



Facultat de Ciències

**Universitat de les
Illes Balears**

Memòria del Treball de Fi de Grau

Enriquiment ambiental i prevenció de l'envelliment cerebral. Respostes del sexe masculí i femení

Grau de Biologia

Marc Miralles Pizà

Grau de Biologia

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 43199599X

Treball tutelat per Susana Esteban Valdés
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Enriquiment ambiental, envelliment cerebral, memòria espacial, memòria no espacial, coordinació motora, Radial maze, Rota Rod, Reconeixement d'objectes, Test de Barnes

Índex

Resum/Abstract.....	Pag. 2
Introducció	Pag. 3
Procés d'envelliment.....	Pag. 3
Teories de l'envelliment.....	Pag. 3
Plasticitat neuronal i enriquiment ambiental.....	Pag. 4
Objectius	Pag. 4
Metodologia	Pag. 5
Animals d'experimentació	Pag. 5
Radial Maze	Pag. 6
Reconeixement d'objectes	Pag. 7
Rota Rod	Pag. 8
Test de Barnes	Pag. 8
Anàlisis estadístic.....	Pag. 9
Resultats.....	Pag. 10
Radial Maze	Pag. 10
Reconeixement d'objectes	Pag. 12
Rota Rod	Pag. 14
Test de Barnes	Pag. 15
Discussió	Pag. 17
Radial Maze	Pag. 17
Reconeixement d'objectes	Pag. 18
Rota Rod	Pag. 19
Test de Barnes	Pag. 19
Conclusions.....	Pag. 20
Agraïments	Pag. 20
Bibliografia	Pag. 21

Resum

L'envelliment és un procés multifactorial de deteriorament de les estructures i funcions corporals. Una de les teories més acceptades sobre l'envelliment és la teoria de l'estrés oxidatiu. Segons aquesta teoria els radicals lliures d'oxigen produïts com a conseqüència del metabolisme oxidatiu, ataquen les proteïnes, lípids i el propi material genètic causant l'envelliment. A nivell cerebral, aquest procés afecta la plasticitat neuronal, sobretot a les regions cerebrals encarregades d'habilitats cognitives com l'aprenentatge i la memòria. L'enriquiment ambiental (EA) incrementa l'estimulació somatosensorial atenuant la pèrdua de plasticitat neuronal produïda durant l'envelliment. Per comprovar l'eficàcia de l'EA es realitzaren proves de memòria espacial (*Radial Maze* i test de *Barnes*), memòria episòdica (test de Reconeixement d'objectes) i coordinació motora (*Rota Rod*) a rates control i a rates sota condicions d'EA. Així mateix, s'observà si hi havia diferències entre mascles i femelles. L'EA, en rates des de 1 fins a 20 mesos, millorà els resultats dels tests de memòria espacial i memòria episòdica respecte dels seus controls, però no els de coordinació motora. Aquests resultats demostren l'eficàcia de l'EA front a la pèrdua de la plasticitat neuronal associada a l'envelliment. Per altre banda, també es pot observar que les rates mascle mostren una millor memòria espacial i una menor coordinació motora, en comparació a les rates femella. La memòria episòdica mostra un deteriorament similar per a mascles i femelles, però tarda més a apareixer a les femelles.

Abstract

Aging is a multifactorial process of impairment of the body structures and functions. One of the most accepted theories about the ageing process is the oxidative stress theory. According to this theory, free oxygen radicals produced as a consequence of oxidative metabolism, attack proteins, lipids and genetic material causing the ageing process. In the brain, this process affects to neuronal plasticity, especially to areas in charge of cognitive skills such as learning and memory. Environmental enrichment (EE) increases somatosensory stimulation, decreasing the neuronal plasticity loss produced during ageing. To prove the EE effectiveness, spatial memory tests (*Radial Maze* and *Barnes test*), episodic memory tests (Object Recognition test) and motor coordination tests (*Rota Rod*) were assessed to control rats and rats under EE conditions. Furthermore, it was observed if there were any differences between male and female rats. EE, on rats between 1 and 20 months old, improved spatial memory and episodic memory tests results, but not motor coordination results. These results show the EE effectiveness against neuronal plasticity loss associated with ageing. On the other hand, it could be observed that male rats showed an improved spatial memory, but a worse motor coordination comparing to female rats. Episodic memory shows a similar impairment, but it appears later on female rats.

Introducció

Procés d'envelliment

L'envelliment és un procés multifactorial de deteriorament de les estructures i funcions corporals. Llavors, en certa manera, l'envelliment implica una pèrdua de l'homeostàsia. Un exemple d'aquesta pèrdua d'homeostàsia és la susceptibilitat de la gent major a canvis de temperatura o a infeccions (Viña et al. 2007). Els processos de deteriorament associats a l'envelliment, pareixen estar molt relacionats amb els diferents estils de vida que es puguin dur a terme i a les condicions ambientals.

La funció cerebral també es veu afectada durant l'envelliment, ja que a mesura que s'avança en edat, l'incidència de malalties neurodegeneratives augmenta considerablement (Viña et al. 2007; Duthey 2013). Així com s'avança en edat, es sol produir una disminució de la capacitat d'aprenentatge i la memòria. L'envelliment, es troba associat amb una disminució de certes funcions cerebrals, com puguin ser funcions sensorials, motores, i una pèrdua de memòria progressiva que produeix una limitació de la funcionalitat (Papandreu et al. 2011). A més, el deteriorament associat a l'envelliment es poden entendre com processos subtils, que en major grau són responsables de malalties com la demència d'Alzheimer o el Parkinson (Burke et al. 2006; Terry et al. 2001).

Teories de l'envelliment

Una de les teories més acceptades i esteses sobre l'envelliment, és la Teoria dels Radicals Lliures postulada per Harman a l'any 1956. Segons aquesta teoria, el metabolisme oxidatiu de la mitocondria produeix espècies reactives d'oxigen o ROS ("Reactive Oxygen Species"), entre altres, els radicals lliures d'oxigen (Harman 1956). S'ha vist que el metabolisme cel·lular produeix ROS tals com H_2O_2 o $\cdot OH$ (que són substàncies extremament oxidants) (Szatrowski et al. 1991). Aproximadament, un 2% de l'oxigen utilitzat a la cadena respiratòria forma ROS (Viña et al. 2007).

Aquestes ROS provoquen danys al DNA. Hi ha mecanismes que reparen aquests danys, però a la llarga, s'acaben acumulant i contribueix als processos d'envelliment. (Fraga et al. 1990). A mesura que s'avança en edat, també augmenta la producció de ROS (Sohal et al. 1990). Així mateix, també augmenten els danys al genoma mitocondri (Castro et al. 2012). Les proteïnes i lípids també sofreixen oxidació per part dels ROS (directament o indirectament) (Ashok et al. 1999; Mariani et al. 2005) la qual cosa provoca alteracions a l'estructura d'algunes proteïnes, a la seva funció enzimàtica, a cascades de senyalització intracel·lular o a la mateixa neurotransmissió (Ashok et al. 1999; Butterfield et al. 2006).

En general, l'acumulació de tots aquests processos, tant a nivell cel·lular com tissular, provoca l'envelliment a nivell sistèmic.

Plasticitat neuronal i enriquiment ambiental

Un dels canvis produïts per els processos associats a l'envelliment és la pèrdua de plasticitat neuronal (Mora et al. 2007). Ramon y Cajal fou l'investigador que popularitzà més el terme "plasticitat neuronal", tot i que no fou ell qui l'inventà (DeFelipe 2006). El terme "plasticitat neuronal" fa referència a la variabilitat i plasticitat de les neurones, i la seva capacitat per modelar les connexions entre elles (Burke et al. 2006).

