. Effects of vitamin E on cognitive performance during ageing and in Alzheimer's disease. *Nutrients*, 2014; 6: 5453-5472
- Laemmli UK. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-685
- Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J Agric Food Chem.*, 2000; 48: 2848-2852
- Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA. Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Mol Microbiol.*, 2004; 53(4): 1003-1009

- Landau SM, Marks SM, Mormino EC, Rabinovici GD, Oh H, O'Neil JP, Wilson RS, Jagust WJ. Association of lifetime cognitive engagement and low β -amyloid deposition. *Arch. Neurol.*, 2012; 69(5): 623-629
- Landers MS, Knott GW, Lipp HP, Poletaeva I, Welker E. Synapse formation in adult barrel cortex following naturalistic environmental enrichment. *Neuroscience*, 2011; 199: 143-152
- Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, Sternglanz R. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97: 5807-5811
- Lane MA, Mattison J, Ingram DK, Roth GS. Caloric restriction and aging in primates: Relevance to humans and possible CR mimetics. *Microsc ResTech.*, 2002; 59(4): 335-338
- Lang JK, Gohil K, Packer L. Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal Biochem.*, 1986; 157(1): 106-116
- Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, 1977; 33(2): 151-152
- Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2002; 73: 193-207
- Lass A, Sohal RS. Electron transport-linked Ubiquinone-dependent recycling of α -Tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes. *Arch Biochem Biophys.*, 1998; 352(2): 229-236
- Lau F, Shukitt-Hale B, Joseph J. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiol Aging*, 2005; 26(Suppl 1): 128-132
- Lebrun C, Durkin TP, Marighetto A, Jaffard R. A comparison of the working memory performances of young and aged mice combined with parallel measures of testing and drug-induced activations of septo-hippocampal and nbm-cortical cholinergic neurones. *Neurobiol Aging.*, 1990; 11(5): 515-521
- Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*, 1999; 285(5432): 1390-1393
- Lee EHY, Hsu WL, Ma YL, Lee PJ, Chao CC. Enrichment enhances the expression of *sgk*, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur J Neurosci.*, 2003; 18: 2842-2852
- Lee H, Lim Y. Tocotrienol-rich fraction supplementation reduces hyperglycemia-induced skeletal muscle damage through regulation of insulin signaling and oxidative stress in type 2 diabetic mice. *J Nutr Biochem.*, 2018; 57: 77-85
- Leenen R, Roodenburg AJ, Tijburg LB, Wiseman SA. A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr.*, 2000; 54(1): 87-92
- Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res.*, 2005; 163: 78-90
- Lemon N, Manahan-Vaughan D. Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci.*, 2006; 26: 7723-7729
- Lemon N, Aydin-Abidin S, Funke K, Manahan-Vaughan D. Locus coeruleus activation facilitates memory encoding and induces hippocampal LTD that depends on beta-adrenergic receptor activation. *Cereb Cortex*, 2009; 19: 2827-2837
- Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2003; 309(4): 1017-1026

- León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res.*, 2005; 38(1): 1-9
- Levites Y, Amit T, Mandel S, Youdim MB. Neuroprotection and neurorescue against Aβ toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J.*, 2003; 17: 952-954
- Li FJ, Shen L, Ji HF. Dietary intakes of vitamin E, vitamin C, and β-carotene and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *J Alzheimers Dis.*, 2012; 31(2): 253-258
- Li H, Lin S, Qin T, Li H, Ma Z, Ma S. Senegenin exerts anti-depression effect in mice induced by chronic un-predictable mild stress via inhibition of NF-κB regulating NLRP3 signal pathway. *Int Immunopharmacol.*, 2017; 53: 24-32
- Li Q, Zhao HF, Zhang ZF, Liu ZG, Pei XR, Wang JB, Cai MY, Li Y. Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6 J mice by regulating hippocampal cyclic amp-response element binding protein signaling cascade. *Neuroscience*, 2009; 159: 1208-1215
- Li S, Cullen WK, Anwyl R, Rowan MJ. Dopamine dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat Neurosci.*, 2003; 6: 526-531
- Li YM, Chan HYE, Huang Y, Chen ZY. Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies. *Mol Nutr Food Res.*, 2007; 51(5): 546-554
- Li YM, Chan HYE, Yao XQ, Huang Y, Chen ZY. Green tea catechins and broccoli reduce fat-induced mortality in *Drosophila melanogaster*. *J Nutr Biochem.*, 2008; 19(6): 376-383
- Libert S, Pointer K, Bell EL, Das A, Cohen DE, Asara JM, Kapur K, Bergmann S, Preisig M, Otowa T, Kendler KS, Chen X, Hettema JM, van den Oord EJ, Rubio JP, Guarente L. SIRT1 activates MAO-A in the brain to mediate anxiety and exploratory drive. *Cell*, 2011; 147(7): 1459-1472
- Lim BV, Jang MH, Shin MC, Kim HB, Kim YJ, Kim YP, Chung JH, Kim H, Shin MS, Kim SS, Kim EH, Kim CJ. Caffeine inhibits exercise induced increase in tryptophan hydroxylase expression in dorsal and median raphe of Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett.*, 2001; 308(1): 25-28
- Lim HD, Kim YS, Ko SH, Yoon IJ, Cho SG, Chun YH, Choi BJ, Kim EC. Cytoprotective and anti-inflammatory effects of melatonin in hydrogenperoxide-stimulated CHON-001 human chondrocyte cell line and rabbit model of osteoarthritis via the SIRT1 pathway. *J Pineal Res.*, 2012; 53(3): 225-237
- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2000; 289(5487): 2126-2128
- Liu BL, Zhang X, Zhang W, Zhen HN. New enlightenment of french paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancertherapy. *Cancer Biol Ther.*, 2007; 6(12): 1833-1836
- Liu H, Yang Y, Xia Y, Zhu W, Leak RK, Wei Z, Wang J, Hu X. Aging of cerebral white matter. *Ageing Res Rev.*, 2017; 34: 64-76
- Liu J, Atamna H, Kuratsune H, Ames BN. Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites. *Ann N Y Acad Sci.*, 2002; 959: 133-166
- Liu J, Yu H, Ning X. Effect of quercetin on chronic enhancement of spatial learning and memory of mice. *Sci China C Life Sci.*, 2006; 49(6): 583-590
- Liu L, Chan C. The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.*, 2014; 15: 6-15
- Liu L, Dong Y, Shan X, Li L, Xia B, Wang H. Anti-depressive effectiveness of baicalin in vitro and in vivo. *Molecules*, 2019a; 24(2): E326
- Liu S, Xu S, Wang Z, Guo Y, Pan W, Shen Z. Anti-depressant-like effect of sinomenine on chronic unpredictable mild stress-induced depression in a mouse model. *Med Sci Monit.*, 2018; 24: 7646-7653

- Liu X, Zhang Y, Yang X. Vitamin E reduces the extent of mouse brain damage induced by combined exposure to formaldehyde and PM2.5. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 2019b; 15; 172: 33-39
- Llorens-Martin MV, Tejada GS, Trejo JL. Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birthdating analysis. *PLoS One*, 2010; 5(8): e12188
- Lofrumento D, Nicolardi G, Cianciulli A, De Nuccio F, La Pesa V, Carofiglio V, Panaro M. Neuroprotective effects of resveratrol in an MPTP mouse model of Parkinson's like disease: possible role of SOCS-1 in reducing pro-inflammatory responses. *Innate Immun.*, 2014; 20(3): 249-260
- Lohmann P, Riepe MW. Neurotoxic effects of repetitive inhibition of oxidative phosphorylation in young adults surfacing with deficits of spatial learning in old age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 2007; 62(12): 1352-1356
- López-Miranda V, Soto-Montenegro ML, Vera G, Herradón E, Desco M, Abalo R. Resveratrol: un polifenol neuroprotector de la dieta mediterránea. *Revista de Neurología*, 2012; 54: 349-356
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hall marks of aging. *Cell*, 2013; 153(6): 1194-1217
- Louissaint Jr A, Rao S, Leventhal C, Goldman SA. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*, 2002; 34(6): 945-960
- Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem.*, 1962; 237: 89-93
- Lu Q, Mouri A, Yang Y, Kunisawa K, Teshigawara T, Hirakawa M, Mori Y, Yamamoto Y, Libo Z, Nabeshima T, Saito K. Chronic unpredictable mild stress-induced behavioral changes are coupled with dopaminergic hyperfunction and serotonergic hypofunction in mouse models of depression. *Behav Brain Res.*, 2019; 372: 112053
- Lucas LR, Celen Z, Tamashiro KL, Blanchard RJ, Blanchard DC, Markham C, Sakai RR, McEwen BS. Repeated exposure to social stress has long term effects on indirect markers of dopaminergic activity in brain regions associated with motivated behavior. *Neuroscience*, 2004; 124(2): 449-457
- Luchsinger JA, Tang MX., Shea S, Mayeux R. Antioxidant vitamin intake and risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol.*, 2003; 60(2): 203-208
- Luine V, Bowling D, Hearn M. Spatial memory deficits in aged rats: Contributions of monoaminergic systems. *Brain Res.*, 1990; 537: 271-278
- Luine V, Gomez J, Beck K, Bowman R. Sex differences in chronic stress effects on cognition in rodents. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2017; 152: 13-19
- Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res.*, 1994; 639(1): 167-170
- Luo DD, An SC, Zhang X. Involvement of hippocampal serotonin and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress. *Brain Res Bull.*, 2008; 77(1): 8-12
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 2001; 107(2): 137-148
- Lupien SJ, Gaudreau S, Tchiteya BM, Maheu F, Sharma S, Nair NP, Hauger RL, McEwen BS, Meaney MJ. Stress-induced declarative memory impairment in healthy elderly subjects: relationship to cortisol reactivity. *J Clin Endocrinol Metab.*, 1997; 82(7): 2070-2075
- Ma Q. Beneficial effects of moderate voluntary physical exercise and its biological mechanisms on brain health. *Neurosci Bull.*, 2008; 24(4): 265-270

