



**Universitat**  
de les Illes Balears

# Título: Efectos del enriquecimiento ambiental desde los 3, 7 y 18 meses en ratas viejas

AUTOR: Miguel Arash Enseñat Méndez

**Memoria del Trabajo de Fin de Máster**

Máster Universitario en Neurociencias  
de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico 2015-16

*Fecha: 07-09-2016*

*Nombre Tutor del Trabajo: Antoni Miralles Socías*



## ÍNDICE

<b>RESUMEN / ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>ENVEJECIMIENTO</b>	<b>3</b>
CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL CEREBRO. CAMBIOS REGIONALES	3
NEUROINFLAMACIÓN	4
<b>SIRT1</b>	<b>5</b>
<b>NF-κB</b>	<b>7</b>
<b>BDNF</b>	<b>9</b>
<b>RBAP</b>	<b>11</b>
<b>ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<b>PROTOCOLO DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL Y ANIMALES UTILIZADOS</b>	<b>15</b>
ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL A PARTIR DE 1 MES DE EDAD	16
ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL A PARTIR DE 7 MESES DE EDAD	16
ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL A PARTIR DE 18 MESES DE EDAD	17
<b>TEST DE BARNES</b>	<b>17</b>
<b>SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS</b>	<b>19</b>
<b>HOMOGENIZACIÓN DEL TEJIDO</b>	<b>19</b>
<b>WESTERN-BLOT</b>	<b>20</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>24</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>TEST DE BARNES</b>	<b>25</b>
<b>SIRT1</b>	<b>30</b>
<b>NF-κB Y NF-κB-ACETILADO</b>	<b>31</b>
<b>BDNF</b>	<b>32</b>
<b>RBAP</b>	<b>33</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>39</b>

## RESUMEN / ABSTRACT

En numerosos estudios, el enriquecimiento ambiental (EA) ha demostrado que tiene capacidad de mejorar las capacidades cognitivas, y que es capaz de contrarrestar los déficits cognitivos que ocurren durante el envejecimiento. En este trabajo se estudiaron los efectos del EA en ratas de 20 meses, que han sido expuestas a EA desde los 3, 7 y 18 meses hasta los 20 meses. Se realizó el Test de Barnes para estudiar la memoria espacial, y técnicas de Western-Blot para estudiar si el EA producía cambios en Sirt1, NF- $\kappa$ B y NF- $\kappa$ B acetilado, BDNF y RbAp46/48.

Los resultados indican que el EA es capaz de mejorar la memoria espacial en ratas viejas (20 meses) sin importar a que edad fue iniciado, mostrando mejorías en los tres grupos estudiados. Además, se encontraron diferencias en los niveles de Sirt1 y RbAp46/48 entre ratas jóvenes (3 meses) y viejas (20 meses). Esta disminución en los niveles de estas proteínas no se ha visto revertida por el EA en ninguno de los grupos estudiados, ya que el EA no ha afectado a la cantidad de ninguna de las proteínas estudiadas.

In several studies, environmental enrichment (EE) has proved its capacity to improve cognitive capacities and to balance the cognitive deficits occurred during aging. In this study, we study the effects of EE in 20 months rats that have been exposed to EE since the age of 3, 7 and 18 months. Barnes Test and Western-Blot techniques were used to study spatial memory and changes in Sirt1, NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B acetylated, BDNF and RbAp46/48.

The results show that EE improves spatial memory in old rats (20 months), regardless of the age of onset, showing improvements in the three groups studied. Furthermore, differences in Sirt1 and RbAp46/48 were found between young (3 months) and old rats (20 months). This decline in the levels of both proteins during aging has not been reversed by EE in any of the groups studied, as EE has not affected the quantities of any of the studied proteins.

Palabras clave: Envejecimiento, Enriquecimiento Ambiental, Neurociencia, Sirt1, NF- $\kappa$ B, RbAp46/48, BDNF, test de Barnes, memoria espacial.

## INTRODUCCIÓN

### ENVEJECIMIENTO

Durante el último siglo la esperanza de vida ha aumentado de manera remarcable en los países occidentales. El número de personas mayores de 65 años está aumentando rápidamente, y de hecho, el grupo de población de mayor crecimiento en las últimas décadas es el de los mayores de 85 años (Christensen et al., 2009). Aun así, el hecho de que se haya conseguido alargar la vida no implica que la calidad de vida de las personas de mayor edad sea elevada, ya que existen una gran cantidad de problemas asociados al envejecimiento. Estos problemas van de déficits en la movilidad a déficits cognitivos, pasando por un mayor riesgo de sufrir ciertas enfermedades. Todos estos problemas son producidos por el deterioro de diversos procesos celulares en distintas partes del organismo, incluyendo por supuesto el cerebro, lo que produce estos déficits cognitivos asociados al envejecimiento.

Uno de los puntos donde más se pueden observar los déficits cognitivos es en la memoria, que se ve especialmente afectada por la edad. Aun así, el envejecimiento no afecta de igual modo a todos los tipos de memoria, sino que ciertos tipos permanecen casi intactos con los años. De este modo, se sabe que con la edad no hay disminución (de hecho se postula que hay aumentos) en el conocimiento de información adquirida tempranamente en la vida, como es el vocabulario, mientras que estas personas demuestran mayores problemas para integrar nueva información, y se observa una disminución casi lineal en esta capacidad a partir de los 20 años (Salthouse, 2010). Una de las capacidades que se ven afectadas por el envejecimiento es la memoria espacial, de especial interés en este estudio (Kirasic, 1991).

---

### CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL CEREBRO. CAMBIOS REGIONALES

El déficit cognitivo asociado a la edad está producido por una serie de cambios estructurales que se producen en el envejecimiento normal del cerebro. Estos cambios se atribuyen principalmente al deterioro de la sustancia gris de las estructuras corticales, que se encuentra asociado a la edad, y existen estudios que muestran mayores disminuciones volumétricas en la zona frontal que en la posterior (Allen et al., 2005), por lo que existe la teoría de que el deterioro de la sustancia gris se produce en un gradiente anteroposterior (Artero et al., 2004; Raz y Rodrigue, 2006). Aun así, gracias a las nuevas técnicas de estudio se ha demostrado que este no es el único factor que produce el deterioro cognitivo. De hecho, actualmente se cree que los cambios en la sustancia blanca pueden ser tan o más importantes que los cambios a nivel de la sustancia gris, y se han observado importantes reducciones volumétricas tanto globales como regionales en la sustancia blanca. En esta línea, Ziegler (2010) mostró que la degeneración de la sustancia blanca correlacionaba mejor con el deterioro de los procesos de control cognitivo y con la memoria episódica que el grosor cortical global, por lo que se cree que la degeneración de la sustancia blanca pueda tener mayor relación con las diferencias cognitivas que la pérdida de volumen cortical global.

No todas las estructuras cerebrales están igualmente afectadas por la edad, de modo que es la afectación de ciertas estructuras y no del conjunto del cerebro lo que produce el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento (Burke y Barnes, 2006). El hecho de que solo ciertas estructuras estén afectadas por la edad concuerda con la observación de que no todos los tipos de memoria están igualmente afectados por el envejecimiento, sino que solo la memoria en la que están involucradas estas estructuras se encontrará afectada. Actualmente se conoce que, entre otras estructuras, se producen alteraciones en el hipocampo y otras estructuras del lóbulo temporal medial, especialmente el estriado, y son estas alteraciones las que producen el deterioro en la memoria episódica asociado a la edad, mientras que las pérdidas a nivel cortical (especialmente en el córtex prefrontal) están involucradas con una disminución de los procesos de control cognitivo (Fjell et al., 2016; Tisserand y Jolles, 2003; West, 1996).

Es importante mencionar que el deterioro cognitivo y la disminución del volumen de estas estructuras no está asociado a una reducción en el número de neuronas, sino que estos déficits son producidos por una disminución en la densidad sináptica similar a la que ocurre en la enfermedad de Alzheimer, aunque menos drástica que la ocurrida en la enfermedad, además de por déficits en la potenciación a largo plazo (LTP), aumentos en la depresión a largo plazo (LTD) y disminución de la neurogénesis en el giro dentado (Burke y Barnes, 2006; Denis-Donini et al., 2008; Morrison y Baxter, 2012). Estos cambios también son específicos de ciertas regiones, y se han encontrado diferencias en la expresión de ciertos genes involucrados en la sinapsis en zonas del neocórtex, hipocampo y la corteza entorrinal, estando la mayor parte de estos genes menos expresados durante el envejecimiento (Morrison y Baxter, 2012).

---

## NEUROINFLAMACIÓN

En el proceso de envejecimiento también juega un papel muy importante la neuroinflamación, un proceso que ocurre durante el envejecimiento normal, aunque se ve todavía más aumentado en estados patológicos como el Alzheimer (Holmes y Butchart, 2011). En el cerebro envejecido, ciertas estructuras cerebrales como el hipocampo están sensibilizadas, por lo que la respuesta inmune frente a estímulos externos es demasiado alta (Godbout et al., 2005). En individuos adultos sanos, la microglía produce citoquinas proinflamatorias ante una lesión o estímulo adverso (Kreutzberg, 1996), y posteriormente, otra población de microglía produce citoquinas antiinflamatorias y otras moléculas como factores de crecimiento y neurotrofinas como brain derived neurotrophic factor (BDNF), aunque se ha visto que la inflamación mantenida durante el envejecimiento tiende a disminuir los niveles globales de BDNF. Durante el envejecimiento se produce un aumento en un fenotipo de microglía que sobre-expresa MHCII, CD11b y Iba-1, produciendo un aumento del estado de activación de la microglía que conlleva una mayor respuesta proinflamatoria (ver revisión de Barrientos et al., 2015). Este proceso parece estar especialmente aumentado en el hipocampo, lo que encaja con un posible efecto de la neuroinflamación en el déficit cognitivo asociado al envejecimiento, y concuerda con la pérdida de memoria episódica sufrida con el aumento de la edad (Barrientos et al., 2009). Uno de los mayores reguladores de la neuroinflamación en el envejecimiento parecer ser el NF- $\kappa$ B (nuclear-

factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells), un factor de transcripción con una elevada capacidad de modular la respuesta inflamatoria, y del que actualmente se conoce que es uno de los principales factores que afectan a la neuroinflamación asociada al envejecimiento (ver apartado NF- $\kappa$ B)

Estos resultados demuestran que existe un mecanismo por el cual el cerebro envejecido está en un estado de mayor susceptibilidad al daño inflamatorio, de modo que ante una lesión, se produce un exceso de inflamación que puede producir déficits cognitivos, y este riesgo es mayor en ciertas zonas como el hipocampo (Barrientos et al., 2006, Barrientos, 2015). Además, este aumento de la neuroinflamación en el cerebro envejecido mediado por cambios en la microglía conlleva un aumento en la vulnerabilidad a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Mandrekar-Colucci y Landreth, 2010). En esta línea, la edad también afecta al transcriptoma cerebral, y se han encontrado diferencias significativas en los niveles de mRNA en muchos genes relacionados con la inflamación, que se encuentran sobreexpresados en el envejecimiento, mientras que la expresión de genes relacionados con la integridad sináptica y el crecimiento y desarrollo neuronal, como BDNF, se ve reducida (ver revisión de Mohan et al., 2016, ver apartado BDNF).

Aun así, en contra de lo que pueda parecer, el envejecimiento y la acumulación de daño celular no promueve un aumento de la apoptosis, ya que no se han encontrado aumentos en este proceso durante el envejecimiento en la mayoría de tejidos de mamíferos. Por el contrario, se ha encontrado una disminución en la apoptosis que conlleva la acumulación de daño y defectos funcionales (Wang, 1997). Este hecho coincide con la observación de que el número de neuronas no se encuentra disminuido durante el envejecimiento.