Característiques que es veuen modificades durant l'envelliment i redueixen la plasticitat neuronal són: la morfologia cerebral, les interaccions a nivell neuronal i la transcripció genètica (Burke et al. 2006). El procés d'envelliment, comporta una pèrdua neuronal important al córtex cerebral (Mora et al. 2007). Les zones més afectades pel deteriorament associat a l'envelliment són l'hipocamp, el córtex temporal superior i el córtex prefrontal, zones del cervell relacionades amb l'aprenentatge, la memòria espacial a curt termini, i altres habilitats cognitives (Mora et al. 2007; Burke et al. 2006). Per tant, no és estrany pensar que a mesura que s'avança en edat, disminueixen aquestes habilitats cognitives.

Un dels mètodes per evitar o atenuar els processos de deteriorament associats a l'envelliment, sobretot a nivell cerebral, és l'enriquiment ambiental (EA). La definició d'EA és "una combinació d'estímuls inanimats i socials" (Praag et al. 2000). L'EA consisteix en unes condicions de manteniment dels individus d'experimentació, en les quals s'els dona una major estimulació somatosensorial. Això generalment s'aconsegueix amb un ambient canviant, amb joguines i objectes similars a les gàbies, i a vegades amb una major interacció social amb altres individus (Nithianantharajah et al. 2006).

S'ha demostrat en diverses ocasions que l'enriquiment ambiental pot millorar diverses habilitats cognitives. Millora la memòria espacial en comparació amb rates control, amb proves com el *Morris water-maze* o laberint aquàtic de Morris (Harati et al. 2013) o la prova de Reconeixement d'objectes (Mesa-Gresa et al. 2013; Leger et al. 2014). També es mostrà una millora en altres aspectes, com la seva capacitat exploratòria (Lima et al. 2014), fet que resulta coherent amb la millora a la prova de Reconeixement d'objectes.

Objectius

Aquest estudi té dos objectius:

1. El principal objectiu és comprovar i demostrar l'eficàcia de l'EA com a estratègia per atenuar els processos de degeneració cognitiva que es produeixen durant l'envelliment.
2. L'altre objectiu, és determinar si hi ha diferències entre els dos gèneres durant el procés d'envelliment cerebral, i si l'EA actua de forma diferent o per igual a ambdós gèneres.

Metodologia

Animals d'experimentació

Els animals utilitzats foren rates Wistar d'edats compreses entre 1 i 20 mesos d'edat. S'utilitzà un total de 63 rates (36 mascles i 27 femelles). Aquestes rates es dividiren en diversos grups: rates control, rates d'enriquiment ambiental (EA) i rates de cria (femelles).

Es mantingueren dins gàbies individuals, a l'estabulari de la UIB, amb serradís al terra per millorar les condicions higièniques. Les gàbies es canviaven per gàbies noves amb nou serradís un pic per setmana. Es mantenien amb una temperatura constant (20°C-22°C) i amb cicles de llum/foscior també constants, de 12h cada un. Les rates tenien lliure accés a aigua i menjar de dieta estàndard (Panlab A04).

Les proves comportamentals es dugueren a terme els matins, entre les 9h i les 13h. Es realitzaren les proves a 1, 2, 3, 6, 17 i 20 mesos d'edat a les rates control per les proves comportamentals *Radial Maze*, *Rota Rod* i test de Reconeixement d'objectes. Les rates d'EA foren sotmeses a les proves comportamentals als 3 i 20 mesos d'edat.

Les rates control també foren sotmeses al test de *Barnes* a 1, 2, 3, 6, 17 i 20 mesos d'edat. No obstant, rates d'EA només foren sotmeses al test de *Barnes* als 20 mesos d'edat en el cas dels mascles. Les rates femelles que foren sotmeses al test de *Barnes* no es mantingueren en condicions d'EA, però si havien estat utilitzades com a rates de cria, fet que provoca una major estimulació sensorial.

Enriquiment ambiental

L'enriquiment ambiental consistí en una estimulació sensorial de les rates proporcionant joguines de plàstic, boles de paper i troços de cartró a les gàbies de les rates (Fig. 1). L'EA es posava en marxa des de el primer més d'edat.



Fig. 1. Fotografies proporcionades per el Laboratori de Fisiologia Animal. Imatge de les gàbies amb peces de cartró (esquerra) i amb joguines de fusta i plàstic (dreta).

Radial maze

El *Radial Maze* o laberint radial és una prova que permet analitzar la memòria espacial i l'activitat motora. Consisteix en un laberint de vuit braços (70 x 11 cm) units per una plataforma octogonal central de 28 cm de diàmetre (Fig. 2). Al final de cada braç hi ha una petita quantitat de menjar. Els animals s'han de mantenir en dejuni un o dos dies (segons l'edat de l'animal) abans de la prova, de manera que el menjar funcioni com a incentiu per visitar tots els braços.

Durant la prova els paràmetres analitzats són el temps i els braços als quals ha entrat i als que no. Els errors es divideixen en errors per “no entrada” i per “reentrada”. Els errors per “no entrada” són els errors que comet la rata per cada braç al qual la rata no hi ha entrat durant tota la prova. Els errors per “reentrada” són els errors que comet la rata, quan torna a entrar a un braç al qual ja hi havia entrat anteriorment. Si la rata entra completament dins un braç al qual ja havia entrat es considera un error sencer per “reentrada”. Si per altre banda, no hi entra totalment i només hi fica la meitat del cos, es considera mig error.

El temps de la prova és d'un màxim de 20 minuts. No obstant, si la rata entra als vuit braços abans d'aquest temps, la prova es considera acabada. Si passats els vint minuts, la rata encara no ha entrat a tots els braços, la prova finalitza i es compten els diversos errors.

Durant la prova, també es mira l'activitat motora de l'animal amb el programa informàtic Smart 2.5, que connectat a una càmera instal·lada damunt el *Radial Maze*, enregistra els seus moviments en vídeo, permetent analitzar la seva activitat (espai recorregut durant la prova).

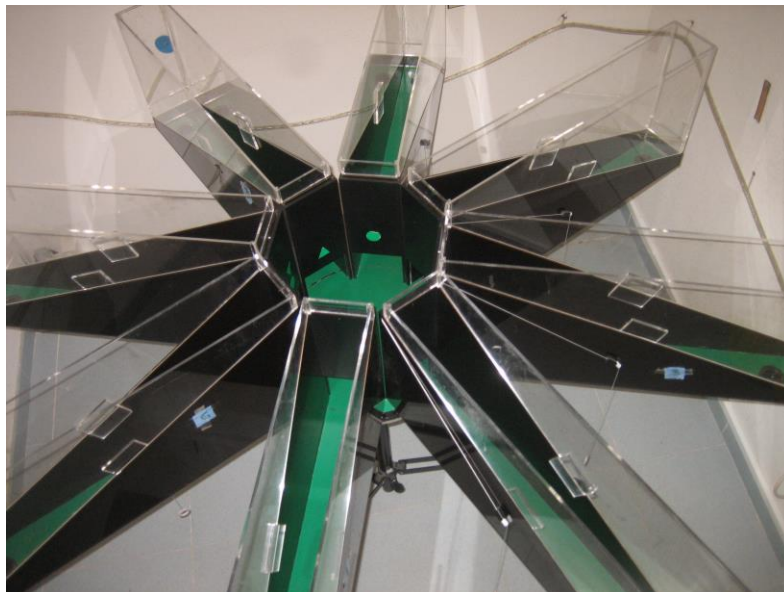


Fig. 2. *Radial maze*

Reconeixement d'objectes

La prova del reconeixement d'objectes permet mesurar la memòria a curt termini no espacial, així com la capacitat exploratòria de l'individu estudiat (Fig. 3). Aquesta prova consta de dues fases, una primera fase de familiarització i una fase de test.