- Maguire JJ, Wilson DS, Packer L. Mitochondrial electron transport-linked tocoperoxyl radical reduction. *J Biol Chem.*, 1989; 264(36): 21462-21465
- Mahar I, Bambico FR., Mechawar N, Nobrega JN. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci Biobehav Rev.*, 2014; 38: 173-192
- Mair W, Dillin A. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem.*, 2008; 77: 727-754
- Maki KC, Reeves MS, Farmer M, Yasunaga K, Matsuo N, Katsuragi Y, Komikado M, Tokimitsu I, Wilder D, Jones F, Blumberg JB, Cartwright Y. Green tea catechin consumption enhances exercise-induced abdominal fat loss in overweight and obese adults. *J Nutr.*, 2009; 139(2): 264-270
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.*, 2004; 79: 727-747
- Manahan-Vaughan D, Kulla A. Regulation of depotentiation and long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by dopamine D2-like receptors. *Cereb Cortex*, 2003; 13: 123-135
- Mancini E, Beglinger C, Drewe J, Zanchi D, Lang UE, Borgwardt S. Green tea effects on cognition, mood and human brain function: A systematic review. *Phytomedicine*, 2017; 34: 26-37
- Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res.*, 2002; 509: 127-151
- Mangialasche F, Westman E, Kivipelto M, Muehlboeck JS, Cecchetti R, Baglioni M, Tarducci R, Gobbi G, Floridi P, Soininen H, Kloszewska I, Tsolaki M, Vellas B, Spenger C, Lovestone S, Wahlund LO, Simmons A, Mecocci P. Classification and prediction of clinical diagnosis of Alzheimer's disease based on MRI and plasma measures of alpha-/gamma-tocotrienols and gamma-tocopherol. *J Intern Med.*, 2013; 273: 602-621
- Mannari C, Bertelli E, Stiaccini G, Giovannini L. Wine, sirtuins and nephroprotection: not only resveratrol. *Med Hypotheses*, 2010; 75(6): 636-638
- Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2005; 827(1): 65-75
- Marighetto A, Touzani K, Etchamendy N, Torrea CC, De Nanteuil G, Guez D, Jaffard R, Morain P. Further evidence for a dissociation between different forms of mnemonic expressions in a mouse model of age-related cognitive decline: effects of tacrine and S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor. *Learn Mem.*, 2000; 7(3): 159-169
- Markham JA, Herting MM, Luszpak AE, Juraska JM, Greenough WT. Myelination of the corpus callosum in male and female rats following complex environment housing during adulthood. *Brain Res.*, 2009; 1288: 9-17
- Marlatt MW, Lucassen PJ, van Praag H. Comparison of neurogenic effects of fluoxetine, duloxetine and running in mice. *Brain Res.*, 2010; 1341: 93-99
- Mármol F, Rodríguez CA, Sánchez J, Chamizo VD. Anti-oxidative effects produced by environmental enrichment in the hippocampus and cerebral cortex of male and female rats. *Brain Res.*, 2015; 1613: 120-129
- Mármol F, Sánchez J, Torres MN, Chamizo VD. Environmental enrichment in the absence of wheel running produces beneficial behavioural and anti-oxidative effects in rats. *Behav Processes*, 2017; 144: 66-71
- Martin A, Janigian D, Shukitt-Hale B, Prior RL, Joseph JA. Effect of vitamin E intake on levels of vitamins E and C in the central nervous system and peripheral tissues: Implications for health recommendations. *Brain Res.*, 1999; 845: 50-59

- Martin A, Prior R, Shukitt-Hale B, Cao G, Joseph JA. Effect of fruits, vegetables, or vitamin E-rich diet on vitamins E and C distribution in peripheral and brain tissues: Implications for brain function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 2000a; 55: B144-151
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM. Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.*, 2000b; 23: 649-711
- Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev.*, 2005; 126(9): 913-922
- Maswood N, Young J, Tilmont E, Zhang Z, Gash DM, Gerhardt GA, Grondin R, Roth GS, Mattison J, Lane MA, Carson RE, Cohen RM, Mouton PR, Quigley C, Mattison MP, Ingram DK. Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101(52): 18171-18176
- Matsuyama T, Tanaka Y, Kamimaki I, Nagao T, Tokimitsu I. Catechin safely improved higher levels of fatness, blood pressure, and cholesterol in children. *Obesity*, 2008; 16(6): 1338-1348
- Mattison JA, Lane MA, Roth GS, Ingram DK. Calorie restriction in rhesusmonkeys. *Exp Gerontol.*, 2003; 38(1-2): 35-46
- Mattison MP. Energy Intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell Metab.*, 2012; 16(6): 706-722
- Mattison MP. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res.*, 2000; 886: 47-53
- Mattison MP, Arumugam TV. Hallmarks of brain aging: Adaptive and pathological modification by metabolic states. *Cell Metab.*, 2018; 27: 1176-1199
- Mattson M, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT; a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.*, 2004; 27: 589-594
- Matsuo M, Gomi F, Kuramoto K, Sagai M. Food restriction suppresses an age-dependent increase in the exhalation rate of pentane from rats: longitudinal study. *J Gerontol.*, 1993; 48(4): B133-136
- Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 1995; 49: 345-361
- Mayers JR, Iliff BW, Swoap SJ Resveratrol treatment in mice does not elicit the bradycardia and hypothermia associated with calorie restriction. *FASEB J.*, 2009; 23(4): 1032-1040
- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life and upon ultimate size. *J Nutr.*, 1935; 10: 63-79
- McDowd J, Verduyssen M, Birren JE. Aging, divided attention, and dual-task performance. Multiple-task performance. In: DL Damos (Ed.), London: Taylor and Francis, 1991; 387-414
- McEwen BS. Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging*, 2002; 23(5): 921-939
- McEwen BS. Stress, sex and neural adaptation to a changing environment: mechanisms of neuronal remodeling. *Ann N Y Acad Sci.*, 2010; 1204: 38-59
- McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.*, 2000; 886: 172-189
- McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav.*, 2003; 43: 2-15
- McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature*, 1968; 220: 911-912
- McNeill TH, Koek LL, Haycock JW. The nigrostriatal system and aging. *Peptides*, 1984; 5: 263-268

- Meberg P, Kinney W, Valcourt E, Routtenberg A. Gene expression of the transcription factor NF- κ B in hippocampus: regulation by synaptic activity. *Mol Brain Res.*, 1996; 38: 179-190
- Meeusen R, De Meirleir K. Exercise and brain neurotransmission. *Sports Med.*, 1995; 20(3): 160-188
- Meeusen R, Watson P, Dvorak J. The brain and fatigue: new opportunities for nutritional interventions? *J Sports Sci.*, 2006; 24: 773-782
- Meneses A. 5-HT system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev.*, 1999; 23: 1111-1125
- Meng J, Ren B, Xu Y, Kamendulis LM, Dum N, Klaunig JE. Reduction of oxidative DNA damage (comet assay) in white blood cells by black tea consumption in smokers and non-smokers. *Toxicological Sciences*, 2001; 60: 411-412.
- Mesquita A, Weinberger M, Silva A, Sampaio-Marques B, Almeida B, Leão C, Costa V, Rodrigues F, Burhans WC, Ludovico P. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107(34): 15123-15128
- Meydani M. Vitamin E. *Lancet*, 1995; 345(8943): 170-175
- Mhatre M, Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: Common links and potential therapeutic targets. *J Alzheimers Dis.*, 2004; 6: 147-157
- Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J.*, 2007; 404(1): 1-13
- Michán S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W, Mervis RF, Chen J, Guerin KI, Smith LE, McBurney MW, Sinclair DA, Baudry M, de Cabo R, Longo VD. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci.*, 2010; 30(29): 9695-9707
- Micheau J, Riedel G. Protein kinases: Which one is the memory molecule? *Cell Mol Life Sci.*, 1999; 55: 534-548
- Mikova O, Yakimova R, Bosmans E, Maes M. Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 2001; 11(3): 203-208
- Min YK, Chung SH, Lee JS, Kim SS, Shin HD, Lim BV, Shin MC, Jang MH, Kim EH, Kim CJ. Red ginseng inhibits exercise induced increase in 5-hydroxytryptamine synthesis and tryptophan hydroxylase expression in dorsal raphe of rats. *J Pharmacol Sci.*, 2003; 93(2): 218-221
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience*, 2007; 150(2): 251-259
- Minor RK, Baur JA, Gomes AP, Ward TM, Csiszar A, Mercken EM, Abdelmohsen K, Shin YK, Canto C, Scheibye-Knudsen M, Krawczyk M, Irusta PM, Martín-Montalvo A, Hubbard BP, Zhang Y, Lehrmann E, White AA, Price NL, Swindell WR, Pearson KJ, Becker KG, Bohr VA, Gorospe M, Egan JM, Talan MI, Auwerx J, Westphal CH, Ellis JL, Ungvari Z, Vlasuk GP, Elliott PJ, Sinclair DA, de Cabo R. SRT1720 improves survival and healthspan of obese mice. *Sci Rep.*, 2011; 1: 70
- Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 2003; 119: 887-897
- Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Ostan R, Cevenini E, Gonos ES, Franceschi C, Monti D. Vitamin E-gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: implications for treatment. A systematic review. *Ageing Res Rev.*, 2014; 14: 81-101
- Moghaddam B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem.*, 1993; 60: 1650-1657

- Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond MC, Eriksson PS, Bogdanovic N. Environmental enrichment and the brain. *Prog Brain Res.*, 2002; 138: 109-133
- Möller P, Löhr M, Folkmann JK, Mikkelsen L, Loft S. Aging and oxidatively damaged nuclear DNA in animal organs. *Free Radic Biol Med.*, 2010; 48(10): 1275-1285
- Montes S, Yee-Rios Y, Páez-Martínez N. Environmental enrichment restores oxidative balance in animals chronically exposed to toluene: Comparison with melatonin. *Brain Res Bull.*, 2019; 144: 58-67
- Mora F. ¿Se puede retrasar el envejecimiento del cerebro? Madrid, Spain: Alianza Editorial, 2011.
- Mora F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. *Dialogues Clin Neurosci.*, 2013; 15(1): 45-52
- Mora F, Segovia G, del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev.*, 2007; 55: 78-88
- Mora F, Segovia G, del Arco A, de Blas M., Garrido P. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Res.*, 2012; 1476: 71-85
- Moranta D, Barcelo P, Aparicio S, Garau C, Sarubbo F, Ramis M, Nicolau C, Esteban S. Intake of melatonin increases tryptophan hydroxylase type 1 activity in aged rats: Preliminary study. *Exp Gerontol.*, 2014; 49: 1-4
- Morgan DG, May PC, Finch CE. Dopamine and serotonin systems in human and rodent brain: Effects of age and neurodegenerative disease. *J Am Geriatr Soc.*, 1987; 35: 334-345
- Morris BJ. Seven vintners for seven deadly diseases of aging. *Free Radic Biol Med.*, 2013; 56: 133-171
- Morrison AB, Chein JM. Does working memory training work? The promise and challenges of enhancing cognition by training working memory. *Psychon Bull Rev.*, 2011; 18: 46-60
- Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, Nadel L. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat.*, 2005; 207(1): 35-66
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*, 2004; 116(4): 551-563
- Mukai K, Kikuchi S, Urano S. Stopped-flow kinetic study of the regeneration reaction of tocopheroxyl radical by reduced ubiquinone-10 in solution. *Biochim Biophys Acta.*, 1990; 1035(1): 77-82
- Muñoz A, Corrêa CL, Lopez-Lopez A, Costa-Besada MA, Diaz-Ruiz C, Labandeira-Garcia JL. Physical exercise improves aging-related changes in angiotensin, IGF-1, SIRT1, SIRT3, and VEGF in the substantia nigra. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 2018; 10; 73(12): 1594-1601
- Murphy T, Dias GP, Thuret S. Effects of diet on brain plasticity in animal and human studies: mind the gap. *Neural Plast.*, 2014; 2014: 563160
- Murray CA, Lynch MA. Dietary supplementation with vitamin E reverses the age-related deficit in long term potentiation in dentate gyrus. *J Biol Chem.*, 1998; 273: 12161-12168
- Mustroph ML, Chen S, Desai SC, Cay EB, DeYoung EK, Rhodes JS. Aerobic exercise is the critical variable in an enriched environment that increases hippocampal neurogenesis and water maze learning in male C57BL/6J mice. *Neuroscience*, 2012; 219: 62-71
- Nagib MM, Tadros MG, Al-Khalek HAA, Rahmo RM, Sabri NA, Khalifa AE, Masoud SI. Molecular mechanisms of neuroprotective effect of adjuvant therapy with phenytoin in pentylenetetrazole-induced seizures: Impact on Sirt1/NRF2 signaling pathways. *Neurotoxicology*, 2018; 68: 47-65

- Naka F, Shiga T, Yaguchi M, Okado N. An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Res.*, 2002; 924: 124-126
- Nakagawa K, Miyazawa T. Absorption and distribution of tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol.*, 1997; 43(6): 679-684
- Navarro A, Bandez MJ, Lopez-Cepero JM, Gómez C, Boveris A. High doses of vitamin E improve mitochondrial dysfunction in rat hippocampus and frontal cortex upon aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2011; 300: R827-834
- Navarro A, Gómez C, Sánchez-Pino MJ, González H, Bández MJ, Boveris AD, Boveris A. Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2005; 289: R1392-1399
- Neidl R, Schneider A, Bousiges O, Majchrzak M, Barbelivien A, de Vasconcelos AP, Dorgans K, Doussau F, Loeffler JP, Cassel JC, Boutillier AL. Late-life environmental enrichment induces acetylation events and nuclear factor κ B-dependent regulations in the hippocampus of aged rats showing improved plasticity and learning. *J Neurosci.*, 2016; 36(15): 4351-4361
- Newsholme E, Acworth I, Blomstrand E. Amino-acids, brain neurotransmitters and a functional link between muscle and brain that is important in sustained exercise. *Advances in myochemistry*. In: G Benzi (Ed.). London: John Libbey Eurotext Ltd., 1987; 127-133
- Ngandu T, Lehtisalo J, Solomon A, Levälähti E, Ahtiluoto S, Antikainen R, Bäckman L, Hänninen T, Jula A, Laatikainen T, Lindström J, Mangialasche F, Paajanen T, Pajala S, Peltonen M, Rauramaa R, Stigsdotter-Neely A, Strandberg T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet*, 2015; 385(9984): 2255-2263
- Nicastro TM, Greenwood BN. Central monoaminergic systems are a site of convergence of signals conveying the experience of exercise to brain circuits involved in cognition and emotional behavior. *Curr Zool.*, 2016; 62(3): 293-306
- Niki E, Noguchi N, Gotoh N. Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidants. *Biochem Soc Trans.*, 1993; 21: 313-317
- Nissbrandt H, Engberg G, Wikström H, Magnusson T, Carlsson A. NSD 1034: an amino acid decarboxylase inhibitor with a stimulatory action on dopamine synthesis not mediated by classical dopamine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 1988; 338(2): 148-161
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.*, 2006; 7(9): 697-709
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol.*, 2009; 89: 369-382
- Noguès X, Jaffard R, Micheau J. Investigations on the role of hippocampal protein kinase C on memory processes: pharmacological approach. *Behav Brain Res.*, 1996; 75(1-2): 139-146
- Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol.*, 2014; 13: 788-794
- Nyakas C, Buwalda B, Luiten PGM, Bohus B. Effect of low amphetamine doses on cardiac responses to emotional stress in aged rats. *Neurobiol Aging*, 1992; 13: 123-129
- Nyhuis TJ, Masini CV, Sasse SK, Day HE, Campeau S. Physical activity, but not environmental complexity, facilitates HPA axis response habituation to repeated audiogenic stress despite neurotrophin mRNA regulation in both conditions. *Brain Res.*, 2010; 1362: 68-77

- O'Hagan HM, Mohammad HP, Baylin SB. Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet.*, 2008; 4(8): e1000155
- O'Shea L, Saari M, Pappas BA, Ings R, Stange K. Neonatal 6-hydroxydopamine attenuates the neural and behavioral effects of enriched rearing in the rat. *Eur J Pharmacol.*, 1983; 19; 92(1-2): 43-47
- Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, Hartlerode A, Stegmüller J, Hafner A, Loerch P, Wright SM, Mills KD, Bonni A, Yankner BA, Scully R, Prolla TA, Alt FW, Sinclair DA. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell*, 2008; 135(5): 907-918
- Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspec Biol.*, 2009; 1(4): 1-14
- Ogle W, Speisman R, Ormerod B. Potential of treating age-related depression and cognitive decline with nutraceutical approaches: A mini-review. *Gerontology*, 2013; 59(1): 23-31
- Okamura N, Garau C, Duangdao DM, Clark SD, Jüngling K, Pape HC, Reinscheid RK. Neuropeptide S enhances memory during the consolidation phase and interacts with noradrenergic systems in the brain. *Neuropsychopharmacology*, 2011; 36(4): 744-752
- Oliff HS, Berchtold NC, Isackson P, Cotman CW. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res.*, 1998; 61: 147-153.
- Olton DS, Samuelson RJ. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process.*, 1976; 2: 97-116
- Omodei D, Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett.*, 2011; 585(11): 1537-1542
- Oomen CA, Mayer JL, de Kloet ER, Joels M, Lucassen PJ. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur J Neurosci.*, 2007; 26: 3395-3401
- Opendak M, Gould E. Adult neurogenesis: a substrate for experience dependent change. *Trends Cogn Sci.*, 2015; 19: 151-161
- Orsetti M, Colella L, Dellarole A, Canonico PL, Ghi P. Modification of spatial recognition memory and object discrimination after chronic administration of haloperidol, amitriptyline, sodium valproate or olanzapine in normal and anhedonic rats. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 2007; 10(3): 345-357
- Ota KT, Duman RS. Environmental and pharmacological modulations of cellular plasticity: role in the pathophysiology and treatment of depression. *Neurobiol Dis.*, 2013; 57: 28-37
- Otero P, Bonet B, Herrera E, Rabano A. Development of atherosclerosis in the diabetic BALB/c mice. Prevention with vitamin E administration. *Atherosclerosis*, 2005; 182: 259-265
- Ouahchi K, Arita M, Kayden H, Hentati F, Ben Hamida M, Sokol R, Arai H, Inoue K, Mandel JL, Koenig M. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the α -tocopherol transfer protein. *Nat Genet.*, 1995; 9: 141-145
- Ozbeyleli D, Gokalp AG, Koral T, Ocal OY, Dogan B, Akakin D, Yuksel M, Kasimay O. Protective effect of exercise and sildenafil on acute stress and cognitive function. *Physiol Behav.*, 2015; 151: 230-237
- Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, Ahn K. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem.*, 2010; 285(11): 8340-8351

- Packard M, Knowlton B. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci.*, 2002; 25: 563-593
- Packard M, McGaugh J. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav Neurosci.*, 1992; 106(3): 439-446
- Packard M, Teather L. Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiol Learn Mem.*, 1998; 69(2): 163-203
- Pallàs M, Porquet D, Vicente A, Sanfeliu C. Resveratrol: new avenues for a natural compound in neuroprotection. *Curr Pharm Des.*, 2013; 19(38): 6726-6731
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.*, 2000; 425(4): 479-494
- Pan MH, Lai CS, Wu JC, Ho CT. Epigenetic and disease targets by polyphenols. *Curr Pharm Des.*, 2013; 19(34): 6156-6185
- Pandey K, Rizvi S. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.*, 2009; 2(5): 270-278
- Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, Chen KY, Manabe Y, Ward 3rd JL, Goodyear LJ, Tong Q. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 in skeletal muscle. *Aging*, 2009; 1(9): 771-783
- Park DC, Reuter-Lorenz P. The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Ann Rev Psychol.*, 2009; 60: 173-196
- Park DC, Lautenschlager G, Hedden T, Davidson NS, Smith AD, Smith PK. Models of visuospatial and verbal memory across the adult life span. *Psychol Aging*, 2002; 17(2): 299-320
- Park SK, Kim K, Page GP, Allison DB, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profiling of aging in multiple mouse strains: identification of aging biomarkers and impact of dietary antioxidants. *Aging Cell*, 2009; 8(4): 484-495
- Pasbakhsh P, Omidi N, Mehrannia K, Sobhani AG, Ragerdi Kashani I, Abbasi M, Valeshabad AK. The protective effect of vitamin E on locus coeruleus in early model of Parkinson's disease in rat: Immunoreactivity evidence. *Iran Biomed J.*, 2008; 12: 217-222
- Pascual-Leone A, Freitas C, Oberman L, Horvath JC, Halko M, Eldaief M, Bashir S, Vernet M, Shafi M, Westover B, Vahabzadeh-Hagh AM, Rotenberg A. Characterizing brain cortical plasticity and network dynamics across the age-span in health and disease with TMS-EEG and TMS-fMRI. *Brain Topogr.*, 2011; 24, 302-315
- Patil SS, Sunyer B, Höger H, Lubec G. Evaluation of spatial memory of C57BL/6J and CD1 mice in the Barnes maze, the Multiple T-maze and in the Morris water maze. *Behav Brain Res.*, 2009; 198(1): 58-68
- Pavlopoulos E, Jones S, Kosmidis S, Close M, Kim C, Kovalerchik O, Small SA, Kandel ER. Molecular mechanism for age-related memory loss: the histone-binding protein RbAp48. *Sci Transl Med.*, 2013; 5(200): 200ra115
- Payer D, Marshuetz C, Sutton B, Hebrank A, Welsh RC, Park DC. Decreased neural specialization in old adults on a working memory task. *Neuroreport*, 2006; 17:487-491
- Paylor R, Morrison SK, Rudy JW, Waltrip LT, Wehner JM. Brief exposure to an enriched environment improves performance on Morris water task and increases hippocampal cytosolic PKC activity. *Behav Brain Res.*, 1992; 52: 49-59
- Peng C, Chan HY, Li YM, Huang Y, Chen ZY. Black tea theaflavins extend the lifespan of fruit flies. *Exp Geront.*, 2009; 44(12): 773-783