## SIRT1

Las sirtuinas o proteínas Sir2 (*silent information regulator*) son una familia de proteínas deacetilasas y deacilasas dependientes de NAD<sup>+</sup> que se encuentran muy conservadas en la evolución, y que pertenecen al grupo de las histonas deacetilasas (HDAC), formando concretamente la Clase III de este grupo de proteínas. Desde hace tiempo se conoce que esta familia tiene una elevada importancia en la regulación del envejecimiento y la longevidad en invertebrados, y actualmente se postula que pueda tener efectos similares en vertebrados. En mamíferos encontramos 7 homólogos que conforman la familia de las sirtuinas: Sirt1, Sirt2, Sirt3 y Sirt 7, que son proteínas deacetilasas; Sirt5 que es deacetilasa, desuccinilasa y demalonilasa; Sirt6 que es deacetilasa, ADP-ribosiltransferasa, depalmitoilasa y demiristoilasa; y Sirt4, que no se encuentra todavía totalmente caracterizada. No todas las sirtuinas se encuentran en los mismos compartimentos celulares, ya que Sirt1, Sirt6 y Sirt7 son nucleares, Sirt2 citoplasmática y Sirt3, Sirt4 y Sirt5 mitocondriales. Aun así, se conoce que Sirt1 y Sirt2 tienen capacidad de translocación entre el citoplasma y el núcleo (ver revisión de Satoh y Imai, 2014). Cada una de las sirtuinas presenta un patrón de expresión distinto, variando sus niveles entre distintas localizaciones (Sidorova-Darmos et al., 2014).

Las funciones de las sirtuinas son muy variadas, y se han descrito efectos en reparación

de DNA, supervivencia celular, respuesta al estrés, regulación de los telómeros y de la cromatina, autofagia, aprendizaje y memoria, sueño, y longevidad, de modo que se teoriza que son unas proteínas de elevada importancia, especialmente durante el envejecimiento. Además, Sirt1 también presenta efecto anti-inflamatorio, lo cual será comentado posteriormente en el apartado de NF- $\kappa$ B. Estas funciones son llevadas a cabo gracias a su función deacetilasa, regulando la actividad de distintas proteínas afectando a su regulación post-traducciona, y controlando la transcripción de distintos genes (principalmente su silenciamiento) mediante deacetilación de histonas (Sato y Imai, 2014).

Algunas de las proteínas reguladas por las sirtuinas son la proteína supresora de tumores p53, y NF- $\kappa$ B (Yeung et al., 2004), que son deacetiladas por Sirt1 (ver revisión de Ramis et al., 2015). En el caso de NF- $\kappa$ B, la proteína es desactivada por la acción de Sirt1 disminuyendo así su efecto inflamatorio, pero también antiapoptótico, mientras que en el caso de p53 el efecto también es inhibitorio, de modo que disminuye el efecto apoptótico de esta proteína. Estos dos ejemplos, donde Sirt1 actúa como “facilitador” de la apoptosis inhibiendo el efecto de NF- $\kappa$ B y como “inhibidor” de la apoptosis inhibiendo el efecto de p53 nos demuestra que los efectos de esta proteína son ampliamente variables, por lo que su regulación debe estar finamente controlada. Este efecto paradójico también se puede comprobar observando sus efectos en otras proteínas como la Survivina, una proteína antiapoptótica que también se ve inhibida por el efecto de Sirt1 y sobre FOXO, que produce aumentos en la apoptosis pero que también es inhibida por Sirt1 (ver revisión de Gomes et al., 2016).

Sirt1 es la proteína más estudiada de esta familia debido a sus diversas funciones, y se ha estudiado especialmente su efecto en la longevidad y el envejecimiento, aunque también regula otras funciones como la resistencia a estrés y la apoptosis (Chung et al., 2010). Pese a la multitud de funciones que puede llevar a cabo Sirt1, el principal motivo por el que en los últimos años el estudio de esta proteína ha aumentado notablemente es por su efecto en la longevidad, ya que se ha observado un aumento en la esperanza de vida en ratones transgénicos que sobre-expresan Sirt1 en el cerebro, de modo que se postula que los aumentos de Sirt1 puedan aumentar la longevidad también en mamíferos, tal como hacen en invertebrados. Este hecho también se corrobora por el hecho de que la inhibición de Sirt1 en ratones disminuye la esperanza de vida. Además, se ha demostrado que el aumento de la longevidad producido por la restricción calórica está asociado a aumentos en los niveles de las sirtuinas, y que la inhibición de estas proteínas inhibe el aumento de la esperanza de vida asociado a la restricción calórica (ver revisión de Park et al., 2013).

Los resultados existentes en la bibliografía sugieren que Sirt1 disminuye en el envejecimiento, especialmente en el hipocampo, un área especialmente afectada por la edad (Quintas et al., 2012) y el núcleo supraquiasmático (Chang y Guarente, 2013), aunque hay estudios que no muestran diferencias (Sidorova-Darmos et al., 2014) o incluso que muestran mayores niveles en las ratas viejas (Braidy et al., 2015). Aun así, la perspectiva general es que, aunque no todos los estudios demuestran que Sirt1 no disminuya sus niveles durante el envejecimiento, los niveles generales de la familia de las sirtuinas sí que disminuyen con la edad (Braidy et al., 2015).



Pese a la ambigüedad encontrada en la bibliografía sobre los niveles de Sirt1 en el cerebro, sí que está ampliamente aceptado que la actividad de Sirt1 disminuye con el envejecimiento, y se postula que esta disminución en la actividad de Sirt1 pueda ser producida por la disminución en los niveles de NAD<sup>+</sup> que se produce durante el envejecimiento (Braidy et al., 2011). La disminución de NAD<sup>+</sup> producida por otras causas, como la mediada por PARP, también produce una disminución en la actividad de Sirt1, produciendo así un aumento en la actividad de efectores apoptóticos como p53, aumentando los niveles celulares de apoptosis, corroborando así la hipótesis de que la disminución de NAD<sup>+</sup> produce una menor activación de Sirt1 (Yang y Sauve, 2006; Yang y Sauve, 2007). Esta menor actividad de Sirt1 puede tener importancia en el déficit cognitivo asociado al envejecimiento, ya que se sabe que Sirt1 tiene un importante papel en la plasticidad sináptica y en los procesos de memoria, y la falta de Sirt1 en el hipocampo produce una disminución de las capacidades cognitivas, mientras que su activación puede producir efectos positivos, tales como protección ante la toxicidad producida por la proteína  $\beta$ -amiloides (ver revisión de Ramis et al., 2015). Además, Sirt1 también afecta a CREB, un factor de transcripción con importancia en la memoria (Silva et al., 1998), siendo importante en la memoria participando en la vía miRNA-CREB y afectando a la expresión de BDNF (Zhao et al., 2013).

## NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B, acrónimo de “nuclear-factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells” es un factor de transcripción presente en mamíferos que fue descrito inicialmente como un activador de la transcripción del gen codificante para la cadena ligera de los anticuerpos en las células B, pero del que actualmente se cree que es el principal regulador transcripcional relacionado con el sistema inmune en mamíferos. NF- $\kappa$ B se activa rápidamente en el sistema inmune de mamíferos ante infecciones, sean bacterianas o víricas, inflamación u otras situaciones de estrés, y se activa en presencia de citoquinas inflamatorias como pueden ser TNF- $\alpha$  o IL-1, que son liberadas alrededor de los puntos de infección. Aun así, actualmente NF- $\kappa$ B está siendo ampliamente estudiado por sus efectos en la plasticidad sináptica y en la consolidación de la memoria, afectando a la transcripción de genes como CaMKII y BDNF. Además, también presenta importancia en el proceso de LTP y se ha demostrado su importancia en la formación de memoria a largo plazo (Alberini, 2009).

NF- $\kappa$ B comprende 5 proteínas, RelA, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 y NF- $\kappa$ B2, que se unen entre ellas para formar homodímeros y heterodímeros. El dímero de mayor importancia es el heterodímero formado por RelA (también denominado factor de transcripción p65, o simplemente p65) y NF- $\kappa$ B1 (denominado p50), que forman el heterodímero p50/p65 (NF- $\kappa$ B1/RelA). Todas estas proteínas comparten una región en su extremo N-terminal que es necesaria para su dimerización y su posterior unión al DNA, ya que contiene la señal de localización nuclear.

En estado inactivo, NF- $\kappa$ B está retenido en el citosol por la unión de una proteína inhibidora (I- $\kappa$ B, que contiene 3 subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ ), que se une a la región N-terminal del dímero, enmascarando así la señal de localización nuclear e impidiendo que entre al núcleo, quedando así el dímero secuestrado en el citoplasma. En el momento en el

que hay una estimulación de una célula por una citoquina o un agente infeccioso, o en el caso del cerebro, también cuando hay una estimulación de los terminales sinápticos por dopamina o por la cascada de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  con acción de CaMKII, se produce una activación de la quinasa IKK, que fosforila a I- $\kappa$ B en su subunidad  $\alpha$  en dos residuos N-terminales de serina, y posteriormente una ubiquitin ligasa E3 se une a estos residuos y poliubiquitina a I- $\kappa$ B $\alpha$ , que es degradada por el proteosoma. Esta degradación de I- $\kappa$ B permite la exposición de la señal de localización nuclear de NF- $\kappa$ B, que es translocado al núcleo, permitiendo así su función y activando la transcripción de numerosos genes, como citoquinas, quimiocinas, proteínas receptoras que permiten que los neutrófilos migren a tejidos adyacentes, proteínas anti-apoptóticas que previenen la muerte celular y proteínas involucradas en la plasticidad sináptica, como BDNF. Además, también estimula la expresión de iNOS, aumentando así la producción de óxido nítrico. La activación de NF- $\kappa$ B es inhibida gracias a un mecanismo de feedback negativo, ya que uno de los genes que ven su transcripción aumentada es I- $\kappa$ B $\alpha$ , de modo que este aumento acaba produciendo la inhibición de NF- $\kappa$ B (Alberts et al., 2010; Alberini, 2009).

La subunidad p65 sufre importantes modificaciones post-transcripcionales, como fosforilación y acetilación, que se cree que son capaces de modular su capacidad de unión al DNA, actividad transcripcional, interacción con las proteínas I- $\kappa$ B y localización subcelular. La acetilación se produce en residuos de lisina, concretamente en K310, K314 y K315, activando el factor de transcripción y aumentando así su actividad (Chen et al., 2001; Kiernan et al., 2003; Buerki et al., 2008). Además, se cree que la acetilación en distintos lugares de la proteína puede producir diferentes patrones de expresión de genes (Buerki et al., 2008).

La acetilación es un proceso altamente regulado, que puede ser modificado de manera dinámica gracias a la acción de las histonas acetiltransferasas (HAT) y las histonas deacetilasas (HDAC), y el balance entre ambas es el que regula los niveles de acetilación y por tanto la respuesta celular ante las señales externas. Actualmente se conoce que las sirtuinas afectan al estado de acetilación de NF- $\kappa$ B, y se ha observado que tanto Sirt1 como Sirt2 deacetilan a p65 en K310 tanto in vitro como in vivo, inhibiendo de esta manera su efecto transcripcional y sensibilizando las células a la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  (Yeung et al., 2004; Rothgiesser et al., 2010). Este efecto de Sirt1 en el estado de acetilación de NF- $\kappa$ B se ha demostrado también en otros estudios que muestran que disminuciones en los niveles de Sirt1 producen un aumento en la acetilación de NF- $\kappa$ B (ver revisión de Hwang et al., 2013).