La prova es realitza al dispositiu de camp obert, una superfície de fusta amb una làmina de metacrilat circular de 78cm de diàmetre, amb parets verticals de fusta de 60cm d'altura. Aquesta superfície té zones delimitades, amb un petit cercle central i dos anells amb vuit separacions amb disposició radial.



Fig 4. Aparell de Rota rod

Els dies anteriors a la prova, es deixa a la rata explorar la superfície de camp obert lliurement. Durant la prova de familiarització, es col·loquen dos objectes iguals dins l'àrea, a 23 cm del centre, i es deixa a la rata explorar lliurement durant 10 minuts. Durant els 10 min es calcula el temps que la rata passa explorant cada un dels objectes, fins a un màxim de 30 segons d'exploració a on es considera acabada la prova.

Durant el test, es canvia un dels objectes per un objecte diferent i es calcula novament, quan de temps passa amb el nou objecte en comparació amb el conegut. La prova també té un màxim de 10 min, i passats 30 segons d'exploració s'acaba la prova.

Entre la familiarització i el test ha de passar un temps de 15 minuts. Cada pic que s'utilitza un nou individu s'ha de rentar la zona i els objectes amb etanol, per evitar l'olor d'altres rates.



Fig. 3. Fotografies del test de reconeixement d'objectes. A la imatge de l'esquerra es pot observar la fase de familiarització en la que els dos objectes són dos cubs verds iguals. Per altre banda, a la imatge de la dreta es pot veure la fase de test, a on s'ha canviat un dels dos cubs verds per una bitlla rosa.

Rota-Rod

El *Rota Rod* (Fig. 4) és un aparell que permet mesurar la coordinació motora de les rates. Consisteix en un cilindre de goma amb capacitat rotatòria. Pot rotar a velocitat constant (4 cm/min) o a velocitat creixent (fins arribar a 40 cm/min passats 60 segons).

Durant cada prova, la rata s'ha de col·locar damunt aquest cilindre (mentre es troba a velocitat constant) i un pic ja s'hi troba estable, activar l'acceleració del cilindre. Des de el moment en que s'activa la velocitat creixent, es posa en marxa un cronometre. A la base de l'aparell, hi ha una plataforma pivotant amb un sensor de moviment. Quan la rata cau damunt la plataforma, el cronometre i el velocímetre s'aturen automàticament.

Els dies anteriors a la prova, s'habitua a les rates a la velocitat constant del Rota-Rod. El dia de la prova, cada rata realitzà la prova 5 vegades i es calculà el temps de permanència damunt l'aparell.

Test de Barnes

El test de Barnes és una prova que permet mesurar la memòria espacial a llarg termini, i l'aprenentatge. Es tracta d'una taula de fusta circular amb 18 orificis. Un d'aquests orificis, anomenat *target*, dona lloc a un caixó, el qual no té altre sortida (Fig. 5). El Test de Barnes es divideix en diverses fases. Consta de tres fases d'entrenament i una fase de test. Cada un dels entrenaments i el test es duen a terme amb una distància temporal de 10 minuts. Els entrenaments tenen una durada màxima de 180 segons. Si passat aquest temps, la rata no ha arribat a entrar dins el *target*, s'hi fica i s'hi deixa 2 minuts. El test té una durada màxima de 90 segons.

El dia anterior les rates han de passar el que s'anomena un procés de familiarització, al qual s'ha de deixar a la rata a damunt la taula durant un màxim de 3 minuts, i dins del caixó durant 2 minuts. Durant aquest temps, s'ha de deixar que la rata explori la taula i s'en familiaritzi.

A l'inici de la prova, s'exposa la rata a un estímul lluminós provocat per un focus que apunta a la taula. El caixó, per tant, ofereix un refugi degut a que es troba a les fosques (les rates són animals nocturns, i per tant, fotofòbics). A les parets de l'habitació hi ha diversos elements, com formes de cartolina de colors, que ajuden a l'orientació espacial.

Els paràmetres que es mesuren, tant durant l'entrenament com durant el test, són la latència primària i secundària, el nombre d'errors i l'estratègia seguida per arribar a l'orifici. La latència primària es defineix com el temps que tarda l'individu a arribar al *target*. La latència secundària és el temps que tarda a entrar dins el *target*, en cas que l'individu no hi hagi entrat en primera instància. Es considera que la rata ha comès un error per cada orifici que ha visitat abans d'arribar al *target*.

L'estratègia seguida es susceptible de variar entre individus, o entre els diversos entrenaments i el test d'un mateix individu. Una de les estratègies que es pot seguir és

l'estratègia directe, que es considera directe quan l'animal es dirigeix des de el primer moment cap a *target* o a un dels dos orificis contigus, sense passar abans per cap altre orifici. Una altre estratègia és la seriada, que consisteix en que la rata mira diversos orificis consecutius fins trobar el *target*. L'individu també pot seguir una estratègia anomenada aleatoria o mixta, que com bé indica el seu nom, no segueix un patró definit.

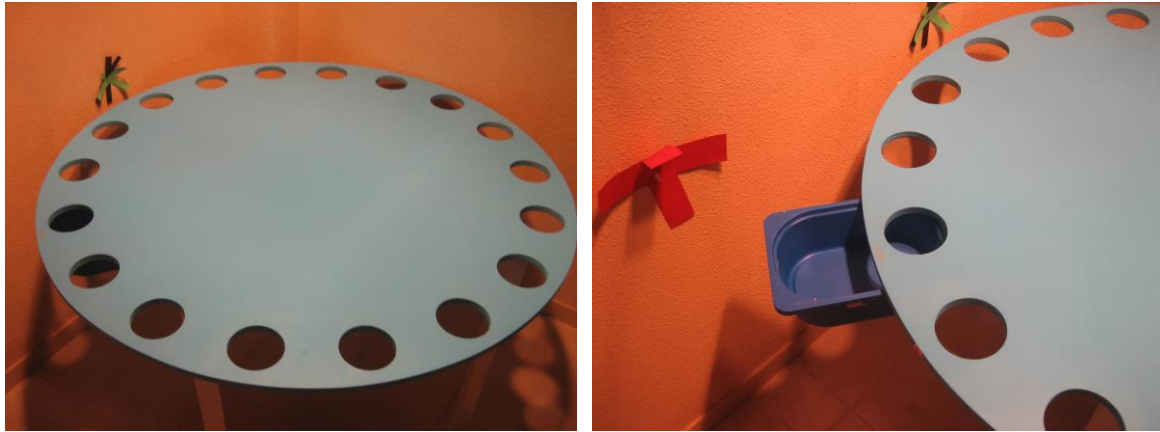


Fig. 5 Taula per realitzar el test de Barnes. A la imatge (dreta) es pot veure el caixó al qual s'hi accedeix des de el *target*.

Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic dels resultats fou realitzat amb l'ajuda de l'aplicació informàtica *GraphPad Prism 6.0*. Es realitzaren tests One-Way ANOVA per a cada grup de rates (separat segons tractament i gènere) per comprovar que hi havia diferències a mesura que s'avança en edat. A més també es realitzaren comparacions individuals entre les diferents edats amb tests de Bonferroni.