- Peng C, Wang X, Chen J, Jiao R, Wang L, Li YM, Zuo Y, Liu Y, Lei L, Ma KY, Huang Y, Chen ZY. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed Res Int.*, 2014; 2014: 831841.
- Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104: 5638-5643
- Perez-Garcia G, Meneses A. Memory formation, amnesia, improved memory and reversed amnesia: 5-HT role. *Behav Brain Res.*, 2008; 195: 17-29
- Perrig WJ, Perrig P, Stahelin HB. The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old. *J Am Geriatr Soc.*, 1997; 45(6): 718-724
- Pervin M, Unno K, Ohishi T, Tanabe H, Miyoshi N, Nakamura Y. Beneficial effects of green tea catechins on neurodegenerative diseases. *Molecules*, 2018; 23(6): E1297
- Pervin M, Unno K, Takagaki A, Isemura M, Nakamura Y. Function of green tea catechins in the brain: Epigallocatechin gallate and its metabolites. *Int J Mol Sci.*, 2019; 20(15): E3630
- Peters R. Ageing and the brain. *Postgrad Med J.*, 2006; 82(964): 84-88
- Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.*, 1985; 98(4): 1154-1162
- Petersen RC, Thomas RG, Grundman M, Bennett D, Doody R, Ferris S, Galasko D, Jin S, Kaye J, Levey A, Pfeiffer E, Sano M, van Dyck CH, Thal LJ. Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *N Engl J Med.*, 2005; 352: 2379-2388
- Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2002; 73: 167-175
- Phillips A. Mesocorticolimbic dopamine: a neurochemical link between motivation and memory. *International Congress Series*, 2003; 1250: 509-526
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*, 2004; 429(6993): 771-776
- Pieramico V, Esposito R, Cesinaro S, Frazzini V, Sensi SL. Effects of non-pharmacological or pharmacological interventions on cognition and brain plasticity of aging individuals. *Front Syst Neurosci.*, 2014; 8: 153
- Pietá Dias C, Martins de Lima MN, Presti-Torres J, Dornelles A, Garcia VA, Siciliani Scalco F, Rewsaat Guimarães M, Constantino L, Budni P, Dal-Pizzol F, Schröder N. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience*, 2007; 146(4): 1719-1725
- Pirola L, Fröjdö S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life*, 2008; 60(5): 323-332
- Pitossi F, Del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res.*, 1997; 48: 287-298
- Pitozzi V, Jacomelli M, Catelan D, Servili M, Taticchi A, Biggeri A, Dolara P, Giovannelli L. Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: role of oxidative stress. *Rejuvenation Res.*, 2012; 15(6): 601-612
- Poeggeler B. Melatonin, aging, and age-related diseases: perspectives for prevention, intervention, and therapy. *Endocrine*, 2005; 27: 201-212

- Poldrack R, Packard M. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*, 2003; 41: 245-251
- Polito L, Chierchia A, Tunesi M, Bouybayoune I, Kehoe PG, Albani D, Forloni G. Environmental enrichment lessens cognitive decline in APP23 mice without affecting brain sirtuin expression. *J Alzheimers Dis.*, 2014; 42(3): 851-864
- Pollard SE, Kuhnle GG, Vauzour D, Vafeiadou K, Tzounis X, Whiteman M, Rice-Evans C, Spencer JP. The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2006; 350: 960-968
- Pompl PN, Mullan MJ, Bjugstad K, Arendash GW. Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci Methods*, 1999; 87(1): 87-95
- Prakash RS, Voss MW, Erickson KI, Kramer AF. Physical activity and cognitive vitality. *Annu Rev Psychol.*, 2015; 66: 769-797
- Prasanth MY, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C, Tencomnao T. A review of the role of green tea (*Camellia sinensis*) in antiphotaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy. *Nutrients*, 2019; 11(2): 474
- Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.*, 2012; 15 (5), 675-690
- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.*, 2013; 9(1): 63-75
- Pu L, Igbavboa U, Wood WG, Roths JB, Kier AB, Spener F, Schroeder F. Expression of fatty acid binding proteins is altered in aged mouse brain. *Mol Cell Biochem.*, 1999; 198(1-2): 69-78
- Qin W, Yang T, Ho L, Zhao Z, Wang J, Chen L, Pasinetti G. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem.*, 2006; 281(31): 21745-21754
- Quesseveur G, Gardier AM, Guiard BP. The monoaminergic tripartite synapse: a putative target for currently available antidepressant drugs. *Curr Drug Targets*, 2013; 14(11): 1277-1294
- Quintas A, De Solís AJ, Díez-Guerra FJ, Carrascosa JM, Bogoñez E. Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus. Prevention by late onset caloric restriction. *Exp Gerontol.*, 2012; 47(2): 198-201
- Quivy V, Van Lint C. Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol.*, 2004; 68(6): 1221-1229
- Rabelo PC, Almeida TF, Guimaraes JB, Barcellos LA, Cordeiro LM, Moraes MM, Coimbra CC, Szawka RE, Soares DD. Intrinsic exercise capacity is related to differential monoaminergic activity in the rat forebrain. *Brain Res Bull.*, 2015; 112: 7-13
- Radak Z, Chung HY, Goto S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology*, 2005, 6: 71-75
- Radák Z, Silye G, Bartha C, Jakus J, Stefanovits-Bányai E, Atalay M, Marton O, Koltai E. The effects of cocoa supplementation, caloric restriction, and regular exercise, on oxidative stress markers of brain and memory in the rat model. *Food Chem Toxicol.*, 2013; 61: 36-41
- Rai A, Gill M, Kinra M, Shetty R, Krishnadas N, Rao CM, Sumalatha S, Kumar N. Catechin ameliorates depressive symptoms in Sprague Dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress by decreasing oxidative stress. *Biomed Rep.*, 2019; 11(2): 79-84

- Rahman MS, Thomas P. Restoration of tryptophan hydroxylase functions and serotonin content in the Atlantic croaker hypothalamus by antioxidant treatment during hypoxic stress. *Front Neurosci.*, 2014; 8: 130
- Ramis MR, Esteban S, Miralles A, Tan D-X, Reiter RJ. Caloric restriction, resveratrol and melatonin: role of SIRT1 and implications for ageing and related-diseases. *Mech Ageing Dev.*, 2015a; 146 -148: 28-41
- Ramis MR, Esteban S, Miralles A, Tan D-X, Reiter RJ. Protective effects of melatonin and mitochondria-targeted antioxidants against oxidative stress: A review. *Curr Med Chem.*, 2015b; 22 (22): 2690-2711
- Ramis MR, Sarubbo F, Moranta D, Tejada S, Lladó J, Miralles A, Esteban S. Cognitive and neurochemical changes following polyphenol-enriched diet in rats. *Nutrients*, 2021a; 13(1): 59
- Ramis MR, Sarubbo F, Moranta D, Tejada S, Lladó J, Miralles A, Esteban S. Neurochemical and cognitive beneficial effects of moderate physical activity and catechin in aged rats. *Antioxidants*, 2021b; 10(4): 621.
- Ramis M, Sarubbo F, Sola J, Aparicio S, Garau C, Miralles A, Esteban S. Cognitive improvement by acute growth hormone is mediated by NMDA and AMPA receptors and MEK pathway. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013; 45: 11-20
- Ramis MR, Sarubbo F, Tejada S, Jiménez M, Esteban S, Miralles A, Moranta D. Chronic Polyphenon-60 or Catechin treatments increase brain monoamines syntheses and hippocampal SIRT1 levels improving cognition in aged rats. *Nutrients*, 2020; 12(2): 326
- Ramis MR, Sarubbo F, Terrasa JL, Moranta D, Aparicio S, Miralles A, Esteban S. Chronic α -tocopherol increases central monoamines synthesis and improves cognitive and motor abilities in old rats. *Rejuvenation Res.*, 2016; 19(2): 159-171
- Ramkumar K, Srikumar BN, Shankaranarayana Rao BS, Raju TR. Self-stimulation rewarding experience restores stress-induced CA3 dendritic atrophy, spatial memory deficits and alterations in the levels of neurotransmitters in the hippocampus. *Neurochem Res.*, 2008; 33(9): 1651-1662
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neurosci.*, 2000; 3: 238-244
- Randall P, Pardo M, Nunes E, López Cruz L, Vemuri V, Makriyannis A. Dopaminergic Modulation of Effort-Related Choice Behavior as Assessed by a Progressive Ratio Chow Feeding Choice Task: Pharmacological Studies and the Role of Individual Differences. *PLoS One*, 2012; 7(10): e47934
- Rattan SI. Aging is not a disease: implications for intervention. *Aging Dis.*, 2014; 5(3): 196-202
- Rattan SI. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radic Res.*, 2006; 40(12): 1230-1238
- Raval AP, Dave KR, Pérez-Pinzón MA. Resveratrol mimics ischemic preconditioning in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2006; 26(9): 1141-1147
- Raval AP, Lin HW, Dave KR, Defazio RA, Della Morte D, Kim EJ, Perez-Pinzon MA. Resveratrol and ischemic preconditioning in the brain. *Curr Med Chem.*, 2008; 15(15): 1545-1551
- Raz N, Gunning-Dixon F, Head D, Rodrigue KM, Williamson A, Acker JD. Aging, sexual dimorphism, and hemispheric asymmetry of the cerebral cortex: replicability of regional differences in volume. *Neurobiol Aging*, 2004; 25: 377-396
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.*, 2008; 22: 659-661

- Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Prog Neurobiol.*, 1998; 56(3): 359-384
- Reiter RJ, Craft CM, Johnson Jr JE, King TS, Richardson BA, Vaughan GM, Vaughan MK. Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. *Endocrinology*, 1981; 109(4): 1295-1297
- Reiter RJ, Richardson BA, Johnson LY, Ferguson BN, Dinh DT. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science*, 1980; 210: 1372-1373
- Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 1992; 339(8808): 1523-1526
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.*, 1996; 20: 933-956
- Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr.*, 2003; 133(10): 3285S-3292S
- Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2003; 24(7): 915-919
- Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS). *Dose Response*, 2014; 12(2): 288-341
- Rizzo V, Richman J, Puthanveetil S. Dissecting mechanisms of brain aging by studying the intrinsic excitability of neurons. *Front Aging Neurosci.*, 2015; 6: 337
- Robb EL, Winkelmolen L, Visanji N, Brotchie J, Stuart JA. Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2008; 372(1): 254-259
- Robertson IH. A noradrenergic theory of cognitive reserve: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2013; 34: 298-308
- Robertson IH. A right hemisphere role in cognitive reserve. *Neurobiol Aging*, 2014; 35: 1375-1385
- Rocha-González HI, Ambriz-Tututi M, Granados-Soto V. Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther.*, 2008; 14(3): 234-247
- Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104(31): 12861-12866
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.*, 2004; 36(1): 1-9
- Rodrigues Siqueira I, Fochesatto C, da Silva Torres IL, Dalmaz C, Alexandre Netto C. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Sci.*, 2005; 78(3): 271-278
- Rojic-Becker D, Portero-Tresserra M, Martí-Nicolovius M, Vale-Martínez A, Guillazo-Blanch G. Caloric restriction modulates the monoaminergic and glutamatergic systems in the hippocampus, and attenuates age-dependent spatial memory decline. *Neurobiol Learn Mem.*, 2019; 166: 107107
- Rose K, Parmar M, Cavanaugh J. Dietary supplementation with resveratrol protects against striatal dopaminergic deficits produced by in utero LPS exposure. *Brain Res.*, 2014; 1573: 37-43
- Rosenzweig ES, Barnes CA. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol.*, 2003; 69: 143-179
- Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res.*, 1996; 78: 57-65

- Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol.*, 1962; 55, 429-437
- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M. Brain-derived neurotrophic factor BDNF is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci.*, 2006; 24: 1850-1856
- Roth GS, Joseph JA. Cellular and molecular mechanisms of impaired dopaminergic function during aging. *Ann N Y Acad Sci.*, 1994; 719: 129-135
- Rothenberg DO, Zhang L. Mechanisms underlying the anti-depressive effects of regular tea consumption. *Nutrients*, 2019; 11(6): E1361
- Rothman SM, Griffioen KJ, Wan R, Mattson MP. Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health. *Ann N Y Acad Sci.*, 2012; 1264(1): 49-63
- Rubin RT, Mandell AJ, Crandall PH. Corticosteroid responses to limbic stimulation in man: localization of stimulation sites. *Science*, 1966; 153: 1212-1215
- Rueda-Orozco P, Soria-Gomez E, Montes-Rodriguez C, Martínez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, Prospero-García O. A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology*, 2008; 198(4): 565-576
- Ryan SM, Nolan YM. Neuroinflammation negatively affects adult hippocampal neurogenesis and cognition: can exercise compensate? *Neurosci Biobehav Rev.*, 2016; 61: 121-131
- Sachs GA, Carter R, Holtz LR, Smith F, Stump TE, Tu W, Callahan CM. Cognitive impairment: an independent predictor of excess mortality a cohort study. *Ann Intern Med.*, 2011; 155(5): 300-308
- Sahakian BJ, Sarna GS, Kantamaneni BD, Jackson A, Hutson PH, Curzon G. Association between learning and cortical catecholamines in non-drug-treated rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985; 86: 339-343
- Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, Igarashi M, Komiya Y, Ando S. Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *J Neurosci Res.*, 1994; 39(1): 57-62
- Sale S, Verschoyle RD, Boocock D, Jones DJ, Wilsher N, Ruparelia KC, Potter GA, Farmer PB, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. *Br J Cancer*, 2004; 90(3): 736-744
- Sallam N, Laher I. Exercise modulates oxidative stress and inflammation in aging and cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev.*, 2016; 2016: 7239639
- Salminen A, Ojala J, Huuskonen J, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. Interaction of aging-associated signaling cascades: Inhibition of NF-kappaB signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cell Mol Life Sci.*, 2008; 65(7-8): 1049-1058
- Salthouse TA. *Adult cognition: An experimental psychology of human aging*. New York: Springer, 1982.
- Salthouse TA. Attentional blocks are not responsible for age-related slowing. *J Gerontol.*, 1993; 48(6): P263-270
- Salthouse TA. Cognitive aspects of motor functioning. *Ann N Y Acad Sci.*, 1988; 515: 33-41
- Salthouse TA, Somberg BL. Isolating the age deficit in speeded performance. *J Gerontol.*, 1982; 37: 59-63

- Sandi C. The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plast.*, 1998; 6(3): 41-52
- Sandi C, Pinelo-Nava T. Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast.*, 2007; 2007: 78970
- Sandi C, Touyarot K. Mid-life stress and cognitive deficits during early aging in rats: individual differences and hippocampal correlates. *Neurobiol Aging*, 2006; 27: 128-140
- Sandi C, Davies HA, Cordero MI, Rodriguez JJ, Popov VI, Stewart MG. Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training. *Eur J Neurosci.*, 2003; 17(11): 2447-2456
- Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 1997; 336: 1216-1222
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging: glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev.*, 1986; 7: 284-301
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.*, 2000; 21: 55-89
- Sara SJ, Dyon-Laurent C, Hervé A. Novelty seeking behavior in the rat is dependent upon the integrity of the noradrenergic system. *Brain Res Cogn Brain Res.*, 1995; 2: 181-187
- Sara SJ, Vankov A, Hervé A. Locus coeruleus-evoked responses in behaving rats: A clue to the role of noradrenaline in memory. *Brain Res Bull.*, 1994; 35: 457-465
- Sarbadhikari SN, Saha AK. Moderate exercise and chronic stress produce counteractive effects on different areas of the brain by acting through various neurotransmitter receptor subtypes: a hypothesis. *Theor Biol Med Model*, 2006; 23: 33-43
- Sarubbo F, Ramis MR, Aparicio S, Ruiz L, Esteban S, Miralles A, Moranta D. Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats. *Age (Dordr)*, 2015; 37(3): 9777
- Sarubbo F, Ramis MR, Kienzer C, Aparicio S, Esteban S, Miralles A, Moranta D. Chronic silymarin, quercetin and naringenin treatments increase monoamines synthesis and hippocampal Sirt1 levels improving cognition in aged rats. *J Neuroimmune Pharmacol.*, 2018; 13(1): 24-38
- Sastre J, Pallardó FV, Viña, J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, 2000; 49(5): 427-435
- Sauve AA, Moir RD, Schramm VL, Willis IM. Chemical activation of Sir2-dependent silencing by relief of nicotinamide inhibition. *Mol Cell.*, 2005; 17(4): 595-601
- Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem.*, 2006; 75: 435-465
- Scalbert A, Johnson I, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.*, 2005a; 81(1): 215S-217S
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 2005b; 45(4): 287-306
- Schaar CE, Dues DJ, Spielbauer KK, Machiela E, Cooper JF, Senchuk M, Hekimi S, Van Raamsdonk JM. Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan. *PLoS Genet.*, 2015; 11(2): e1004972
- Schaffer S, Halliwell B. Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes Nutr.*, 2012; 7(2): 99-109

- Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.*, 1999; 5(4): 139-143
- Schaumburg HH, Spencer PS, Ochoa J. The aging human peripheral nervous system. The neurology of aging. In: R Katzman & RD Terry (Eds.), Philadelphia: FA Davis, 1983; 111-222
- Scheibye-Knudsen M, Fang EF, Croteau DL, Wilson 3rd DM, Bohr VA. Protecting the mitochondrial powerhouse. *Trends Cell Biol.*, 2015; 25(3): 158-170
- Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol Psychiatry*, 2010; 15: 1152-1163
- Schmitt JA, Wingen M, Ramaekers JG, Evers EA, Riedel WJ. Serotonin and human cognitive performance. *Curr Pharm Des.*, 2006; 12: 2473-2486
- Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res.*, 2005; 49: 7-30
- Schrijver NCA, Bahr NI, Weiss IC, Würbel H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2002; 73(1): 209-224
- Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J.*, 2001; 358: 547-557
- Segovia G, del Arco A, Garrido P, de Blas M, Mora F. Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Beh Brain Res.*, 2008; 187: 304-311
- Segovia G, del Arco A, Mora F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress and aging of the brain. *J Neural Transm.*, 2009; 116(8): 1007-1016
- Segovia G, Yague AG, Garcia-Verdugo JM, Mora F. Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res Bull.*, 2006; 70: 8-14
- Seidler R, Rachael D, Bernard J, Burutolu T, Taritonye B, Fling B, Lipps D. Motor control and aging: Links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects. *Neurosci Biobehav Rev.*, 2010; 34(5): 721-733
- Selye H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J.*, 1976; 115(1): 53-56
- Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*, 2012; 48(2): 158-167
- Sengupta P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: How old is it in comparison with human age? *Biomed Int.*, 2012; 2: 81-89
- Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med.*, 2013; 4(6): 624-630
- Serrano F, Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev.*, 2004; 3: 431-443
- Serrien DJ, Swinnen SP, Stelmach GE. Age-related deterioration of coordinated interlimb behavior. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.*, 2000; 55(5): P295-303
- Seyedabadi M, Fakhfouri G, Ramezani V, Mehr SE, Rahimian R. The role of serotonin in memory: Interactions with neurotransmitters and downstream signaling. *Exp Brain Res.*, 2014; 232: 723-738
- Shapiro M. Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps. *Arch Neurol.*, 2001; 58(6): 874-881

- Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.*, 2010; 87(17-18): 521-536
- Shen J, Xu L, Qu C, Sun H, Zhang J. Resveratrol prevents cognitive deficits induced by chronic unpredictable mild stress: Sirt1/miR-134 signalling pathway regulates CREB/BDNF expression in hippocampus in vivo and in vitro. *Behav Brain Res.*, 2018; 349: 1-7
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91(23): 10771-10778
- Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review. *Front Mol Neurosci.*, 2015; 8: 77
- Shin J, Yang SJ, Lim Y. Gamma-tocopherol supplementation ameliorated hyper-inflammatory response during the early cutaneous wound healing in alloxan-induced diabetic mice. *Exp Biol Med.* (Maywood), 2017; 242(5): 505-515
- Shipstead Z, Redick TS, Engle RW. Does working memory training generalize? *Psychol Belg.*, 2010; 50: 245-276
- Shokolenko IN, Wilson GL, Alexeyev MF. Aging: a mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update. *World J Exp Med.*, 2014; 4(4): 46-57
- Shukitt-Hale B, Cheng V, Joseph JA. Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutr Neurosci.*, 2009; 12(3): 135-140
- Sibille E. Molecular aging of the brain, neuroplasticity, and vulnerability to depression and other brain-related disorders. *Dialogues Clin Neurosci.*, 2013; 15(1): 53-65
- Sidorova-Darmos E, Wither RG, Shulyakova N, Fisher C, Ratnam M, Aarts M, Lilje L, Monnier PP, Eubanks JH. Differential expression of sirtuin family members in the developing, adult, and aged rat brain. *Front Aging Neurosci.*, 2014; 6: 333
- Sierra-Mercado D, Dieguez D, Barea-Rodriguez EJ. Brief novelty exposure facilitates dentate gyrus LTP in aged rats. *Hippocampus*, 2008; 18(8): 835-843
- Siette J, Westbrook RF, Cotman C, Sidhu K, Zhu W, Sachdev P, Valenzuela MJ. Age-specific effects of voluntary exercise on memory and the older brain. *Biol Psychiatry*, 2013; 73(5): 435-442
- Silva BA, Leal MC, Farías MI, Erhardt B, Galeano P, Pitossi FJ, Ferrari CC. Environmental enrichment improves cognitive symptoms and pathological features in a focal model of cortical damage of multiple sclerosis. *Brain Res.*, 2020; 1727: 146520
- Simi A, Lerouet D, Pinteaux E, Brough D. Mechanisms of regulation for interleukin-1 β in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, 2007; 52(8): 1563-1569
- Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--Behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res.*, 2011; 222(1): 246-264
- Sivandzade F, Prasad S, Bhalerao A, Cucullo L. NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox Biol.*, 2018; 21: 101059
- Skinner HB, Barrack RL, Cook S. Age-related decline in proprioception. *Clin Orthop Relat Res.*, 1984; 184: 208-211
- Smith JV, Burdick AJ, Golik P, Khan I, Wallace D, Luo Y. Anti-apoptotic properties of Ginkgo biloba extract EGb 761 in differentiated PC12 cells. *Cell Mol Biol.*, 2002; 48: 699-707
- Smith MA, Brady LS, Glowa J, Gold PW, Herkenham M. Effects of stress and adrenalectomy on tyrosine hydroxylase mRNA levels in locus coeruleus by in situ hybridization. *Brain Res.*, 1991; 544(1): 26-32

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.*, 1985; 150(1): 76-85

Smith RAJ, Porteous AM, Coulter CV, Murphy MP. Selective targeting of an antioxidant to mitochondria. *Eur J Biochem.*, 1999; 263(3): 709-716

Smoliga JM, Colombo ES, Campen MJ. A healthier approach to clinical trials evaluating resveratrol for primary prevention of age-related diseases in healthy populations. *Aging (Albany NY)*, 2013; 5(7): 495-506

Snow WM, Albeni BC. Neuronal gene targets of NF- κ B and their dysregulation in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci.*, 2016; 9:118

Socci DJ, Crandall BM, Arendash GW. Chronic antioxidant treatment improves the cognitive performance of aged rats. *Brain Res.*, 1995; 693(1-2): 88-94

Sohal R, Arnold L, Orr W. Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev.*, 1990; 56(3): 223-235

Sokol RJ, McKim JM, Goff MC, Ruyle SZ, Devereaux MW, Han D, Packer L, Everson G. Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology*, 1998; 114(1): 164-174

Solinas M, Thiriet N, Rawas RE, Lardeux V, Jaber M. Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. *Neuropsychopharmacology*, 2009; 34(5): 1102-1111

Somani SM, Husain K, Diaz-Phillips L, Lanzotti DJ, Kareti KR, Trammell GL. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. *Alcohol*, 1996; 13(6): 603-610

Somani SM, Ravi R, Rybak LP. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav.*, 1995; 50(4): 635-639

Soreq L, Consortium UKBE, North American Brain Expression C, Rose J, Soreq E, Hardy J, Trabzuni D, Cookson MR, Smith C, Ryten M, Patani R, Ule J. Major shifts in glial regional identity are a transcriptional hallmark of human brain aging. *Cell Rep.*, 2017; 18(2): 557-570

Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med.*, 2011; 32(3), 159-221

Speisman RB, Kumar A, Rani A, Foster TC, Ormerod BK. Daily exercise improves memory, stimulates hippocampal neurogenesis and modulates immune and neuroimmune cytokines in aging rats. *Brain Behav Immun.*, 2013; 28: 25-43

Spencer JPE. Flavonoids: modulators of brain function? *Br J Nutr.*, 2008a; 99E(Suppl 1): ES60-77

Spencer JPE. Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neurocognitive performance. *Proc Nutr Soc.*, 2008b; 67: 238-252

Spencer JPE. The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations. *Chem Soc Rev.*, 2009; 38: 1152-1161

Spencer JPE. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br J Nutr.*, 2010; 104(3): S40-47

Spencer JPE, Vafeiadou K, Williams R, Vauzour D, Spencer J, Vafeiadou K, Vauzour D. Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med.*, 2012; 33(1): 83-97

Spiriduso WW, Francis KL, MacRae PG. Physical dimensions of aging. Champaign, IL: Human Kinetics, 1995

- Steffener J, Barulli D, Habeck C, O'shea D, Razlighi Q, Stern Y. The role of education and verbal abilities in altering the effect of age-related gray matter differences on cognition. *PloS One*, 2014; 9(3): e91196
- Steiner JL, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Davis JM. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *J Appl Physiol.*, 2011; 111(4): 1066-1071
- Stelmach GE, Sirica A. Aging and proprioception. *Age*, 1986; 9: 99-103
- Sterling P, Eyer J. Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In handbook of life stress, cognition and health. In: S Fisher & J Reason (Eds.), New York: John Wiley & Sons, 1988
- Stern Y. Cognitive reserve. *Neuropsychologia*, 2009; 47(10): 2015-2028
- Stern Y. What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *J Int Neuropsychol Soc.*, 2002; 8(3): 448-460
- Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*, 2007; 17(11): 1017-1022
- Stringer TP, Guerrieri D, Vivar C, van Praag H. Plant-derived flavanol (-)epicatechin mitigates anxiety in association with elevated hippocampal monoamine and BDNF levels, but does not influence pattern separation in mice. *Transl Psychiatry.*, 2015; 5(1): e493
- Stryker MP, Harris WA. Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. *J Neurosci.*, 1986; 6: 2117-2133
- Subash S, Braidy N, Essa MM, Zayana AB, Ragini V, Al-Adawi S, Al-Asmi A, Guillemin GJ. Long-term (15 mo) dietary supplementation with pomegranates from Oman attenuates cognitive and behavioral deficits in a transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Nutrition*, 2015; 31(1): 223-229
- Sugiyama I, Tanaka K, Akita M, Yoshida K, Kawase T, Asou H. Ultrastructural analysis of the paranodal junction of myelinated fibers in 31-month-old-rats. *J Neurosci Res.*, 2002; 70(3): 309-317
- Sumien N, Heinrich KR, Sohal RS, Forster MJ. Short-term vitamin E intake fails to improve cognitive or psychomotor performance of aged mice. *Free Radic Biol Med.*, 2004; 36: 1424-1433
- Sunanda, Shankaranarayana Rao BS, Raju TR. Chronic restraint stress impairs acquisition and retention of spatial memory task in rats. *Curr Sci.*, 2000; 79(11): 1581-1584
- Sung S, Yao Y, Uryu K, Yang H, Lee VM, Trojanowski JQ, Praticò D. Early Vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces A β levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB J.*, 2004; 18(2): 323-325
- Sutoo D, Akiyama K. Regulation of brain function by exercise. *Neurobiol Dis.*, 2003; 13(1): 1-14
- Suwa M, Sakuma K. The potential role of sirtuins regarding the effects of exercise on aging-related diseases. *Curr Aging Sci.*, 2013; 6(2): 178-188
- Swoap SJ. The pharmacology and molecular mechanisms underlying temperature regulation and torpor. *Biochem Pharmacol.*, 2008; 76(7): 817-824
- Takahashi E, Niimi K, Itakura C. Enhanced CaMKII activity and spatial cognitive function in SAMP6 mice. *Behav Neurosci.*, 2009; 123(3): 527-532
- Takeuchi H, Taki Y, Kawashima R. Effects of working memory training on cognitive functions and neural systems. *Rev Neurosci.*, 2010; 21: 427-449
- Tamagno E, Parola M, Guglielmotto M, Santoro G, Bardini P, Marra L, Tabaton M, Danni O. Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med.*, 2003; 35(1): 45-58
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent: endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.*, 1993; 1: 57-60

- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Galano A, Reiter RJ. Cyclic-3-hydroxymelatonin (C3HOM), a potent antioxidant, scavenges free radicals and suppresses oxidative reactions. *Curr Med Chem.*, 2014; 21(13): 1557-1565
- Tang BL. Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1-A hypothesis. *Brain Res Bull.*, 2010; 81(4-5): 359-361
- Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*, 2001; 41: 779-790
- Tejada S, Roca C, Sureda A, Rial RV, Gamundí A, Esteban S. Antioxidant response analysis in the brain after pilocarpine treatments. *Brain Res Bull.*, 2006; 69: 587-592
- Tejada S, Sureda A, Roca C, Gamundí A, Esteban S. Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine. *Brain Res Bull.*, 2007; 71: 372-375
- Terry RD. Cell death or synaptic loss in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 2000; 59(12): 1118-1119
- Terry RD, Katzman R. Life span and synapses: will there be a primary senile dementia? *Neurobiol Aging*, 2001; 22: 347-348
- Testa G, Biasi F, Poli G, Chiarpotto E. Calorie restriction and dietary restriction mimetics: a strategy for improving healthy aging and longevity. *Curr Pharm Des.*, 2014; 20(18): 2950-2977
- Thomas SM, Gebicki JM, Dean RT. Radical initiated α -tocopherol depletion and lipid peroxidation in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 1002(2): 189-197
- Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med.*, 1998; 24(9): 1477-1484
- Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, Nasto LA, St Croix CM, Usas A, Vo N, Huard J, Clemens PR, Stolz DB, Guttridge DC, Watkins SC, Garinis GA, Wang Y, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF- κ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest.*, 2012; 122(7): 2601-2612.
- Todorova V, Blokland A. Mitochondria and synaptic plasticity in the mature and aging nervous system. *Curr Neuropharmacol.*, 2017; 15(1):166-173
- Tolppanen AM, Solomon A, Kulmala J, Kareholt I, Ngandu T, Rusanen M, Laatikainen T, Soininen H, Kivipelto M. Leisure-time physical activity from mid- to late life, body mass index, and risk of dementia. *Alzheimers Dement.*, 2015; 11: 434-443
- Touyarot K, Poussard S, Cortes-Torrea C, Cottin P, Micheau J. Effect of chronic inhibition of calpains in the hippocampus on spatial discrimination learning and protein kinase C. *Behav Brain Res.*, 2002; 136(2): 439-448
- Touzani K, Marighetto A, Jaffard R. Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. *Eur J Neurosci.*, 2003; 17(3): 628-640
- Traber MG. Vitamin E. *Adv Nutr.*, 2012; 3: 330-331
- Trejo JL, Llorens-Martín MV, Torres-Alemán I. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci.*, 2008; 37: 402-411
- Tsunemi A, Utsuyama M, Seidler BK, Kobayashi S, Hirokawa K. Age-related decline of brain monoamines in mice is reversed to young level by Japanese herbal medicine. *Neurochem Res.*, 2005; 30: 75-81
- Tucker AM, Stern Y. Cognitive reserve and the aging brain *Geriatric Neurology*. In: K Anil Nair & N Marwan Sabbagh (Eds.), USA: John Wiley & Sons Ltd, 2014; 118-125

- Turner CA, Yang MC, Lewis MH. Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and regional neural metabolic activity. *Brain Res.*, 2002; 938(1-2): 15-21
- Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.*, 1980; 191(2): 421-427
- Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Fujimoto M, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Abe N, Higuchi F, Shibata T, Hasegawa S, Kida S, Nakai A, Watanabe Y. Impaired hippocampal spinogenesis and neurogenesis and altered affective behavior in mice lacking heat shock factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108: 1681-1686
- Ueda S, Sakakibara S, Nakadate K, Noda T, Shinoda M, Joyce JN. Degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra of zitter mutant rat and protection by chronic intake of Vitamin E. *Neurosci Lett.*, 2005; 380: 252-256
- Ulatowski L, Parker R, Warriar G, Sultana R, Butterfield DA, Manor D. Vitamin E is essential for Purkinje neuron integrity. *Neuroscience*, 2014; 260: 120-129
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.*, 2009; 10: 397-409
- Umegaki H, Roth GS, Ingram DK. Aging of the striatum: mechanisms and interventions. *Age (Dordr)*, 2008; 30(4): 251-261
- Unno K, Takabayashi F, Kishido T, Oku N. Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). *Exp Gerontol.*, 2004; 39: 1027-1034
- Unno K, Takabayashi F, Yoshida H, Choba D, Fukutomi R, Kikunaga N, Kishido T, Oku N, Hoshino M. Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice. *Biogerontology*, 2007; 8(2): 89-95
- Vachon P, Millecamps M, Low L, Thompsons SJ, Pailleux F, Beaudry F, Bushnell CM, Stone LS. Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain. *Behav Brain Funct.*, 2013; 9: 22
- Valenzano DR, Cellerino A. Resveratrol and the pharmacology of aging: a new vertebrate model to validate an old molecule. *Cell Cycle*, 2006; 5(10): 1027-1032
- Valenzuela MJ, Sachdev P. Can cognitive exercise prevent the onset of dementia? Systematic review of randomized clinical trials with longitudinal follow-up. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2009; 17(3): 179-187
- Van Praag H. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.*, 2009; 32(5): 283-290
- Van Praag H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Med.*, 2008; 10(2): 128-140
- Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and LTP in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96(23): 13427-13431
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci.*, 2000; 1(3): 191-198
- Van Praag H, Lucero MJ, Yeo GW, Stecker K, Heivand N, Zhao C, Yip E, Afanador M, Schroeter H, Hammerstone J, Gage FH. Plant-derived flavanol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *J Neurosci.*, 2007; 27(22): 5869-5878
- Van Raamsdonk JM, Hekimi S. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.*, 2009; 5(2): e1000361
- Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, Alderson NL, Baynes JW, Epstein CJ, Huang TT, Nelson J, Strong R, Richardson A. Life-long reduction in MnSOD activity results

in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics*, 2003; 16(1): 29-37

Vankov A, Hervé-Minvielle A, Sara SJ. Response to novelty and its rapid habituation in locus coeruleus neurons of the freely exploring rat. *Eur J Neurosci.*, 1995; 7: 1180-1187

Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell.*, 2004; 16(1): 93-105

Vatassery GT, Bauer T, Dysken M. High doses of vitamin E in the treatment of disorders of the central nervous system in the aged. *Am J Clin Nutr.*, 1999; 70: 793-801

Vauzour D, Vafeiadou K, Rice-Evans C, Williams RJ, Spencer JP. Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J Neurochem.*, 2007; 103(4): 1355-1367

Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JPE. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr.*, 2008; 3(3-4): 115-126

Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 2001; 107(2): 149-159

Veena J, Srikumar BN, Mahati K, Bhagya V, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS. Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats. *J Neurosci Res.*, 2009; 87(4): 831-843

Venero C, Tilling T, Hermans-Borgmeyer I, Schmidt R, Schachner M, Sandi C. Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1. *Neuroscience*, 2002; 115(4): 1211-1219

Veyrac A, Sacquet J, Nguyen V, Marien M, Jourdan F, Didier A. Novelty determines the effects of olfactory enrichment on memory and neurogenesis through noradrenergic mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 2009; 34(3): 786-795

Viljoen M, Panzer A. The central noradrenergic system: an overview. *Afr J Psychiatry*, 2007; 10(3): 135-141

Viña J, Borrás C, Miquel J. Theories of ageing. *IUBMB Life*, 2007; 59: 249-254

Vivar C, Potter MC, van Praag H. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci.*, 2013; 15: 189-210

Volkow ND, Gur RC, Wang GJ, Fowler JS, Moberg PJ, Ding YS, Hitzemann R, Smith G, Logan J. Association between decline in brain dopamine activity with age and cognitive and motor impairment in healthy individuals. *Am J Psychiatry*, 1998; 155(3): 344-349

Walker JE. The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q Rev Biophys.*, 1992; 25(3): 253-324

Walther D, Peter J, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 2003; 299(5603): 76

Wang Y, Xu H, Fu Q, Ma R, Xiang J. Protective effect of resveratrol derived from *Polygonum cuspidatum* and its liposomal form on nigral cells in parkinsonian rats. *J Neurol Sci.*, 2011; 304(1-2): 29-34

Wang Y, Xu J, Liu Y, Li Z, Li X. TLR4-NF- κ B signal involved in depressive-like behaviors and cytokine expression of frontal cortex and hippocampus in stressed C57BL/6 and ob/ob mice. *Neural Plast.*, 2018; 2018: 7254016

Warren DA, Castro CA, Rudy JW, Maier SF. No spatial learning impairment following exposure to inescapable shock. *Psychobiology*, 1991; 19(2): 127-134