El tiempo de exposición a los factores activadores de NF- $\kappa$ B produce cambios en el efecto de NF- $\kappa$ B, ya que las exposiciones prolongadas de TNF- $\alpha$  producen oscilaciones en su activación debido al mecanismo de feedback negativo, y se ha demostrado que los genes que se regulan en exposiciones cortas o prolongadas a TNF- $\alpha$  no son los mismos (Häcker y Karin, 2006; Alberts et al., 2010; Lodish, 2008). En un modelo experimental con una activación sostenida de NF- $\kappa$ B independiente de TNF- $\alpha$  se observó que, a diferencia de lo esperado, no se producía una neuroinflamación generalizada, sino que se producía solo en ciertas zonas, como el giro dentado, donde además se producía una disminución en los niveles de BDNF (también encontrada en

el córtex). Además, esta activación también producía déficits en las funciones cognitivas en pruebas de memoria espacial. También se encontraron aumentos en los niveles de TNF- $\alpha$  a nivel del giro dentado, y se postula que este aumento de TNF- $\alpha$  y disminución de BDNF puede ser uno de los mecanismos que producen neurodegeneración en el envejecimiento (Maqbool et al., 2013).

En línea con estos estudios, se cree que la activación sostenida de NF- $\kappa$ B produce efectos tóxicos en el cerebro, pero que la activación transitoria produce efectos positivos, ya que en estudios donde se ha inhibido NF- $\kappa$ B se han demostrado efectos perjudiciales en la diferenciación neuronal, formación de sinapsis, axogénesis, función neuronal, memoria espacial y formación de memoria (ver revisión de Kaltschmidt y Kaltschmidt, 2009), y se ha demostrado el efecto positivo de NF- $\kappa$ B sobre la supervivencia neuronal y la plasticidad (Mattson et al., 2000).

En estudios con roedores se ha encontrado una mayor actividad de NF- $\kappa$ B en los individuos viejos en todos los tejidos estudiados (incluyendo el cerebro), aunque el patrón de genes activados se mantuvo entre ambos grupos de edad. Aun así, mediante técnicas de Western-Blot se observó que no existían cambios en los niveles de los componentes de NF- $\kappa$ B p50 ni p65 en el cerebro, pero sí que se encontraba un aumento en la fracción nuclear de p52 y p65 en corazón e hígado (Helenius et al., 1996). Pese a que no parezca que haya un aumento de sus niveles, sí que ha sido demostrado en muchos estudios que hay una activación constitutiva de NF- $\kappa$ B durante el envejecimiento, lo que se cree que puede ser debido a una mayor retención de sus componentes en el núcleo, incrementando así su actividad (ver revisión de Salminen et al., 2008). El conocimiento de que hay una activación constitutiva de NF- $\kappa$ B en el envejecimiento, juntamente con la hipótesis de que la activación mantenida en el tiempo de NF- $\kappa$ B produce efectos neurodegenerativos nos conduce a pensar que durante el envejecimiento, NF- $\kappa$ B pierde su efecto neuroprotector y pasa a producir un efecto principalmente neurotóxico, produciendo un aumento de la neuroinflamación que conduce a la pérdida de capacidades cognitivas asociada a la edad, especialmente a nivel del hipocampo, donde se conoce que hay un mayor efecto de la neuroinflamación.

## BDNF

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) es, como su nombre indica, un factor neurotrófico o neurotrofina. Esta familia de proteínas tiene funciones diversas en el sistema nervioso, tales como el crecimiento de neuritas, sinaptogénesis, regulación de LTP y LTD, y la diferenciación, migración y supervivencia neuronal (ver revisión de Park et al., 2013). Pese a que existen diversas neurotrofinas, como NGF (nerve growth factor, o factor de crecimiento nervioso), NT-3 (neurotrofina-3) y NT-4 (neurotrofina-4), en este trabajo nos basamos únicamente en el estudio de BDNF, la proteína más estudiada y conocida de esta familia. En su estado maduro, las neurotrofinas forman homodímeros mediante enlaces no covalentes (ver revisión de Skaper, 2012).

Las neurotrofinas se unen a dos tipos de receptores, los Trks (receptores tirosina quinasa) y a p75<sup>NTR</sup>. Existen diferentes receptores Trks, y se ha observado que cada neurotrofina presenta diferentes afinidades para cada receptor, de modo que NGF se

une principalmente a TrkA, BDNF y NT-4 a TrkB y NT-3 a TrkC, aunque también de manera menos eficiente a TrkA y TrkB (Kaplan y Hempstead, 1991; Klein et al., 1991a, Klein et al., 1991b; Lamballe et al., 1991). La unión de los ligandos a sus receptores conlleva la autofosforilación de estos en residuos de tirosina, creando sitios de anclaje para segundos mensajeros (Skaper, 2012).

Ligeros cambios en los niveles de BDNF, o incluso sustituciones en su secuencia aminoacídica resultan en cambios comportamentales y neuroanatómicos en humanos y modelos murinos (Lyons et al., 1999; Chen et al., 2006), lo que sugiere que su expresión debe estar altamente regulada. La regulación de BDNF se lleva a cabo a distintos niveles. El primero de ellos es a nivel transcripcional, y se ha observado que la actividad neuronal es capaz de regular los niveles de mRNA de BDNF (Zafra et al., 1990). Posteriormente, también se puede llevar a cabo una regulación post-transcripcional, ya que se ha visto que hay transcritos con diferente splicing, de modo que hay diferentes segmentos 5' y 3' UTR, y se cree que los cambios en 5' UTR pueden producir que los transcritos sean dirigidos a distintos compartimentos celulares, y que el proceso de translación de mRNA dendrítico puede estar favorecido por la actividad sináptica. Finalmente se produce un procesamiento post-traduccional. Inicialmente, BDNF es sintetizado en el retículo endoplasmático en forma de pre-pro-BDNF, que es convertido inicialmente en pro-BDNF y finalmente en BDNF mediante la eliminación del dominio N-terminal. Es importante que la cantidad de pro-BDNF esté regulada, ya que se une a p75<sup>NTR</sup> en lugar de a TrkB, produciendo un aumento en los niveles de apoptosis (Greenberg et al., 2009; Skaper, 2012).

BDNF es un importante regulador de la transmisión sináptica y de la plasticidad en individuos adultos mediante su unión a TrkB, lo que concuerda con su localización en las sinapsis glutamatérgicas, y se conoce que BDNF y TrkB son el único sistema de neurotrofinas que se encuentran distribuidas en todas las subregiones del hipocampo y el prosencéfalo (Lessmann et al., 2003). Diversos estudios sugieren que BDNF puede tener una importante función en el proceso de LTP dependiente de síntesis proteica (consolidación sináptica, durante la fase de LTP tardía), demostrando así su importancia en la formación de recuerdos a largo plazo y por tanto en el proceso de memoria. El efecto del sistema BDNF-TrkB sobre la memoria ha sido demostrado en diversos estudios (Koponen et al., 2004), que también sugieren que estos efectos son producidos mediante la activación de PLC $\gamma$  y la consecuente fosforilación y activación de CaMKIV y CREB (Minichiello et al., 2002).

Como la mayor parte de las proteínas relacionadas con la integridad sináptica, la expresión de BDNF se ve reducida durante el envejecimiento, del mismo modo que la de TrkB (Berchtold et al., 2013). Además, parece ser que la disminución de TrkB afecta a otras áreas cerebrales como la hipófisis, y tiene importancia en el locus cerúleo, siendo así importante para mantener la inervación noradrenérgica en el cerebro envejecido (Budni et al., 2015).

Como se ha comentado en el apartado anterior, parece que la inflamación puede tener importancia en la regulación de BDNF, ya que la activación sostenida de NF- $\kappa$ B produce disminuciones en los niveles de BDNF. Además, BDNF también es capaz de promover la supervivencia neuronal, entre otros mecanismos, por la activación de Bcl-2, y se ha

observado que la disminución de BDNF debida a la activación de NF- $\kappa$ B produce también una disminución en los niveles de Bcl-2 (Maqbool et al., 2013). Actualmente se conoce que BDNF es una diana para NF- $\kappa$ B en astrocitos, donde aumenta su expresión (Saha et al., 2006), pero es posible que los efectos en neuronas sean opuestos, como ocurre en otros genes como los relacionados con la hipoxia (ver discusión en Maqbool et al., 2013). Aun así, se conoce que en individuos adultos, cuando se estimula el receptor NMDA se produce la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, que se une al promotor 3 del gen *bdnf* y promueve su transcripción, produciendo así un efecto neuroprotector, que se une a la larga lista de efectos que puede realizar NF- $\kappa$ B dependiendo de la señal extracelular que induce su actividad, de modo que el efecto de NF- $\kappa$ B puede ser muy variable (Marini et al., 2004).

## RBAP46/48

RbAp46/48 son unas proteínas con capacidad de unión a histonas, de unos 50 kDa y que fueron inicialmente descubiertas por su capacidad de unirse al supresor de tumores Rb (Qian et al., 1993). Actualmente se conoce que estas proteínas son parte del complejo NuRD, un complejo formado por diferentes proteínas capaces de interaccionar con la cromatina y las histonas (ver Fig. 1). El complejo NuRD tiene diversas funciones, entre ellas impedir el crecimiento de tumores, y además produce una represión general de la transcripción, ya que es uno de los principales mecanismos deacetiladores en mamíferos (ver revisión de Torchy et al., 2015).

RbAp46 se asocia con la histona acetiltransferasa 1 (HAT1), implicada en la acetilación de novo de la histona H4, mientras que RbAp48 se encuentra unida a CAF-1 y es una chaperona esencial para la deposición de las histonas H3-H4 en el ADN recién replicado (Torchy et al., 2015). Ambas proteínas son capaces de formar un complejo con actividad deacetilasa con HDAC1 y HDAC2, afectando así también a la transcripción global, y a la transcripción de proteínas concretas como Rb (Alqarni et al., 2014).

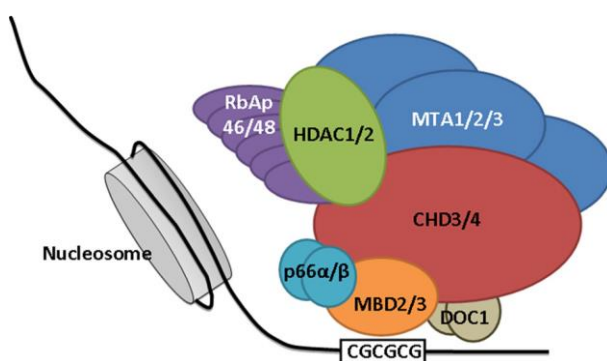


Figura 1 - Complejo NuRD. Imagen extraída de Torchy et al., 2015.

En los últimos años se ha descrito un posible mecanismo de RbAp en el deterioro cognitivo, ya que se ha encontrado una disminución de RbAp48 en el hipocampo en animales envejecidos. En este mismo estudio se observó que la inhibición de RbAp48 en el cerebro producía déficits en la memoria relacionada con el hipocampo similares a los que ocurren durante el proceso de envejecimiento. Esta inhibición producía además una disminución en la acetilación de las histonas H4 y H2B, y se cree que es debido a

la menor actividad de CBP (CREB-Binding Protein), ya que CBP posee actividad acetiltransferasa en las histonas H4 y H2B y se encuentra afectada por RbAp mediante la vía cAMP-PKA-CREB1, de modo que la disminución de su actividad es la causa de este aumento en los niveles de acetilación aparentemente opuesto a la función original de RbAp. Además, en este mismo estudio también se descubrió que un incremento en los niveles de RbAp48 en el giro dentado reducía el deterioro cognitivo asociado a la edad. De este modo, se cree que RbAp48, posiblemente afectando a la vía PKA-CREB1-CBP, es fundamental para el funcionamiento del hipocampo, y que la disminución en sus niveles asociada a la edad puede ser una de las causas del mal funcionamiento de esta área del cerebro en el envejecimiento (Pavlopoulos et al., 2013).

## ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

El enriquecimiento ambiental (EA) se basa en la adición de estímulos a los animales estabulados, como puede ser el uso de jaulas de mayor tamaño donde hay un mayor número de individuos y por tanto mayor interacción social, el uso de objetos novedosos (juguetes u otros objetos) para estimular la exploración y cognición, o el uso de ruedas para permitir el ejercicio físico. El enriquecimiento puede ser puntual, es decir los animales están estabulados en condiciones estándar y durante un cierto tiempo, de manera periódica, son trasladados a una jaula enriquecida, o puede ser continuo, de modo que los animales están continuamente expuestos a los estímulos del enriquecimiento.

Los primeros estudios con EA datan de las décadas de 1960 y 1970, donde se descubrieron los efectos del EA sobre el cerebro de los roedores analizados, encontrándose mejoras en memoria y aprendizaje, con remodelaciones en el neocórtex e hipocampo. Además, en estos primeros estudios también se encontraron cambios a nivel bioquímico, tales como aumentos en el factor neurotrófico NGF en ratas y ratones enriquecidos desde los 50 días de vida (ver revisión de Frick y Benoit, 2010). En otros estudios se encontró que ratas y ratones jóvenes-adultos sometidos a EA presentaban mejoras significativas en memoria espacial, además de diferencias en LTP y neurogénesis a nivel del hipocampo (Nilsson et al., 1999; Cummins et al., 1973; Green et al., 1983; Kempermann et al., 1997; Pham et al., 1999).

Se ha estudiado el efecto del EA sobre el envejecimiento, buscando los efectos de introducir el enriquecimiento en diferentes edades (ver Tabla 1), y se ha descubierto que el EA iniciado en el destete produce cambios en la ramificación dendrítica, peso y niveles de neurotrofinas en el neocórtex, y en neurogénesis, número de vesículas sinápticas y neurotrofinas en el hipocampo (Duffy et al., 2001). Pese a que la mayoría de estudios se centran en los efectos del EA a partir de edades tempranas, existen estudios que demuestran que aplicar EA en ratas de edad más avanzada produce también efectos beneficiosos que pueden contrarrestar los efectos negativos del envejecimiento, ya que se han encontrado mejoras en neurogénesis (EA a partir de los 6 meses) (Kempermann et al., 1998), en el número de dendritas en el córtex (EA a partir de los 15 meses) (Green et al., 1983), y en memoria espacial (EA a partir de los 18 meses) (Frick et al., 2003). Un estudio reciente de Stein (2016) demuestra mejoras en LTP en ratas que fueron expuestas a EA durante 3 semanas a los 21 meses de edad, aunque no encontró

aumentos en BDNF, que sí que se han encontrado en otros estudios (Young et al., 1999, Ickes et al., 2000). Sí que encuentra diferencias en BDNF Neidl (2016) en un estudio realizado con ratas expuestas a EA desde los 18 hasta los 24 meses, donde también encuentra mejoras en memoria espacial y neurogénesis, además de un aumento en el ratio de acetilación de NF- $\kappa$ B, pese a que no encuentra diferencias en los niveles generales de NF- $\kappa$ B entre las ratas sometidas a EA y las ratas del grupo control.

Aun así, se puede observar que existe una importante falta de estudios que busquen las diferencias producidas por iniciar el EA en diferentes edades, objetivo abordado en este trabajo. Es importante remarcar que el EA no es un protocolo estandarizado, sino que cada laboratorio tiene protocolos ligeramente diferentes, lo cual puede producir diferencias en sus efectos (ver ejemplos de EA y resultados de estos estudios en Tabla 1).

## OBJETIVOS

Existen una multitud de trabajos que utilizan EA en ratas de distintas edades, pero no existen trabajos que comparen los efectos de iniciar el EA en distintas edades. Además, existen diversas proteínas que, por sus funciones y su modulación, se cree que pueden estar modificadas en el EA como es el caso del NF- $\kappa$ B, pero esto no ha sido comprobado. Por todo ello, en este trabajo nuestros objetivos fueron:

- Identificar si existe una edad límite a partir de la cual el EA deja de producir mejoras en las ratas, y como la duración y edad de las ratas en el momento de inicio del EA afecta a los beneficios producidos por éste.
- Comprobar que el EA produce mejorías en la memoria espacial durante el envejecimiento.
- Comprobar si existen variaciones en los niveles de Sirt1 entre ratas jóvenes y viejas, y si estos niveles se encuentran afectados por el EA. Además también se buscará si existen diferencias en los niveles de NF- $\kappa$ B y sus índices de acetilación, y si alguno de estos valores se encuentra afectado por el EA.
- Comprobar si el EA produce efectos en ciertas proteínas que se encuentran modificadas durante el envejecimiento, como son RbAp y BDNF.



Autor	Año	Animales	Tiempo de inicio (meses)	Duración	Tipo de EA	Resultados
Cummins	1973	Ratas	1	17 meses	Estabuladas en grupo de 5 Objetos cambiados diariamente Grupo control en aislamiento	Aumento del peso cerebral Mejoras en memoria espacial
Duffy	2001	Ratones	1	2 meses	Estabulados en grupos Jaula de gran tamaño con enriquecimiento espacial (túneles, etc.) Grupo control en jaula idéntico sin enriquecimiento espacial	Mejoras en LTP Mejoras en memoria relacionada con el hipocampo
Kempermann	1997	Ratones	1	40 días	Estabulados en grupo de 13 Rueda para correr Comida variable Diversos objetos	Aumento en neurogénesis y volumen del giro dentado Mejoras en memoria espacial
Young	1999	Ratas	1	21 días	Estabuladas en grupo de 6 Rueda para correr Diversos objetos Comida variable Grupo control en aislamiento	Aumento en BDNF Reducción en apoptosis en el hipocampo
Pham	1999	Ratas	2	12 meses	Estabuladas en grupo de 8 Objetos cambiados 2 veces por semana Grupo control en aislamiento	Aumento NGF en hipocampo Mejoras en memoria espacial
Ickes	2000	Ratas	2	12 meses	Estabuladas en grupo de 6 Objetos cambiados 2 veces por semana Grupo control en aislamiento	Aumentos en BDNF, NGF y NT-3
Leal-Galicia	2008	Ratas	3	18 meses	Estabuladas en grupos de 5 Jaula con diversos objetos cambiados en cada sesión Rueda para correr Exposición de 3 h una vez por semana	Aumento en neurogénesis Aumento en niveles de sinaptofisina Mejoras en memoria relacionada con el hipocampo
Van Praag	1999	Ratones	3	13-43 días	Rueda para correr	Aumento en neurogénesis
Van Praag	1999	Ratones	3	13-43 días	Realización de Morris Water Maze	Sin efectos
Van Praag	1999	Ratones	3	13-43 días	Estabulados en grupo de 14 Diversos objetos	Aumento en neurogénesis
Kempermann	1998	Ratones	6	2 meses	Estabulados en grupo de 13 Rueda para correr Comida variable Diversos objetos	Aumento en neurogénesis Mejoras en memoria espacial
Green	1983	Ratas	15	45 días	Estabuladas en grupo de 8 Objetos cambiados diariamente Exposición de 30-60' diarios	Aumento en nº de dendritas en córtex
Frick	2003	Ratones	18	25-29 días	Estabulados en grupos Rueda para correr Objetos cambiados diariamente	Mejoras en memoria espacial
Neidl	2016	Ratas	18	6 meses	Estabuladas en grupos de 10-12 Objetos cambiados 5 veces por semana	Aumento en neurogénesis Aumento en densidad sináptica Aumento en niveles de sinaptofisina Aumento actividad HAT Aumento en BDNF Aumento NF-kB acetilado durante entrenamiento espacial Mejoras en memoria espacial
Stein	2016	Ratas	21	21 días	Estabuladas individualmente Movidas en grupos de 3 diariamente a una caja de mayor tamaño con diversos objetos	Mejoras en LTP Sin aumento en BDNF

Tabla 1 – Estudios de EA en roedores: Tipo de animal, protocolo utilizado y resultados obtenidos



## MATERIALES Y MÉTODOS

### PROTOCOLO DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL Y ANIMALES UTILIZADOS

Los animales fueron separados en todos los casos en dos grupos de igual número tras la realización de pruebas comportamentales, con el objetivo de que el grupo control y el grupo expuesto a EA no presentasen diferencias entre ellos y que por tanto las diferencias que se puedan ver a partir del momento de inicio del EA sean debidas al EA y no debido a diferencias basales entre los animales.

Se llevaron a cabo tres protocolos idénticos de enriquecimiento ambiental, con la diferencia de que fueron iniciados en edades distintas: 1 mes (ratas jóvenes), 7 meses (ratas adultas) y 18 meses (ratas viejas). Los protocolos se realizaron utilizando objetos de distintos tamaños, colores, formas y materiales (ver Fig. 2) con los que podían interactuar las ratas, entre los que se encuentran:

- Objetos de plástico → Aros, pelotas y cubos, de distintos colores
- Objetos de papel y cartón → Cajas y tubos de diferentes tamaños y hojas de papel de periódico
- Objetos de otros materiales → Tacos de madera y cuerdas de diferentes grosores, que se colocaban tanto en el suelo como en la tapa de las jaulas.

Los objetos se cambiaban periódicamente, y en cada ocasión se colocaban un mínimo de 3 objetos diferentes, cada uno de distinto material. La elección de objetos fue pseudoaleatoria, de modo que los objetos eran escogidos al azar, pero sin ser repetidos de manera consecutiva y, si era posible, en distintas combinaciones en cada sesión. Los objetos colocados eran siempre los mismos para todas las ratas, de modo que la variabilidad en el enriquecimiento entre las diferentes ratas fuese la mínima.

Además, se utilizaron aromas (manzana, cereza, vainilla y melocotón) para potenciar el enriquecimiento, mediante el uso de 3-4 gotas en bolas de papel que se colocaban dentro de la jaula una vez por semana. Puntualmente también se suministraron pequeñas cantidades de comida envueltas en papel o dentro de cajas o tubos para incentivar la búsqueda dentro de la caja.

Los cambios en los objetos se realizaron siempre entre las 09:00 – 10:00 h de la mañana.

En cada uno de los grupos, el tratamiento se mantuvo hasta los 20 meses de edad, momento en el cual se procedió al sacrificio por decapitación de los animales de ambos grupos.

Las ratas estuvieron en el estabulario en condiciones estándar (temperatura estable en  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad 60%, ciclo día-noche 12-12 (hora de encendido de luces a las 09:00 h) con acceso libre a dieta estándar (Panlab A04) y agua) desde el momento del nacimiento hasta la edad en la cual empezaba el tratamiento de enriquecimiento ambiental.

Todos los animales realizaron diferentes pruebas comportamentales de manera

periódica a partir del momento de inicio del enriquecimiento ambiental. Las pruebas comportamentales realizadas fueron el test de Rota-Rod, el test Radial Maze, el test de reconocimiento de objetos y el test de Barnes (únicos resultados analizados en este trabajo).