Així mateix, també es realitzaren tests estadístics Two-Way ANOVA de diferents grups agrupats per gènere i/o tractament. És a dir, es compararen mascles i femelles del grup control, tenguent en compte el gènere i l'edat. Així com rates control i rates en EA, tant a mascles com a femelles. Dins cada un d'aquests tests, es realitzaren comparacions múltiples entre les rates de diferents edats, entre diferents gèneres o tractaments, mitjançant test de Bonferroni.

Resultats

Es realitzaren les prova del *Radial Maze*, del *Rota Rod* i la prova del Reconeixement d'objectes a 12 individus mascles a 1, 2, 3, 6, 17 i 20 mesos d'edat control. També es realitzà la prova a 9 individus femella a 1, 2, 3 i 4 mesos, a 5 individus a 6 mesos d'edat, i a 6 individus a 17 i 20 mesos d'edat control.

També es realitzaren les proves a 12 individus mascle d'EA, a 3 i 20 mesos d'edat, i a 6 individus femella a 3 mesos d'edat, i 3 individus femella a 20 mesos d'edat.

Radial Maze

El *Radial Maze* és un dels tests realitzat als animals d'experimentació per veure la seva memòria espacial, i com aquesta és modulada a mesura que s'avança en edat. Els resultats es troben representats a les Fig. 6.

En general, hi ha una progressió a augmentar la latència total a mesura que s'avança en edat, tant a mascles com a femelles. Durant els primers mesos, de 1 a 6 mesos d'edat, es pot veure que no hi ha diferències estadísticament significatives entre mascles i femelles, o entre individus control o situació d'EA. No obstant, a una edat més avançada, a 17 i 20 mesos, l'augment si que mostra diferències estadísticament significatives. Aquest augment demostra que durant l'envelliment es produeix un declivi de les habilitats cognitives i la memòria, en aquest cas, espacial.

L'anàlisi de Two-way ANOVA que compara mascles i femelles en relació a la seva edat mostrà una latència menor per les femelles que per els mascles de forma estadísticament significativa ($F(1,101) = 16.24$; $P < 0.0001$). No obstant, això, no es veuen diferències estadísticament significatives amb el posterior test de Bonferroni, comparant els mesos, un a un, per a mascles i femelles (Fig. 6)

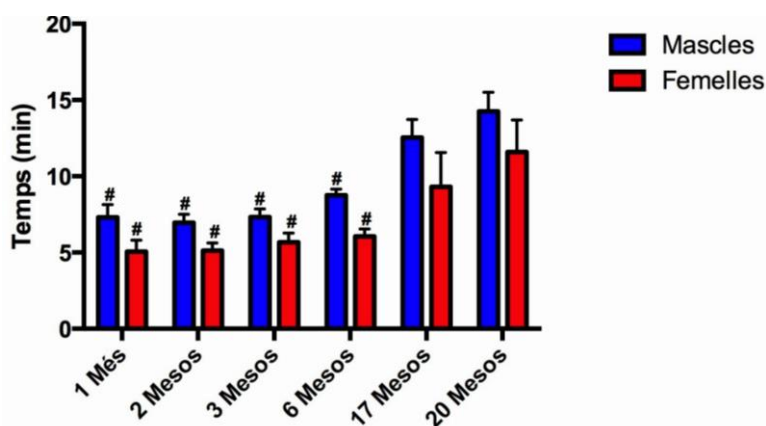


Fig. 6 Latència total del test *Radial Maze* de rates del grup control, mascles i femelles, d'entre 1 i 20 mesos d'edat. ANOVA seguit de Bonferroni, # $p < 0.05$ respecte a 20 mesos d'edat.

També es poden observar diferències entre rates control i rates d'EA. En el cas dels mascles, les rates control, de 3 a 20 mesos, augmenten la seva latència casi 95% (de 7.31min a 14.25 min), mentre que les rates d'EA només augmenten un 64% la seva latència (de 5.36 min a 8.83 min). Per altre banda, les rates femella, de 3 a 20 mesos, augmenten fins a un 104% la seva latència primària (de 5.68 min a 11.59 min) en situació control. I en canvi les rates en EA fins i tot la redueixen un 4% (de 4.632 min a 4.463 min).

Aquesta diferència entre la latència total de les rates control i rates sota EA es pot veure tant a mascles ($F(1,44) = 17.01$; $P = 0.0002$) com a femelles ($F(1,32) = 14.04$; $P = 0.0007$). A més, els posteriors test de Bonferroni per les diferents edats mostren diferències significatives als 20 mesos d'edat, entre rates control i rates en EA, tant a mascles com a femelles (Fig. 7).

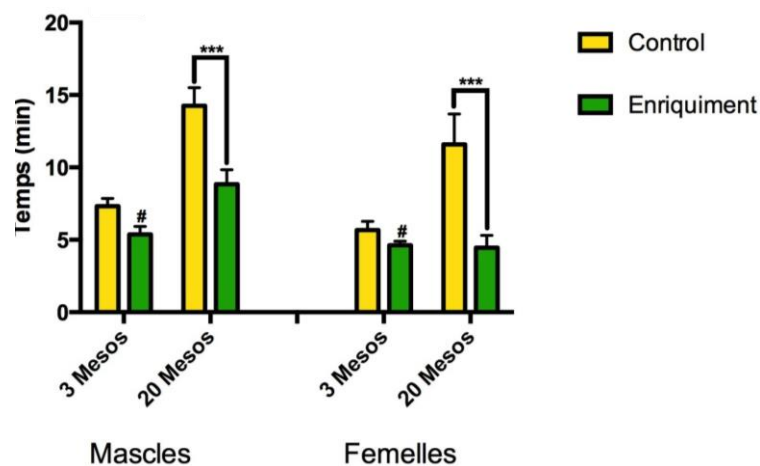


Fig. 7. Latència total del test *Radial Maze* dels grups control i EA, mascles i femelles, de 3 i 20 mesos d'edat. ANOVA seguit de Bonferroni, # $p < 0.05$ respecte a 20 mesos d'edat, *** $p < 0.001$ respecte del control.

També s'han analitzat el nombre d'errors totals comesos per les rates durant la prova (Fig. 8 i 9). Els errors comesos pels mascles es mantenen més o menys constants durant la seva vida, amb mitjanes d'errors d'entre 8.4 i 9.6 (augment del 14%). Per altre banda, les femelles, mantenen el nombre d'errors més o menys constants fins als 6 mesos (entre 5.8 i 6.2, un 7% d'augment), però als 17 i 20 mesos, el nombre d'errors augmenta considerablement, fins a 12.1 i 12.5 respectivament (115% d'augment als 20 mesos). Les diferències es veuen reflexades a un anàlisi estadístic per Two-way ANOVA en l'edat ($F(5,101) = 5.03$; $P = 0.0004$), però no en el gènere dels diferents animals (Fig. 8).

També es poden observar diferències entre les rates d'EA i les rates control. Les rates mascles control augmenten el nombre d'errors un 16% des dels 3 als 20 mesos.