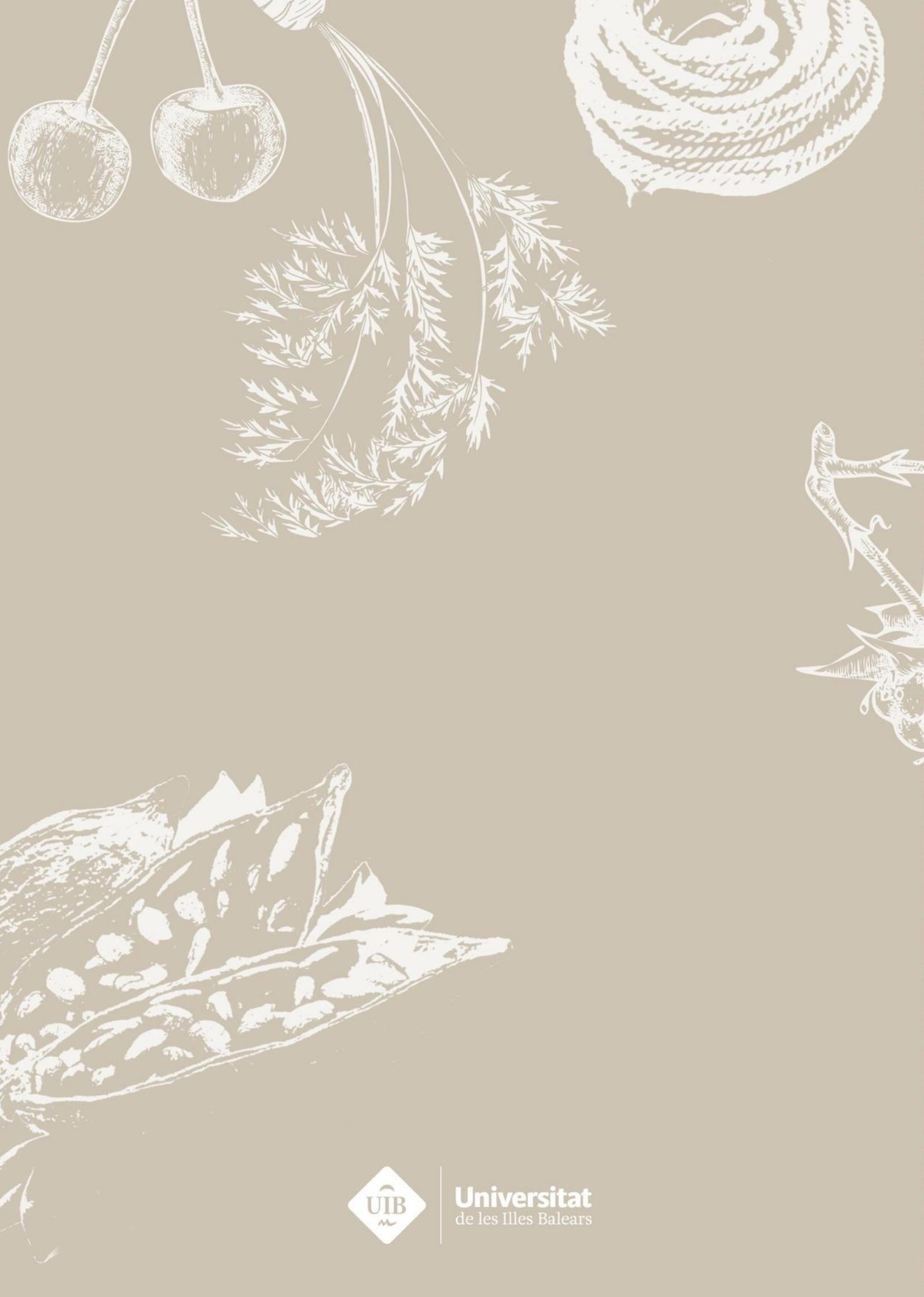
- Watanabe Y, McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. Effects of chronic social stress on tyrosine hydroxylase mRNA and protein levels. *Brain Res Mol Brain Res.*, 1995; 32: 176-180
- Weindruch R. The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates. *Toxicol Pathol.*, 1996; 24(6): 742-745
- Welford AT. Psychomotor performance. Annual review of gerontology and geriatrics. In: C Eisdorfer (Ed.), New York: Springer, 1984; 237-273
- Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr, Sistonen L, Morimoto RI. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science*, 2009; 323: 1063-1066
- White N, McDonald R. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Lear Mem.*, 2002; 77(2): 125-184
- Wiesel TN, Hubel DH. Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol.*, 1963; 26: 1003-1017
- Williams BM, Luo Y, Ward C, Redd K, Gibson R, Kuczaj SA, McCoy JG. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiol Behav.*, 2001; 73(4): 649-658
- Williams C, El Mohsen M, Vauzour D, Rendeiro C, Butler L, Ellis J, Spencer J. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB 226 phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radic Biol Med.*, 2008; 45(3): 295-305
- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.*, 2004; 36: 838-849
- Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress*, 2017; 6: 78-93
- Wilson I, Gallagher M, Eichenbaum H, Tanila H. Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding. *Trends Neurosci.*, 2006; 29(12): 662-670
- Witte AV, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Flöel A. Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009; 106(4): 1255-1260
- Witte AV, Kerti L, Margulies DS, Flöel A. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J Neurosci.*, 2014; 34(23): 7862-7870
- Wollen KA. Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Altern Med Rev.*, 2010; 15(3): 223-244
- Wonodi I, Schwarcz R. Cortical kynurenine pathway metabolism: A novel target for cognitive enhancement in schizophrenia. *Schizophr Bull.*, 2010; 36(2): 211-218
- Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 2004; 430(7000): 686-689
- World Health Organization. Active ageing: a policy framework. World Health Organization, Madrid, 2002
- World Health Organization. Dementia: a public health priority. World Health Organization - Alzheimer's Disease International, UK, 2012
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Neuroscience*, 2008; 155(3): 751-759

- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Exercise facilitates the action of dietary DHA on functional recovery after brain trauma. *Neuroscience*, 2013; 248: 655-663
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Oxidative stress modulates Sir2alpha in rat hippocampus and cerebral cortex. *European J Neurosci.*, 2006; 23(10): 2573-2580
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Vitamin E protects against oxidative damage and learning disability after mild traumatic brain injury in rats. *Neurorehabil Neural Repair*, 2010; 24(3): 290-298
- Wu L, Zhang QL, Zhang XY, Lv C, Li J, Yuan Y, Yin FX. Pharmacokinetics and blood-brain barrier penetration of (+)-catechin and (-)-epicatechin in rats by microdialysis sampling coupled to high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *J Agric Food Chem.*, 2012; 60(37): 9377-9383
- Xu CX, Liu HT, Wang J. Changes of 5-hydroxytryptamine and tryptophan hydroxylase expression in the ventral horn of spinal cord. *Neurosci Bull.*, 2008; 24: 29-32
- Xu Q, Langley M, Kanthasamy AG, Reddy MB. Epigallocatechin gallate has a neurorescue effect in a mouse model of Parkinson disease. *J Nutr.*, 2017; 147(10): 1926-1931
- Xu Y, Wang Z, You W, Zhang X, Li S, Barish P, Ogle W. Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of serotonin and noradrenaline system. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 2010; 20(6): 405-413
- Xu XM, Ning YC, Wang WJ, Liu JQ, Bai XY, Sun XF, Cai GY, Chen XM. Anti-inflamm-aging effects of long-term caloric restriction via overexpression of SIGIRR to inhibit NF- κ B signaling pathway. *Cell Physiol Biochem.*, 2015; 37(4): 1257-1270
- Yamada K, Tanaka T, Han D, Senzaki K, Kameyama T, Nabeshima T. Protective effects of idebenone and α -tocopherol on β -amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in β -amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci.*, 1999; 11: 83-90
- Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105(36): 13421-13426
- Yamamoto H, Schoonjans, K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol.*, 2007; 21(8): 1745-1755
- Yang T, Wang L, Zhu M, Zhang L, Yan L. Properties and molecular mechanisms of resveratrol: a review. *Pharmazie*, 2015a; 70(8): 501-506
- Yang Y, Jiang S, Dong Y, Fan C, Zhao L, Yang X, Li J, Di S, Yue L, Liang G, Reiter RJ, Qu Y. Melatonin prevents cell death and mitochondrial dysfunction via a SIRT1-dependent mechanism during ischemic-stroke in mice. *J Pineal Res.*, 2015b; 58(1): 61-70
- Yankner B, Lu T, Loerch P. The aging brain. *Annu Rev Pathol.*, 2008; 3: 41-66
- Yáñez M, Fraiz N, Cano E, Orallo E. Inhibitory effects of cis- and transresveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2006; 344: 688-695
- Ye Q, Ye L, Xu X, Huang B, Zhang X, Zhu Y, Chen X. Epigallocatechin-3-gallate suppresses 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress in PC12 cells via the SIRT1/PGC-1 α signaling pathway. *BMC Complement Altern Med.*, 2012; 12: 82
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.*, 2004; 23(12): 2369-2380
- Yokota T, Igarashi K, Uchihara T, Jishage K, Tomita H, Inaba A, Li Y, Arita M, Suzuki H, Mizusawa H, Arai H. Delayed-onset ataxia in mice lacking alpha-tocopherol transfer protein: Model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 15185-15190

- Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Prottogente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem.*, 2003; 85: 180-192
- Yu L, Sun Y, Cheng L, Jin Z, Yang Y, Zhai M, Pei H, Wang X, Zhang H, Meng Q, Zhang Y, Yu S, Duan W. Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of SIRT1. *J Pineal Res.*, 2014; 57(2): 228-238
- Yurek DM, Hipkens SB, Hebert MA, Gash DM, Gerhardt GA. Aged related decline in striatal dopamine release and motoric function in Brown Norway/Fisher 344 hybrid rats. *Brain Res.*, 1998; 791: 246-256
- Zacks RT, Hasher L, Li KZH. Human memory. The handbook of aging and cognition. In: FIM Craik & TA Salthouse (Eds.), Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 2000; 293-358
- Zagaar M, Alhaider I, Dao A, Levine A, Alkarawi A, Alzubaidy M, Alkadhi K. The beneficial effects of regular exercise on cognition in REM sleep deprivation: Behavioral, electrophysiological and molecular evidence. *Neurobiol Dis.*, 2012; 45: 1153-1162
- Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, Cai D. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature*, 2013; 497(7448): 211-216
- Zhang L, Jie G, Zhang J, Zhao B. Significant longevity extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Free Radic Biol Med.*, 2009b; 46(3): 414-421
- Zhang N, Li Z, Mu W, Li L, Liang Y, Lu M, Wang Z, Qiu Y, Wang Z. Calorie restriction-induced SIRT6 activation delays aging by suppressing NF- κ B signaling. *Cell Cycle*, 2016; 15(7): 1009-1018
- Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF-kappaB: a blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell*, 2017; 168(1-2): 37-57
- Zhang Y, Ikeno Y, Qi W, Chaudhuri A, Li Y, Bokov A, Thorpe SR, Baynes JW, Epstein C, Richardson A, Van Remmen H. Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 2009a; 64(12): 1212-1220
- Zhang Y, Xu D, Qi H, Yuan Y, Liu H, Yao S, Yuan S, Zhang J. Enriched environment promotes post-stroke neurogenesis through NF- κ B-mediated secretion of IL-17A from astrocytes. *Brain Res.*, 2018; 1687: 20-31
- Zhao YN, Li WF, Li F, Zhang Z, Dai YD, Xu AL, Qi C, Gao JM, Gao J. Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2013; 435(4): 597-602
- Zhou J, Keenan MJ, Fernandez-Kim SO, Pistell PJ, Ingram DK, Li B, Raggio AM, Shen L, Zhang H, McCutcheon KL, Tulley RT, Blackman MR, Keller JN, Martin RJ. Dietary resistant starch improves selected brain and behavioral functions in adult and aged rodents. *Mol Nutr Food Res.*, 2013; 57(11): 2071-2074
- Zhu LJ, Ni HY, Chen R, Chang L, Shi HJ, Qiu D, Zhang Z, Wu DL, Jiang ZC, Xin HL, Zhou QG, Zhu DY. Hippocampal nuclear factor kappa B accounts for stress-induced anxiety behaviors via enhancing neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS-Dexas1 coupling. *J Neurochem.*, 2018; 146(5): 598-612
- Zhu QY, Zhang AQ, Tsang D, Huang Y, Chen ZY. Stability of green tea catechins. *J Agric Food Chem.*, 1997; 45: 4624-4628
- Zhu S, Dong Y, Tu J, Zhou Y, Zhou X, Xu B. *Silybum marianum* oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose. *Pharmacogn Mag.*, 2014; 10(Suppl 1): S92-99

Zhu SW, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res.*, 2006; 169: 10-20

Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Würbel H. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav Brain Res.*, 2001; 121: 11-20



Universitat
de les Illes Balears