*Figura 2* - Jaulas utilizadas para el enriquecimiento ambiental. Diversos objetos fueron colocados en las jaulas, siendo estos objetos cambiados periódicamente. Los objetos utilizados eran de colores, formas y materiales diferentes (cuerda, plástico y cartón). Además, algunos objetos fueron colocados colgados del techo de la jaula para aumentar la estimulación.

---

#### ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL A PARTIR DE 1 MES DE EDAD

Se utilizaron ratas macho *Wistar* (1 mes al inicio del tratamiento, peso medio de  $100 \pm 5$  g,  $n=18$ , 2 animales por jaula). Los animales del grupo control ( $n=9$ ) se mantuvieron en las condiciones estándar durante todo el proceso.

En el grupo sometido a EA ( $n=9$ ), los objetos fueron cambiados semanalmente para mantener la novedad y motivar la continua exploración de los animales, estableciendo un calendario donde se marcaban los objetos utilizados cada semana para no repetirlos.

Se realizaron pruebas comportamentales periódicamente desde el momento de inicio del enriquecimiento ambiental para conocer los posibles efectos en las capacidades cognitivas y motoras durante el proceso de envejecimiento, y como se veía este proceso afectado por el enriquecimiento ambiental. En este grupo, las pruebas comportamentales se realizaron a los 3, 7, 10, 13, 16 y 20 meses.

El tratamiento se mantuvo hasta los 20 meses de edad, momento en el cual se procedió al sacrificio por decapitación de los animales de ambos grupos.

Durante el trabajo este grupo será siempre referido como EA1-20.

---

#### ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL A PARTIR DE 7 MESES DE EDAD

Se utilizaron ratas macho *Sprague Dawley* (7 meses al inicio del tratamiento, peso medio de  $510 \pm 10$  g,  $n=16$ , 2 animales por jaula). Los animales del grupo control ( $n=8$ ) se mantuvieron en las condiciones estándar.

En el grupo sometido a EA (n=8) se llevó a cabo un procedimiento similar al del grupo anterior, aunque los objetos fueron cambiados dos veces por semana (lunes y jueves) para aumentar el grado de motivación de los animales. Igual que en el grupo del apartado anterior, se estableció un calendario donde se marcaban los objetos utilizados cada semana para no repetirlos.

Se realizaron pruebas comportamentales periódicamente desde el momento de inicio del enriquecimiento ambiental para conocer los posibles efectos en las capacidades cognitivas y motoras durante el proceso de envejecimiento, y como se veía este proceso afectado por el enriquecimiento ambiental. En este grupo, las pruebas comportamentales se realizaron a los 7, 10, 13, 16 y 20 meses.

El tratamiento se mantuvo hasta los 20 meses de edad, momento en el cual se procedió al sacrificio por decapitación de los animales de ambos grupos.

Durante el trabajo este grupo será siempre referido como EA7-20.

---

#### ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL A PARTIR DE 18 MESES DE EDAD

Se utilizaron ratas macho *Wistar* (18 meses al inicio del tratamiento, peso medio de 570 ± 10 g, n=13, 2 animales por jaula). Los animales del grupo control (n=6) se mantuvieron en las condiciones estándar.

En el grupo sometido a EA (n=7) se llevó a cabo un procedimiento similar al de los dos grupos anteriores, aunque los objetos fueron cambiados tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) para aumentar aún más el grado de motivación de los animales. Igual que en el grupo del apartado anterior, se estableció un calendario donde se marcaban los objetos utilizados cada semana para no repetirlos.

Se realizaron pruebas comportamentales periódicamente desde el momento de inicio del enriquecimiento ambiental para conocer los posibles efectos en las capacidades cognitivas y motoras durante el proceso de envejecimiento, y como se veía este proceso afectado por el enriquecimiento ambiental. En este caso, las pruebas comportamentales únicamente se realizaron a los 18 y a los 20 meses.

El tratamiento se mantuvo hasta los 20 meses de edad, momento en el cual se procedió al sacrificio por decapitación de los animales de ambos grupos.

Durante el trabajo este grupo será siempre referido como EA18-20.

#### TEST DE BARNES

El test de Barnes es una prueba ampliamente utilizada en investigación para valorar la memoria y el aprendizaje viso-espacial (Barnes, 1979).

El laberinto de Barnes consiste de una tabla circular de madera, de 130 cm de diámetro, que se encuentra apoyada sobre un soporte metálico, a una altura de 75 cm del suelo. Esta tabla contiene 18 agujeros de 10 cm de diámetro, situados a 3 cm del perímetro de la tabla, y que se encuentran separados 10 cm entre ellos. Uno de estos agujeros está unido a una caja de plástico de 20x10 cm en la cual la rata puede introducirse, y que se considera el objetivo o *target* del test. El laberinto está situado en una sala que contiene

una serie de señales visuales (incluyendo el experimentador, que siempre es el mismo y está situado en el mismo lugar) que la rata puede utilizar para orientarse y encontrar el *target* (Fig. 3). Durante el transcurso de la prueba, el animal es colocado en el centro de la tabla y recibe una luz intensa (500 kW), produciendo así miedo al animal que busca un lugar donde esconderse, de modo que, una vez localizado, se introduce en el *target* para refugiarse.



Figura 3: Tabla utilizada para el test de Barnes, de 130 cm de diámetro, con 18 agujeros de 10 cm de diámetro. En la pared se encuentran diversas señales que sirven como pistas visuales para la rata y que no son nunca modificadas entre entrenamientos y test.

El test de Barnes se debe realizar en 3 fases, que son las de familiarización, entrenamiento y test.

1. Familiarización: Esta fase debe realizarse el día anterior de la prueba. Las luces se encuentran inicialmente apagadas, y el animal se encuentra dentro de un cilindro de cartón durante 10 segundos. Una vez ha transcurrido este tiempo, se quita el cilindro de cartón y se encienden las luces. Posteriormente se deja al animal explorar libremente el laberinto, hasta el momento en el que encuentre el *target* y se introduzca en su interior. En caso de que a los 3 minutos no haya encontrado el *target*, el experimentador colocará a la rata en el interior del *target*. En cualquier caso, se mantendrá a la rata durante 1 minuto en su interior con las luces apagadas.
2. Entrenamiento: Se sigue la misma metodología que para la familiarización. En este caso, los entrenamientos se llevan a cabo el mismo día que el test, y se realizan 3 entrenamientos con 10 minutos de espera entre cada uno de ellos.
3. Test: Se sigue la misma metodología utilizada anteriormente, con la única

diferencia de que el tiempo máximo para encontrar el *target* es de 90 segundos, y a partir de ese momento se considera que no lo ha encontrado y se anota un resultado de 90 segundos como latencia.

Al final de la prueba y de cada uno de los entrenamientos se anota el tiempo que ha tardado la rata en encontrar el *target* (latencia, y en caso de que no entre inicialmente en el *target* una vez se ha aproximado a él, denominamos el tiempo en el que encuentra el agujero latencia primaria y el tiempo que tarda en entrar latencia secundaria), el número de agujeros visitados antes del *target* (número de errores, que también se pueden separar en primarios y secundarios si el animal no entra directamente en el *target*). Además, también se anota la estrategia seguida, que puede ser de 3 tipos:

- ✚ Directa – el animal se dirige directamente al *target*, o a uno de los agujeros contiguos a este
- ✚ Seriada – el animal se dirige inicialmente a un agujero y va buscando en todos los agujeros por orden hasta llegar al *target*
- ✚ Aleatoria o mixta – el animal se dirige hacia agujeros aparentemente aleatorios sin seguir un orden fijo

## SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los animales fueron sacrificados por decapitación a los 20 meses de edad y el cerebro fue extraído. El cerebro entero fue diseccionado justo después del sacrificio, siendo las distintas partes congeladas en nitrógeno líquido y finalmente almacenadas a -80°C hasta el momento en el que se realizó la homogenización del tejido. Para este trabajo se utilizó únicamente un lado del hipocampo, que fue seleccionado al azar en cada individuo. La otra mitad fue almacenada a -80°C y utilizada para otros estudios no relacionados con el presentado a continuación.

## HOMOGENIZACIÓN DEL TEJIDO

Únicamente las muestras de hipocampo (y algunas muestras de corteza cerebral) fueron pesadas y homogenadas mediante el uso de un homogenizador de espas Ultraturax, en dos ciclos de 10 segundos al 80% de velocidad, en buffer frío en una proporción 1:15 (peso de tejido:volumen de buffer) de Tris-HCl pH 6.8, 50 mM, con 2% de SDS, 1 mM EDTA y con varios inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma P8340). Posteriormente las muestras fueron sometidas a sonicación por pulsos (dos ciclos de aproximadamente 10 segundos). Se obtuvieron 50 µL del homogenado para realizar la cuantificación de proteínas, que fue realizada mediante un kit comercial (BCA Protein Assay, Pierce, IL). Una vez conocida la concentración proteica, las alícuotas fueron diluidas con tampón de homogenización con el objetivo de obtener una concentración proteica de 6 µg/µL, excepto en las muestras del grupo EA18-20 (tanto en los controles como en las ratas que habían estado expuestas al enriquecimiento), donde la concentración fue de 5 µg/µL. Las alícuotas de homogenado fueron mezcladas con una cantidad equivalente de buffer de carga de electroforesis (tampón de carga Laemmli, pH 6.8, 50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 2.5% 2-mercaptoetanol, 0.1% azul de bromofenol), hervidas y almacenadas a 20°C hasta su uso (ver García-Fuster et al.,



2007).

## WESTERN-BLOT

La técnica de Western-Blot (WB) es una de las técnicas más utilizadas para identificar y cuantificar proteínas mediante el uso de anticuerpos. En este estudio, esta técnica se ha utilizado para cuantificar las proteínas NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B acetilado, Sirt1, BDNF y  $\beta$ -actina.

La metodología de WB sigue una serie de pasos claramente diferenciados. Inicialmente se realiza una separación de las proteínas de la muestra mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida. Posteriormente, se realiza una transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa, donde, tras una serie de pasos, se unirán los anticuerpos correspondientes a la proteína estudiada, y finalmente se llevará a cabo el revelado y cuantificación.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). El gel, de un tamaño de 7x10 cm y 1 mm de espesor, estaba formado por dos zonas distintas, una zona, de bajo tamaño (aproximadamente 1 cm) que era el gen concentrador de la muestra (*stacking gel*), compuesto por un 4% de acrilamida/bisacrilamida, pH 6.8, 166 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, 0.2% persulfato amónico y 0.08% TEMED, y una zona de mayor tamaño que formaba el resto del gel, denominada gel de resolución o separación de las proteínas (*running o resolving gel*), formado por un 10% de acrilamida/bisacrilamida, pH 8.8, 0.75 M Tris-HCl, 0.1% SDS, 0.05% persulfato amónico y 0.05% TEMED. Posteriormente a la polimerización del *running gel*, pero antes de la polimerización del *stacking gel*, se introdujeron en este último unas pintas de teflón que formaban los 15 pocillos.