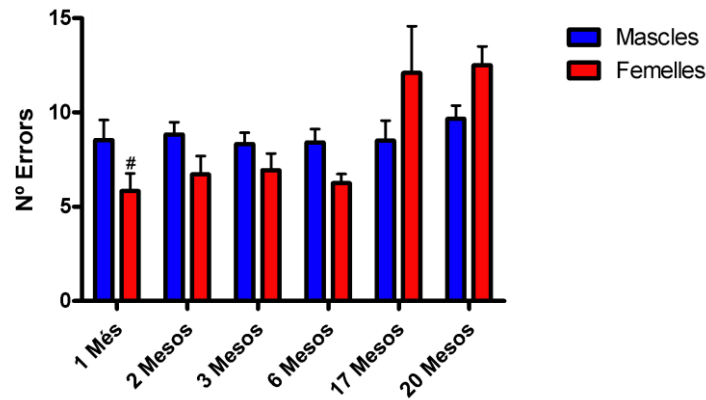


Fig. 8. Errors totals del test *Radial Maze* de rates del grup control, mascles i femelles, d'entre 1 i 20 mesos d'edat. # = diferències significatives comparat amb 20 mesos d'edat

Pels animals en EA el nombre d'errors és inferior que pels control (un 40% menor que els errors de les rates control) i es manté pràcticament constant dels 3 als 20 mesos. En el cas de les femelles, les rates control també augmenten els errors, amb un augment del 80% des de els 3 als 20 mesos. Les femelles d'EA només augmenta un 45% el nombre d'errors des dels 3 als 20 mesos. A més, el nombre d'errors als 20 mesos de les rates d'EA és un 60% del nombre d'errors de les rates control de 20 mesos (Fig. 9)

Aquestes diferències resulten estadísticament significatives. Es poden veure les diferències entre les rates d'EA i les rates control, tant a mascles ($F(1,44) = 20.76; P < 0.0001$) com a femelles ($F(1, 32) = 8.779; P < 0.0057$)

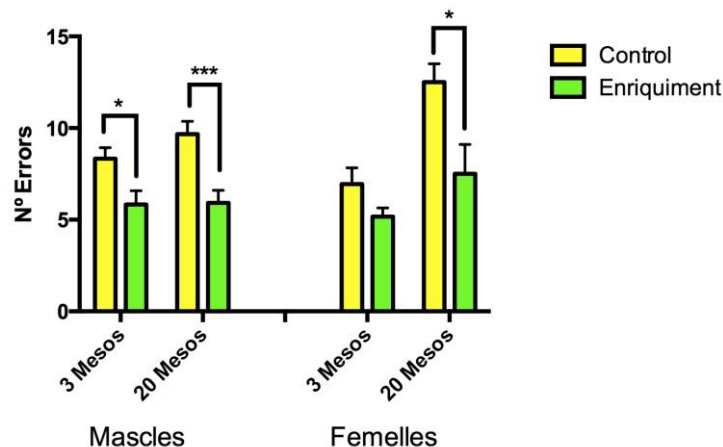


Fig. 9. Errors totals del test *Radial Maze* dels grups control i EA, mascles i femelles, de 3 i 20 mesos d'edat. ANOVA seguit de Bonferroni, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Reconeixement d'objectes

El reconeixement d'objectes és una prova que permet analitzar la memòria a curt termini dels animals d'experimentació. Aquest test es basa en la curiositat i en l'instint inherent d'exploració, de les rates.

En aquesta prova, es mesurà el temps d'exploració de l'objecte nou, i de l'objecte familiar a la fase de test. Llavors es calculà la diferència de temps d'exploració entre el nou i

el familiar, i els resultats s'analitzaren estadísticament mitjançant un anàlisi Two-way ANOVA, a on es tengué en compte les edats de les rates, i el sexe o el tractament.

En general, hi ha una lleugera pujada del temps d'exploració de l'objecte nou respecte al conegut, al segon i al tercer més, en relació al primer més. A partir del segon més, el temps d'exploració disminueix. L'anàlisi estadístic mostra les diferències en el temps d'exploració en relació a l'edat ($F(5, 202) = 4.397$; $P = 0.0012$). Per altre banda, no es mostren diferències estadísticament significatives entre rates mascle i rates femella. (Fig. 10)

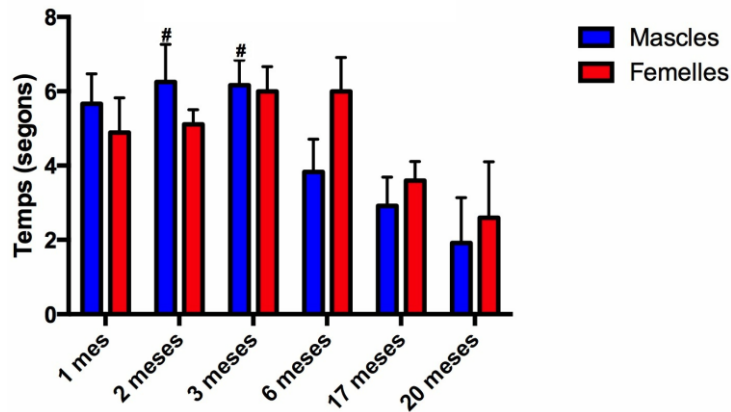


Fig. 10. Resultats de la prova de Reconeixement d'objectes del grup control, mascles i femelles, d'entre 1 i 20 mesos d'edat. ANOVA seguit de Bonferroni, # $p < 0.05$ respecte a 20 mesos.

Tampoc es mostren entre rates femella d'EA i rates control. No obstant, si es poden veure diferències estadísticament significatives entre rates mascle d'EA i rates mascle control ($F(1, 44) = 9.672$; $P = 0.0033$), amb un major temps d'exploració per part de les rates d'EA. Als 3 mesos d'edat, les rates d'EA mostren una diferència del temps d'exploració un 60% major que les rates control (6.167s a control; 10.08s a EA). Als 20 mesos, la diferència del temps d'exploració a les rates d'EA és el triple que a les rates control (1.917 a control; 5.667 a EA) (Fig. 11).

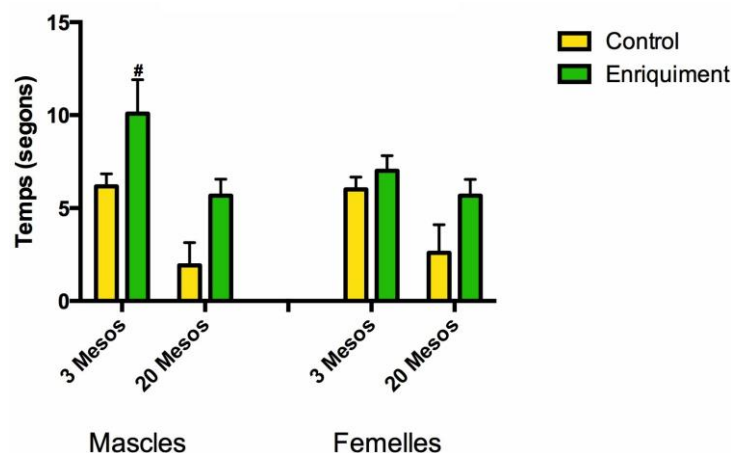


Fig. 11. Resultats de la prova de Reconeixement d'objectes dels grups control i EA, mascles i femelles, de 3 i 20 mesos d'edat. ANOVA seguit de Bonferroni, # $p < 0.05$ respecte a 20 mesos.

Rota Rod

El Rota Rod és una prova que permet analitzar la coordinació motora de l'animal, comparant els diversos temps de permanència damunt l'aparell.

En general, hi ha una tendència a disminuir el temps de permanència a damunt el *Rota Rod*, a mesura que s'avança en edat. Per part de les femelles, als primers mesos (primer, segon i tercer més), el temps de permanència és molt major que als altres, especialment el segon més, que amb una mitjana de 94.18 segons és tres vegades major que als 20 mesos, amb una mitjana de 30.5 segons. Aquesta tendència a disminuir el temps de permanència a damunt el *Rota Rod* es veu reflectit de forma estadísticament significativa al test Two-way ANOVA a on es comparen les diverses edats de mascles i femelles ($F(5, 100) = 9.091$; $P = 0.0001$) amb un temps de permanència superior a edats joves.

Les diferències del temps de permanència entre mascles i femelles control resultaren estadísticament significatives amb un Two-way ANOVA ($F(1,101) = 7.242$; $P = 0.0083$) amb un temps de permanència major per part de les femelles. A més, el test de Bonferroni mostrà diferències estadísticament significatives entre mascles i femelles al segon i tercer mesos d'edat. Els resultats per a 1, 6, 17 i 20 mesos d'edat són molt similars entre ells, i no mostren diferències estadísticament significatives (Fig. 12).

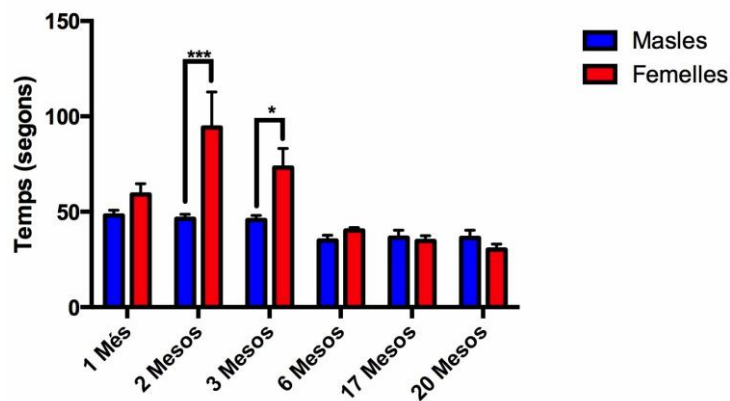


Fig. 12. Resultats del test *Rota Rod* del grup control, mascles i femelles, d'edats d'entre 1 i 20 mesos. ANOVA seguit de Bonferroni, * $p < 0.05$, *** = $P < 0.001$ respecte al control.

Per altre banda, comparant resultats del *Rota Rod* de rates control i rates en EA, no es vegeren diferències significatives amb un test Two-way ANOVA per cap dels dos gèneres (Fig. 13).

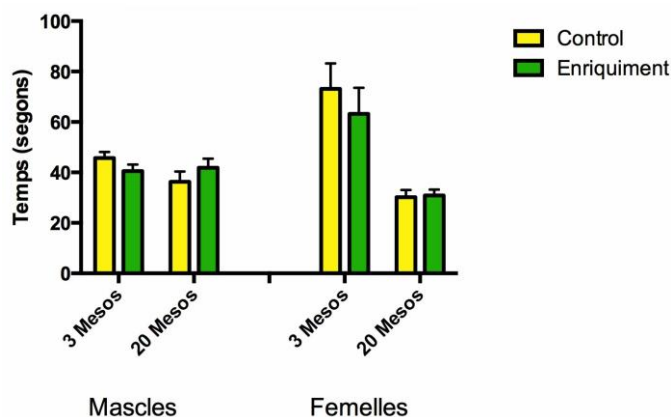


Fig. 13. Resultats del test *Rota Rod* del grup control i EA, mascles i femelles, de 3 i 20 mesos d'edat.

Test de Barnes

El test de Barnes és una prova que permet avaluar la memòria espacial a llarg termini i l'aprenentatge.

Es mesurà la latència total de tots els individus als tres entrenaments i al test. Els resultats foren analitzats amb tests estadístics per Two-way ANOVA, tenguent en compte els diversos entrenaments (tres entrenaments i un test), i el gènere (mascle o femella), o la situació (control o EA). No hi ha resultats de rates femella d'EA pel test de Barnes. No obstant, hi ha rates femella que criaren, i per tant, cuidant les rates recent nades, ja es produeix una situació similar a l'EA. Aquests resultats foren comparats als resultats de mascles d'EA.

No es poden observar diferències estadísticament significatives entre rates control i rates d'EA (o cria), ja que mostren resultats molt similars (Fig. 14).

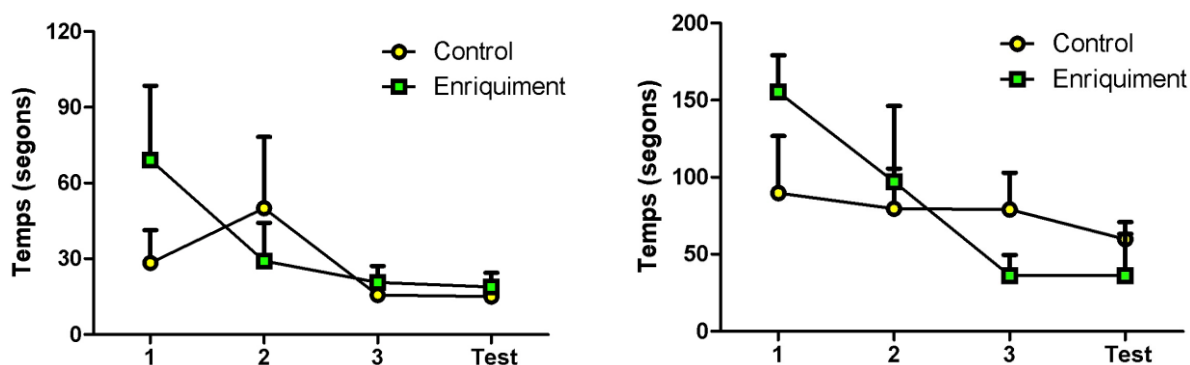


Fig. 14. Resultats del test de Barnes de rates de 20 mesos d'edat. La gràfica de l'esquerra representa els resultats de rates mascle. La de la dreta representa els resultats de rates femella.

Però si que es poden veure diferències entre mascles i femelles. Es poden veure diferències en el test Two-way ANOVA realitzat amb els resultats de rates mascles i femelles de 20 mesos d'edat, amb una menor latència total per part dels mascles ($F(1,36) = 11.45$; $P =$

0.0017). La latència total mostra una diferència als quatre entrenaments d'entre 40s i 60s, la qual cosa representa fins un 60% (aprox.) respecte a la latència total major, entre mascles i femelles (Fig. 15).

Un altre grup al qual s'hi poden veure diferències estadísticament significatives entre els resultats de rates mascle d'EA comparats amb els resultats de les rates femella de cria ($F(1,7) = 8.414$; $P = 0.0072$) (Fig. 15).

També es poden veure diferències estadísticament significatives entre els entrenaments ($F(1,7) = 6.103$; $P = 0.0025$). En aquesta comparació, es pot observar que la latència total de les femelles, és major que la dels mascles per a tots els entrenaments. En aquest cas, la diferència a la fase de test és poca, amb una diferència de 18 segons. No obstant, la diferència del primer entrenament entre rates mascle i rates femella d'EA és de 86 segons, una diferència més que considerable. De fet, les diferències entre mascles i femelles del primer entrenament resultaren significatives pel test de Bonferroni, amb un valor de $P < 0.05$.