En cada uno de los pocillos se cargaron 40  $\mu$ g de proteína, que había sido previamente cuantificada en cada alicuota y estandarizada a idéntica concentración en todas ellas, de modo que los 40  $\mu$ g correspondían a 13.5  $\mu$ L de muestra por pocillo, excepto en las ratas del grupo de EA18-20, de las que se cargaron 16  $\mu$ L debido a la menor concentración de proteína. En el primer pocillo se cargaron 3  $\mu$ L de marcador de peso molecular, y se utilizaron los marcadores *Prestained SDS-PAGE Standard-Broad-Range* (Bio-Rad) (8 proteínas, pesos entre 10-200 kDa) y *Dual Color Standards* (Bio-Rad) (10 proteínas, pesos entre 10-250 kDa, 2 bandas rosadas en 25 y 75 kDa). Además, en el segundo y en el último pocillo se cargaron muestras de corteza cerebral para impedir la deriva de las proteínas que ocurre puntualmente en estos pocillos. El orden de carga en los geles fue siempre el mismo para cada grupo (ver Fig. 4).

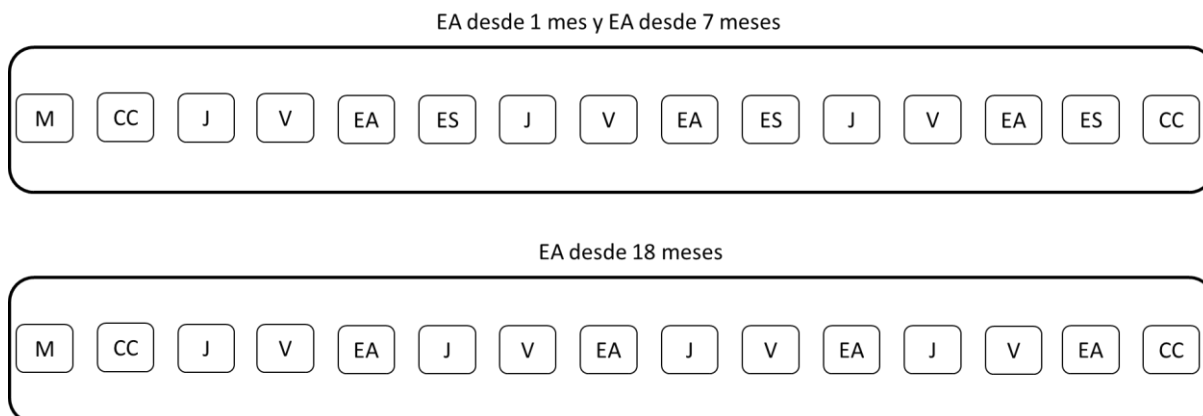


Figura 4 – Orden de carga de los pocillos en la electroforesis realizada en el Western-Blot. El orden de los pocillos difiere entre los grupos de 1 y 7 meses con el de 18 meses, ya que en los primeros grupos también se realizaban pruebas a ratas sometidas a estrés (datos no incluidos). M – marcador de peso molecular; CC – corteza cerebral, no cuantificada; J – Jovenes (3 meses); V – Viejas (20 meses); EA – Viejas sometidas a enriquecimiento ambiental (18 meses); ES – Viejas sometidas a estrés (20 meses)

En el siguiente paso se sometió al gel a una corriente continua de 80 V (utilizando una fuente de alimentación PowerPac HC High-Current, BioRad) (Fig. 5) durante unos 20-30 minutos, tiempo durante el cual las proteínas alcanzaban el *running gel*, y a partir de ese momento se aumentaba la corriente a 120 V durante un tiempo de aproximadamente 90 minutos, aunque el tiempo requerido podía variar según el peso de la proteína a cuantificar. Este proceso se llevó a cabo en una cubeta (Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad) (Fig. 5) conteniendo tampón de electroforesis pH 8.5-8.6, 25 mM Tris, 0.2 M glicina, 0.1% SDS.

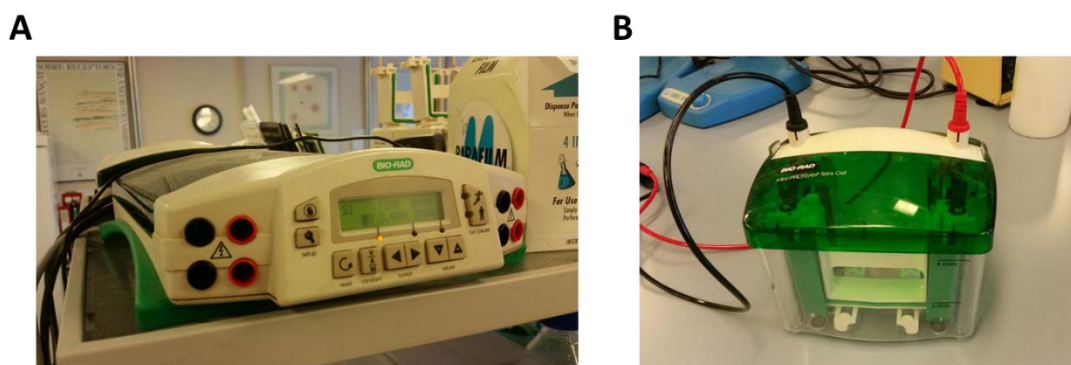


Figura 5 – A: Fuente de alimentación Powerpac HC High-Current, BioRad. B: Cubeta Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad.

Posteriormente las proteínas eran transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (GE Healthcare Life Sciences, Alemania), excepto cuando se cuantificaba BDNF, que se utilizaba un diámetro de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  (Schleicher & Schuell, Alemania) debido al bajo peso molecular de esta proteína. Para llevar a cabo este paso se situaba el *running gel* (tras ser descartado el *stacking gel*) frente a la membrana, envueltos por 2 papeles de filtro (3MM Whatman) y una esponja compresora en cada uno de los lados, sujetado por un armazón de plástico (casete de transferencia). Este proceso se llevaba a cabo en una cubeta conteniendo tampón de transferencia (pH 8.4, 25 mM Tris-HCl, 60 mM Glicina, 20% metanol) en constante agitación, con una barra de hielo incorporada dentro de la cubeta para mantener baja la temperatura

durante el proceso. Además, esta cubeta estaba colocada dentro de una cubeta de mayor tamaño llena de hielo para mantener baja la temperatura del proceso. Una vez realizados estos pasos, se proporcionaba corriente continua perpendicular al plano de la membrana a 110 V durante un tiempo aproximado de dos horas y media, comprobando constantemente que la temperatura de la cubeta fuese de aproximadamente 4°C.

Una vez finalizado el proceso, las proteínas eran identificadas mediante anticuerpos gracias a la técnica de *immunoblotting*, que se basa en la unión de anticuerpos a sus antígenos, que en este caso son las proteínas estudiadas. Los anticuerpos utilizados tienen la capacidad de reconocer ciertas zonas de estas proteínas que se denominan epítomos, y se unen a estas zonas mediante interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas o atracciones hidrofóbicas). La unión de los anticuerpos a la proteína solo se puede realizar en la membrana, motivo por el cual se realiza la transferencia del gel a la membrana.

Tras el proceso de transferencia la membrana era obtenida del armazón del casete y lavada con un tampón de TBS-Tween (pH 7.6, 1% TBS, 0.1% Tween-20). Una vez realizados tres lavados, las membranas eran incubadas durante una hora con una solución bloqueadora (10% leche en polvo en tampón TBS-Tween) para evitar la unión inespecífica del anticuerpo a la membrana, incrementando la probabilidad de unión a su antígeno. Tras tres nuevos lavados con TBS-Tween, las membranas eran incubadas durante toda la noche a 4°C con la solución de anticuerpo primario. La lista de anticuerpos primarios utilizados y las concentraciones utilizadas se encuentra al final de este apartado.

El día siguiente se realizaban tres lavados con tampón TBS-Tween, y las membranas se incubaban durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario a concentración 1:5000 en tampón TBS-Tween. La lista de anticuerpos secundarios utilizados se encuentra al final de este apartado. Tras este periodo se realizaban tres nuevos lavados con TBS-Tween. Los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados con la enzima de peroxidasa de rábano que sirve como sistema de detección, ya que produce una señal cuantificable y proporcional a la cantidad de antígeno, y por tanto de proteína, al interaccionar con un sustrato específico.

La inmunoreactividad era detectada mediante un sistema de electroquimioluminiscencia amplificada (ECL, Amersham), basado en unos reactivos de revelado compuestos de luminol (diacilhidracida cíclica) y ácido cumárico, en los cuales se incuban las membranas (Solución 1: pH 8.5, 2.5 mM luminol, 0.4 mM ácido p-cumárico, 0.1M Tris-HCl; Solución 2: pH 8.5, 0.1M Tris-HCl, 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Antes del revelado se incubaban las membranas durante 2 minutos en una solución 1:1 de ambos compuestos, manteniendo las cubetas en agitación constante manual. La función del luminol es actuar como sustrato de la peroxidasa de rábano, que cataliza la oxidación del luminol cuando está en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pasando a un compuesto intermedio, inestable, pero que emite luz durante un tiempo determinado, aunque la intensidad de la luz se va perdiendo con el tiempo (máximo entre los primeros 5-20 minutos, semivida de emisión de unos 60 minutos). Durante el revelado se utilizaba un agente fenólico de amplificación, permitiendo la amplificación de la señal producida por la oxidación del



luminol. Al poner en contacto la membrana de nitrocelulosa, que contiene la peroxidasa de rábano conjugada al anticuerpo secundario, y que ha sido incubada con ECL, con una película fotográfica sensible a la luz azul (Hyperfilm-ECL, Amersham) durante un periodo de tiempo, se puede detectar la luz emitida, ya que queda marcada en la película. El tiempo de exposición de la película a la membrana es variable dependiendo de la cantidad de proteína presente en la muestra, ya que algunos anticuerpos como el de la  $\beta$ -actina requieren cortos tiempos de exposición, mientras que otros, como el del BDNF, requieren mayores tiempos.

Tras el revelado, las películas muestran un patrón de bandas específico para cada anticuerpo, de un tamaño equivalente a la cantidad de proteína presente en la muestra. Las bandas se cuantificaron con el escáner BioRad GS800 utilizando el programa *Quantity One* (BioRad). Todos los resultados fueron normalizados a partir del ratio proteína/ $\beta$ -actina del grupo control joven en cada uno de los geles con el objetivo de minimizar las diferencias entre diferentes revelados y posibilitar la comparación de resultados de revelados diferentes.

La lista de anticuerpos primarios utilizados fue la siguiente

- Anti-NF- $\kappa$ B (p65): Obtenido de Santa Cruz Biotechnology (CA, EEUU); sc-372; lote #f0514; concentración 1:1000 (en TBS-Tween). Anticuerpo policlonal de conejo, utilizado para la detección de p65 en ratón, rata y humano, reconoce el extremo C-terminal de la proteína.
- Anti-NF- $\kappa$ B acetilado: Obtenido de Abcam (MA, EEUU) ab19870; lote GR37530-3; concentración 1:600 (en TBS-Tween). Anticuerpo policlonal de conejo, utilizado para la detección de p65 acetilado en la serina 310 en ratón rata y humano, reconoce la acetilación de la serina 310.
- Anti-Sirt1: Obtenido de EMD Millipore (MA, EEUU); 07-131; lote #2428631; concentración 1:1000 (en leche 10%). Anticuerpo policlonal de conejo, utilizado para la detección de Sirt1 en ratón, rata y humano, reconoce los aminoácidos 1-131.
- Anti-BDNF: Obtenido de Santa Cruz Biotechnology (CA, EEUU); sc-546; lote #k0515; concentración 1:2500 (en TBS-Tween). Anticuerpo policlonal de conejo, utilizado para la detección de BDNF maduro en rata, ratón y humano, reconoce un epítipo en una región interna de BDNF.
- Anti-RbAp46/48: Obtenido de Cell Signaling (MA, EEUU); #4633S; concentración 1:1000 (en leche 10%). Anticuerpo policlonal de conejo, utilizado para la detección de RBAP46 y RBAP48 en rata, ratón, mono y humano, reconoce la secuencia N-terminal.
- Anti- $\beta$ -actina: Obtenido de Sigma-Aldrich (MO, EEUU); AC-15; lote #084M4770V; concentración 1:10000 (en TBS-Tween). Anticuerpo monoclonal de ratón, utilizado para la detección de  $\beta$ -actina en perro, cerdo, *Hirudo medicinalis*, gato, *Cavia porcellus*, ratón, carpa, gallina, oveja, conejo, rata, humano y bovinos, reconoce un epítipo localizado en el extremo N-terminal.