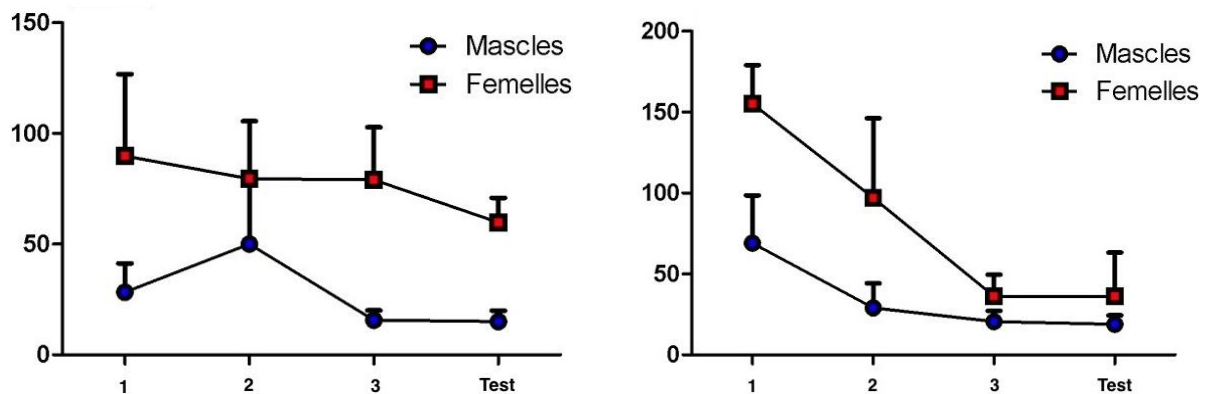


Fig. 15. Latència total del test de *Barnes*, en rates de 20 mesos d'edat, per cada un dels entrenaments i el test. La gràfica de l'esquerra representa els resultats de les rates control. La de la dreta els resultats de les rates d'EA.

Discussió

Radial Maze

Els resultats de la prova comportamental del *Radial Maze* a les rates control (tant mascles com femelles) mostren un augment de la latència total als 17 i 20 mesos, respecte dels resultats a altres edats. De la mateixa manera, els errors totals comesos per les rates tendeixen a augmentar, sobretot en el cas de les femelles, a diferència dels mascles, en que en nombre d'errors oscil·la entre valors molt similars.

L'augment de la latència total i del nombre d'errors indica un deteriorament associat a l'envelliment per part de la rata, lleugerament més acusat al cas de les femelles a edats avançades. No obstant, si es comparen els errors entre mascles i femelles a edats joves, les femelles mostren un menor nombre d'errors. Una possible explicació d'aquesta diferència entre l'edat jove, i l'edat avançada, seria l'efecte antioxidant dels estrògens (Manthey et al. 2006), protegint així les rates joves de l'estres oxidatiu, que provoca el deteriorament cognitiu (Hao et al. 2014). A més, els errors tendeixen a augmentar a mesura que s'avança en edat, la qual cosa demostra una menor memòria. Aquesta disminució de la memòria espacial és conseqüència del procés de deteriorament cognitiu produït durant l'envelliment.

La latència total del *Radial Maze* és un dels paràmetres comparats entre les rates control i les rates d'EA. La latència total de les rates, tant mascles com femelles, en EA no augmenta durant la seva edat com ho fa la latència de les rates control. Al cas de les rates mascle l'augment és molt menor, i de fet, en el cas de les femelles, hi ha una lleu millora de la latència total.

L'efecte positiu de l'enriquiment ambiental es troba molt més marcat a edats avançades, que a edats joves. Les diferències entre les rates d'EA i rates control en edat avançada demostra que l'EA retrassa o atenua el deteriorament associat a l'envelliment, de forma més marcada a les femelles.

També s'analitzaren els errors comesos per les rates control i rates d'EA. Les rates mascle control mantenen els errors constants durant la seva vida. Per altre banda, les rates femella, si be mantenen els errors més o menys constant fins als 6 mesos, als 17 i 20 mesos, la mitjana d'errors és molt més elevada, a la vegada que és molt major que a mascles.

L'augment d'errors durant l'edat (que hi pareix haver en el cas dels mascles, i que resulta evident en el cas de les femelles) és producte del deteriorament cognitiu produït a les rates durant el procés d'envelliment. El fet de que unes rates cometin més errors que unes altres, demostra una menor memòria espacial, ja que cometen més errors pel fet que no recorden tan bé a quins braços han entrat i a quins no. Per tant, a mesura que s'avança en edat es perd memòria visual, com a part del procés del deteriorament cognitiu, producte de l'envelliment.

Llavors, també es compararen els errors comesos per les rates d'EA amb els errors comesos per les rates control. Es vegé que les rates control cometien un major nombre d'errors que les rates d'EA. Les rates mascle d'EA mantenen el nombre d'errors comesos, des dels 3 als 20 mesos, i per tant, no mostren una pèrdua de la memòria espacial, ni un deteriorament cognitiu en aquest sentit. Les rates femella, si mostren una petita perdua de memòria espacial, en comparació als mascles. En tot cas, les rates d'EA mostren un menor nombre d'errors en comparació a les rates control.

Aquestes diferències entre les rates control i situació d'EA, indica una atenuació de la pèrdua de memòria espacial associada a l'envelliment. Al cas dels mascles fins i tot, aquesta pèrdua de memòria espacial no s'arriba a produir. El fet que les rates d'EA cometin menys errors indica una millor memòria espacial, ja que vol dir que recorden millor a quins braços han entrat i a quins no.

Aquests resultats pareixen coherents amb altres estudis que corroboren la millor memòria espacial de rates en EA, amb el *Radial Maze* (Winter, 1996) o amb proves similars al *Radial Maze*, com el *Morris Water-maze* (Harati et al. 2013).

Reconeixement d'objectes

Els resultats de la prova del Reconeixement d'objectes mostren una disminució del temps d'exploració per part de les rates a mesura que avancen en edat. Un pic més, aquesta prova també corrobora el deteriorament cognitiu que es produeix durant l'envelliment.

Els resultats pareixen indicar que, en general, les femelles mostren un major temps d'exploració que els mascles, de l'objecte nou en relació a l'objecte familiar als 6, 17 i 20 mesos, tot i que no es pot assegurar ja que no es poden trobar diferències estadísticament significatives. Aquests resultats pareixen indicar que les femelles mostren una major memòria no espacial (memòria episòdica) que els mascles. Igual que altres estudis, en que rates femelles eren capaces de recordar un objecte durant més temps que els mascles a curt termini (Ghi et al. 1999), demostrant una millor memòria no espacial.

Per altre banda, si es poden veure diferències significatives entre mascles d'EA i rates control amb un major temps d'exploració per part de les rates d'EA. Les femelles mostren la mateixa tendència, tot i que no ha estat reflexada a l'anàlisi estadístic.

Per tant, els resultats indiquen que l'EA disminueix el deteriorament de la memòria no espacial produït per l'envelliment, al cas dels mascles. Es pot intuir la mateixa tendència al cas de les femelles, però no es pot corroborar estadísticament.

El Reconeixement d'objectes, es considera un paradigma per els estudis de la memòria episòdica a humans. Les diferències trobades comparades amb les diferències del *Radial Maze* es poden deure, a que els dos processos de memòria impliquen zones cerebrals diferents.

Aquests resultats es troben en coherència amb altres estudis similars, en que les rates d'EA milloraven els seus resultats a la prova de Reconeixement d'objectes (Mesa-Gresa et al. 2013; Leger et al. 2014), i en general, la capacitat exploratòria (Lima et al. 2014).

Rota Rod

Els resultats del *Rota Rod* pareixen indicar que també es produeix un deteriorament associat a l'envelliment, ja que les rates a edats avançades mostren un temps de permanència menor a damunt l'aparell. No obstant, no mostraren diferències significatives.

Per una banda, entre mascles i femelles, tan sols es podien veure diferències als primers mesos d'edat (2 i 3 mesos), a on les femelles mostren un temps de permanència molt major al *Rota Rod* que els mascles. Tot i que als altres mesos, les diferències són o molt petites o nul·les.

Per altre banda, no es poden observar diferències significatives entre rates d'EA i rates control a cap dels mesos, per cap dels dos gèneres.

Aquests resultats apunten a que, si bé es produeix un deteriorament associat a l'envelliment de la coordinació motora de les rates, no hi ha diferències aparents entre mascles i femelles. Així mateix, també pareixen apuntar a que l'EA no retrassa ni atura aquest deteriorament.

Test de Barnes

El test de Barnes mostra resultats molt similars entre mascles i femelles, i entre rates control i rates d'EA. Per això mateix, no es poden veure diferències estadísticament significatives a bona part dels resultats.

No obstant, si es poden veure entre els resultats de mascles i femelles control, als 20 mesos d'edat. També es poden veure diferències entre rates mascle d'EA, i rates femella de cria. A ambdós casos, les femelles mostren una latència total major que els mascles.

A més, les rates d'EA, a diferència de les rates control, mostren una millora des de el primer entrenament a la fase de test.

Aquests resultats pareixen indicar que els mascles, comparat amb les femelles, mostren una millor memòria espacial i aprenentatge a avançades edats, ja que tant en una situació com en una altre, els mascles mostren una menor latència total.

En situació d'EA, la millora des de el primer entrenament a la fase de test, apunta a que l'EA contribueix a una millor activitat cognitiva, respecte a l'aprenentatge i a la memòria a curt termini, ja que en un període curt de temps, redueixen considerablement la latència total. Per altre banda, la diferència de temps al primer entrenament, la menor latència del mascle s'interpreta com una millor memòria a llarg termini ja que les rates van tenir una fase de familiarització al dispositiu del Barnes el dia anterior.

Conclusions

1. En general, els mascles mostren una millor memòria espacial a la prova *Radial Maze* i al Test de *Barnes* a mesura que s'avança en edat. Les femelles, en canvi, mostren un major deteriorament de la memòria espacial. Aquests resultats pareixen indicar que les rates femella tenen una menor memòria espacial que els mascles, degut a la menor millora al *Radial Maze*.

En quan a la memòria de tipus episòdic, el deteriorament, tot i esser similar, es produeix a una edat posterior a les femelles que als mascles.

2. Els general, els resultats indiquen que l'enriquiment ambiental millora la memòria espacial i la memòria no espacial (memòria episòdica), ja que les rates d'EA mostraren millores significatives per les proves *Radial Maze* i la prova de Reconeixement d'objectes. Les altres proves no mostraren una diferència significativa entre les rates control i les rates d'EA. Tot i així, aquests resultats demostren l'eficàcia de l'EA front a la pèrdua de plasticitat neuronal, com a procés de deteriorament associat a l'envelliment.

3. En relació a la coordinació motora, les rates femella mostraren millors resultats que les rates mascle en la prova de coordinació motora *Rota Rod* de forma estadísticament significativa. Per altre banda, l'EA no pareix atenuar la pèrdua de coordinació motora, associada a l'edat.

Agraïments

A la Dra. Susana Esteban Valdés pel seu ajud durant la realització del Treball de Fí de Grau. A Marga Ramis i Fiorella Sarubbo per ensenyar-me els diferents tests comportamentals, i la dinàmica d'un laboratori d'investigació. Així com per proporcionar gran part de les dades utilitzades a aquest treball.

Bibliografia

Ashok, B. T., & Ali, R. (1999). The aging paradox: free radical theory of aging. *Experimental Gerontology*, 34(3), 293–303.

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

Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 30–40.

Butterfield, D. A., Abdul, H. M., Newman, S., & Reed, T. (2006). Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. *NeuroRx*, 3(3), 344–357

Castro, M. D. R., Suarez, E., Kraiselburd, E., Isidro, A., Paz, J., Ferder, L., & Ayala-Torres, S. (2012). Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys. *Experimental Gerontology*, 47(1), 29–37.

DeFelipe, J. (2006). Brain plasticity and mental processes: Cajal again. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 811–817.

Duthey, B. (2013). Alzheimer Disease and Other Dementias. *Prior Medicines for Europe and the World*.

Fraga, C. G., Shigenaga, M. K., Park, J. W., Degan, P., & Ames, B. N. (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4533–4537.

Harati, H., Barbelivien, A., Herbeaux, K., Muller, M.A., Engeln, M., Kelche, C., Cassel, J.C., Majchrzak, M. 2013. Lifelong environmental enrichment in rats: impact on emotional behavior, spatial memory vividness, and cholinergic neurons over the lifespan. *Age*, 35, 1027-1043

Ghi, P., Orsetti, M., Gamalero, S. R., & Ferretti, C. (1999). Sex differences in memory performance in the object recognition test. Possible role of histamine receptors. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 64(4), 761–766.

Hao, L., Huang, H., Gao, J., Marshall, C., Chen, Y., Xiao, M. (2014). The influence of gender, age and treatment time on brain oxidative stress and memory impairment induced by d-galactose in mice. *Neuroscience Letters* 571, 45-49.

Harati, H., Barbelivien, A., Herbeaux, K., Muller, M.A., Engeln, M., Kelche, C., Cassel, J.C., Majchrzak, M. 2013. Lifelong environmental enrichment in rats: impact on emotional behavior, spatial memory vividness, and cholinergic neurons over the lifespan. *Age*, 35, 1027-1043.

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300.

- Leger, M., Paizanis, E., Dzahini, K., Quiedeville, A., Bouet, V., Cassel, J.C., Schumann-Bard, P.; Ferret, T., Bolouard, M. (2014). Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cerebral Cortex*. Disponible a: <http://cercor.oxfordjournals.org/content/early/2014/06/05/cercor.bhu119.full.pdf>
- Lima, A. P. A. S., Silva, K., Padovan, C. M., Almeida, S. S., & Fukuda, M. T. H. (2014). Memory, learning, and participation of the cholinergic system in young rats exposed to environmental enrichment. *Behavioural Brain Research*, 259, 247–252
- Manthey, D., Behl, C. (2006). From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen. *Neuroscience* 138, 845–850.
- Mariani, E., Polidori, M. C., Cherubini, A., & Mecocci, P. (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 827(1), 65–75.
- Mattson, M. (2001). Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(7), 757–778.
- Mesa-Gresa, P., Pérez-Martinez, A., & Redolat, R. (2013). Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. *Aggressive Behavior*, 39(4), 269–279.
- Mora, F., Segovia, G., & del Arco, A. (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Research Reviews*, 55(1), 78–88.
- Papandreou, M. A., Tsachaki, M., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P., Lamari, F. N., & Margarity, M. (2011). Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behavioural Brain Research*, 219(2), 197–204.
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), 191–198.
- Sampedro-Piquero, P., & Begega, A. (2013). Age-dependent effects of environmental enrichment on brain networks and spatial memory in Wistar rats. *Neuroscience*.
- Sampedro-Piquero, P., Zancada-Menendez, C., Begega, A., Rubio, S., & Arias, J. L. (2013). Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. *Brain Research Bulletin*, 98, 1–9.
- Sohal, R. S.; Sohal, B. H.; Brunk, U. T. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mechanisms of Ageing and Development*, 53, 217–227
- Szatrowski, T. P., & Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research*, 51(3), 794–798.

Viña, J., Borrás, C., & Miquel, J. (2007). Theories of ageing. *IUBMB Life*, 59(4-5), 249–254.

Weinert, B. T., & Timiras, P. S. (2003). Invited Review: Theories of aging. *Journal of Applied Physiology*, 95(4), 1706–1716.

Winter, J. C. (1997). The effects of age on continuous learning in the radial maze. *Physiology & Behavior*, 61(4), 609–612.