La lista de anticuerpos secundarios utilizado fue la siguiente

- Anti-rabbit: Obtenido de Cell Signaling (MA, EEUU); #7074S; concentración 1:5000 o 1:10000 (en TBS-Tween). Anticuerpo anti-IgG de conejo (cadenas

ligera y pesada), conjugado con peroxidasa de rábano. Utilizado para la detección de Anti-NF- $\kappa$ B, Anti-NF- $\kappa$ B acetilado, Anti-Sirt1, Anti-BDNF y Anti-RbAp46/48.

- Anti-mouse: Obtenido de Cell Signaling (MA, EEU); #7076S; concentración 1:5000 o 1:10000 (en TBS-Tween). Anticuerpo anti-IgG de ratón (cadenas ligera y pesada), conjugado con peroxidasa de rábano. Utilizado para la detección de Anti- $\beta$ -actina.

Las ratas jóvenes utilizadas como control joven en la comparación de proteínas mediante Western-Blot fueron ratas Sprague Dawley de 3 meses (pesos entre 250-350 gramos), que fueron mantenidas hasta los 3 meses en condiciones estándar idénticas a las del resto de grupos.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 5.0. Todos los resultados mostrados en el siguiente apartado serán indicados como promedio  $\pm$  error estándar. El nivel de significancia escogido fue siempre  $p < 0.05$ .

Para realizar el análisis estadístico de cada una de las proteínas se realiza el análisis de la varianza (ANOVA), y el test post-hoc utilizado posteriormente para encontrar las diferencias entre grupos (control joven, control viejo y EA) fue el test de Bonferroni. En el caso de NF- $\kappa$ B, se realizaron 3 test ANOVA, el primero para los niveles totales de NF- $\kappa$ B, el segundo para los niveles de NF- $\kappa$ B acetilado, y el tercero para el ratio NF- $\kappa$ B acetilado/NF- $\kappa$ B total.

Para el análisis estadístico del test de Barnes se realizó un test t-student para estudiar si existían diferencias entre las latencias y el número de errores del grupo control y el grupo sometido a EA. Para estudiar si existían diferencias en latencia y número de errores entre los entrenamientos y el test y entre los dos grupos se realizó un test ANOVA de 2 vías. Para estudiar si existían diferencias en latencia y número de errores entre las distintas repeticiones del test en el tiempo se realizó también un test ANOVA de 2 vías.

## RESULTADOS

### TEST DE BARNES

El test de Barnes fue realizado para medir la memoria espacial y la capacidad de aprendizaje de las ratas, y observar si existían cambios entre el grupo control y el grupo sometido a EA. Con este objetivo se han valorado dos parámetros, la latencia total (tiempo ocurrido hasta entrar en el *target*) y el número de errores (agujeros visitados diferentes al *target*). Los tres grupos del trabajo (EA1-20, EA7-20 y EA18-20) han sido tratados de manera independiente y comparados con sus respectivos controles. Siempre fue utilizada la latencia total y el número total de errores, sin tener en cuenta para la estadística la latencia primaria ni el número de errores primarios. Todos los resultados están representados en las Figuras 6, 7 y 8.

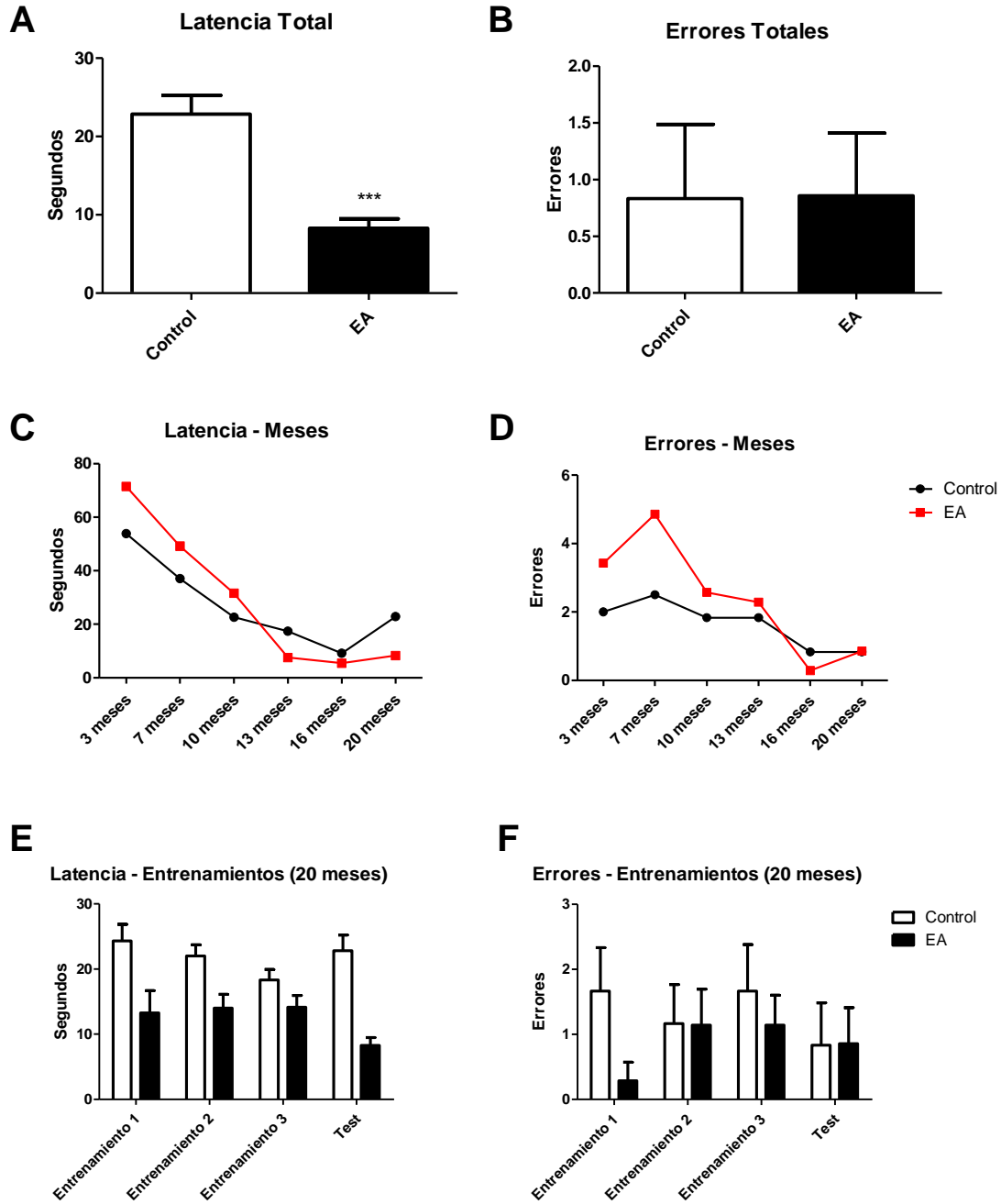
Mediante un test t-student se encontraron diferencias significativas en la latencia total, siendo significativamente menor en todos los grupos de EA que en sus respectivos controles ( $p_{1-20} < 0.001$ ;  $p_{7-20; 18-20} < 0.05$ ). Un resultado del grupo control del grupo EA7-20 fue descartado por ser un *outlier* significativo (latencia total de 43, media del grupo  $17.60 \pm 1.10$ ). No se encontraron diferencias significativas en el número de errores entre ninguno de los grupos de EA y sus respectivos controles mediante la realización de un test t-student ( $p > 0.05$ ).

Se realizó un test ANOVA de 2 vías para encontrar si había cambios en la latencia y el número de errores en los distintos momentos en los que fue realizado el test en cada uno de los grupos estudiados. Se encontraron diferencias entre los distintos meses en todos los grupos (EA1-20:  $F_{(5,66)}=12.21$ ,  $p < 0.0001$ ; EA7-20:  $F_{(4,50)}=10.32$ ,  $p < 0.0001$ ; EA18-20:  $F_{(1,22)}=8.28$ ,  $p < 0.01$ ), pero no se encontró efecto del EA en ninguno de los grupos ni interacción entre el EA y la mejora producida durante los meses ( $p > 0.05$ ). En cuanto al número de errores, el único grupo que mostró diferencias entre los distintos meses fue el grupo EA1-20 ( $F_{(5,66)}=3.21$ ,  $p < 0.05$ ) mientras que no se encontraron diferencias en el resto de grupos ( $p > 0.05$ ). En este caso tampoco se encontró efecto del EA en ninguno de los grupos ni interacción entre el EA y la mejora durante los meses ( $p > 0.05$ ). Aunque este resultado puede ser malinterpretado como una mejora de la memoria espacial en todos los grupos, incluyendo los controles, durante el envejecimiento, lo más probable es que la mejora en el test sea producida por la repetición continuada de este test (6 veces en el grupo EA1-20, 5 veces en el grupo EA7-20 y 2 veces en el grupo 18-20), de modo que las ratas ya conocían el test antes de realizarlo. El hecho de que no exista efecto del EA en este test puede ser debido a que las mejoras parecen producirse únicamente a los 20 meses.

Además, también se realizó un test ANOVA de 2 vías para encontrar si se producían las mejoras esperadas en latencia y número de errores en el test respecto a los entrenamientos. Este test fue realizado con los resultados del último test de Barnes realizado (20 meses). No se encontró un efecto de los entrenamientos ni del grupo (control o EA) en el número de errores ( $p > 0.05$ ). En cuanto a la latencia, los resultados serán comentados de manera independiente para los 3 grupos por las diferencias encontradas entre ellos. En el grupo EA1-20 no se encontró efecto de los

entrenamientos en la latencia ( $F_{(3,44)}=0.92$ ,  $p > 0.05$ ), posiblemente por el hecho de que las ratas ya conocían el test, y sus resultados en el entrenamiento ya son muy buenos para ratas de 20 meses. Sí que se encontró un efecto del grupo ( $F_{(1,44)}=36.11$ ,  $p < 0.0001$ ), de modo que las ratas sometidas a EA realizaron el test de Barnes en menor tiempo también en los entrenamientos, mostrando posiblemente un mejor aprendizaje a largo plazo que las ratas del grupo control (mayor conocimiento del test anterior al aprendizaje). En el grupo EA7-20 sí que se encontraron diferencias entre los entrenamientos y el test ( $F_{(3,40)}=4.77$ ,  $p < 0.01$ ), y además también se encontraron diferencias según el grupo ( $F_{(1,40)}=9.49$ ,  $p < 0.01$ ), obteniendo de nuevo el grupo sometido a EA mejores resultados que el grupo control. En el grupo 18-20 se encontraron diferencias significativas entre los entrenamientos y el test ( $F_{(3,44)}=7.17$ ,  $p < 0.001$ ), pero no se encontraron diferencias entre los grupos ( $F_{(1,44)}=0.013$ ,  $p > 0.05$ ), mostrando así que no había un conocimiento pre-existente del test y que las diferencias observadas en el test final se deben a aprendizaje durante los entrenamientos. En ninguno de los casos se encontró interacción entre el grupo y los entrenamientos.

## Enriquecimiento ambiental 1-20 meses



*Figura 6* – Resultados test de Barnes realizada a ratas de 20 meses del grupo control (Control) y sometidas a EA desde 1 mes de edad (EA). A: Latencia total (segundos) a los 20 meses, representada como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. B: Número total de errores a los 20 meses, representado como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. C: Latencia total (segundos) de los test realizados desde los 3 hasta los 20 meses, representada como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. D: Número total de errores de los test realizados desde los 3 hasta los 20 meses, representado como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. E: Latencia total (segundos) a los 20 meses en cada uno de los entrenamientos y en el test, representada como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. F: Número total de errores a los 20 meses en cada uno de los entrenamientos y en el test, representado como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar.

## Enriquecimiento ambiental 7-20 meses

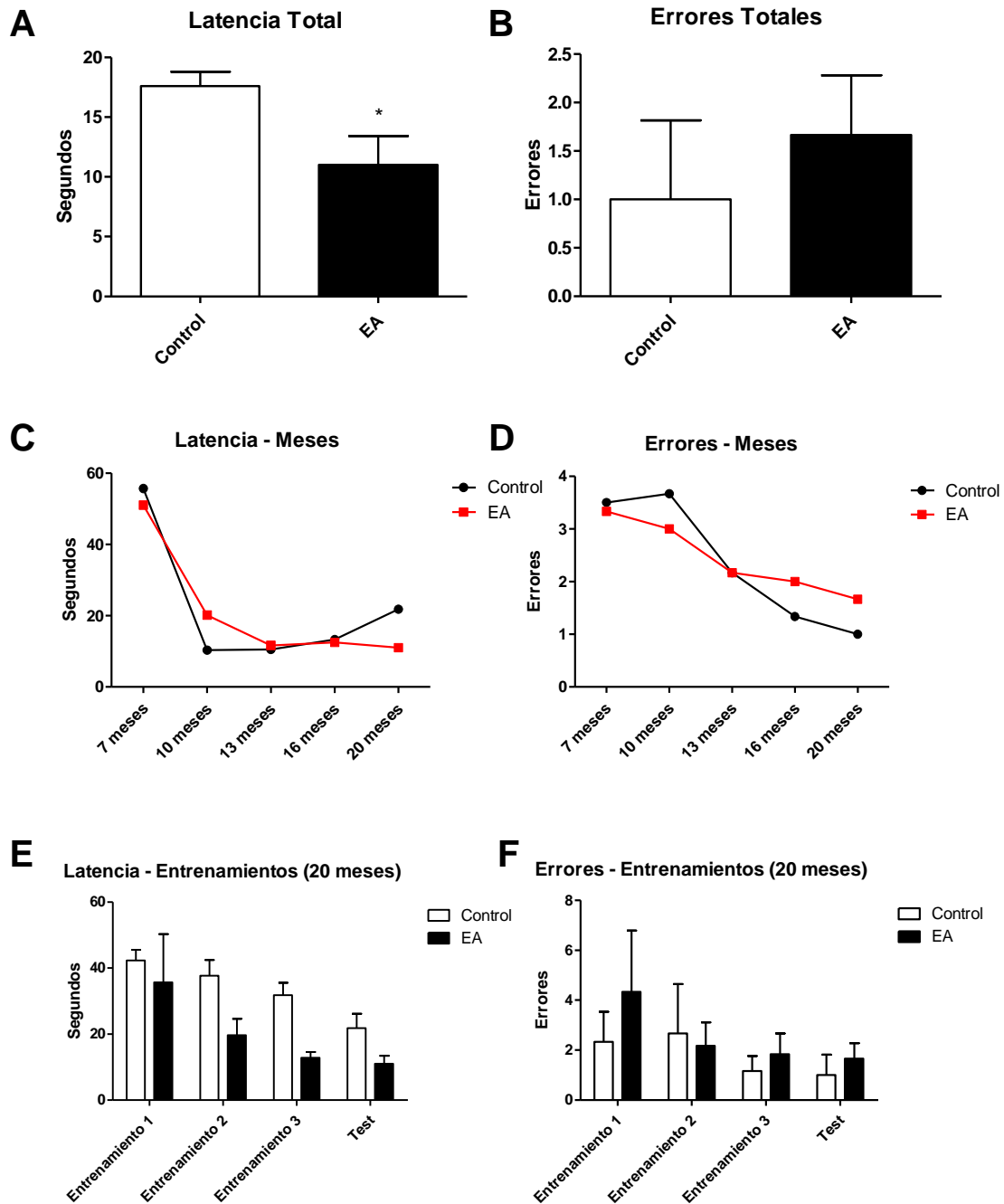
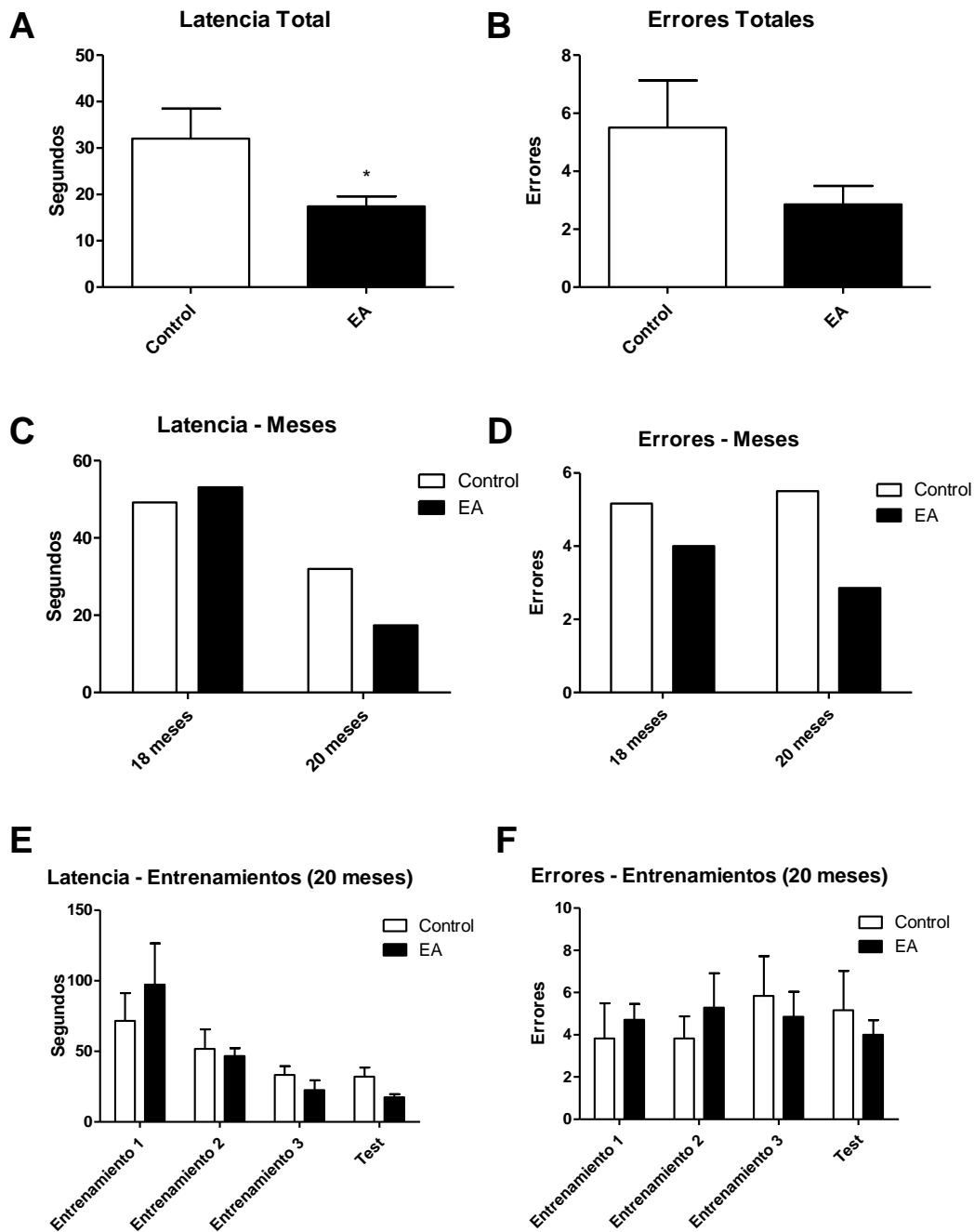


Figura 7– Resultados test de Barnes realizada a ratas de 20 meses del grupo control (Control) y sometidas a EA desde 7 meses de edad (EA). A: Latencia total (segundos) a los 20 meses, representada como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. B: Número total de errores a los 20 meses, representado como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. C: Latencia total (segundos) de los test realizados desde los 7 hasta los 20 meses, representada como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. D: Número total de errores de los test realizados desde los 7 hasta los 20 meses, representado como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. E: Latencia total (segundos) a los 20 meses en cada uno de los entrenamientos y en el test, representada como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. F: Número total de errores a los 20 meses en cada uno de los entrenamientos y en el test, representado como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar.

## Enriquecimiento ambiental 18-20 meses



*Figura 8: Resultados test de Barnes realizada a ratas de 20 meses del grupo control (Control) y sometidas a EA desde 18 meses de edad (EA). A: Latencia total (segundos) a los 20 meses, representada como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. B: Número total de errores a los 20 meses, representado como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. C: Latencia total (segundos) de los test realizados a los 18 y 20 meses, representada como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. D: Número total de errores de los test realizados a los 18 y 20 meses, representado como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. E: Latencia total (segundos) a los 20 meses en cada uno de los entrenamientos y en el test, representada como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar. F: Número total de errores a los 20 meses en cada uno de los entrenamientos y en el test, representado como media de todos los individuos del grupo acompañada del error estándar.*

## SIRT1

Todos los valores están indicados como densidad óptica de la proteína estudiada dividida por la densidad óptica de  $\beta$ -actina. Todos los resultados fueron estandarizados a partir de la media obtenida en cada Western-Blot (2 membranas, por tanto un total de 24 muestras por Western-Blot) del grupo de ratas jóvenes, siendo este grupo la referencia para el resto y por tanto teniendo un valor de 100 en todos los casos. Los resultados de cada grupo de EA fueron siempre comparados con sus propios controles. Este mismo procedimiento fue realizado también para el resto de proteínas estudiadas en el trabajo.

Se realizó un test ANOVA de 1 vía para estudiar si existían diferencias en las cantidades de SIRT1 entre ratas jóvenes, viejas, y viejas sometidas a EA. En los tres grupos encontramos diferencias significativas entre grupos mediante el test ANOVA. EA1-20 ( $F_{(2,21)}=18.83$ ,  $p < 0.0001$ ); EA7-20 ( $F_{(2,19)}=23.33$ ,  $p < 0.0001$ ); EA18-20 ( $F_{(2,17)}=52.98$ ;  $p < 0.0001$ ) Posteriormente se realizó un test post-hoc (Bonferroni) para estudiar las diferencias entre los grupos individualmente. En los tres grupos encontramos diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre ratas jóvenes y viejas y entre ratas jóvenes y viejas sometidas a EA, siendo siempre mayor la cantidad de SIRT1 en ratas jóvenes, pero en ningún caso encontramos diferencias en los niveles de SIRT1 entre ratas viejas y ratas sometidas a EA ( $p > 0.05$ ) (Fig. 9). El peso molecular observado fue de aproximadamente 110 kDa.

## SIRT1

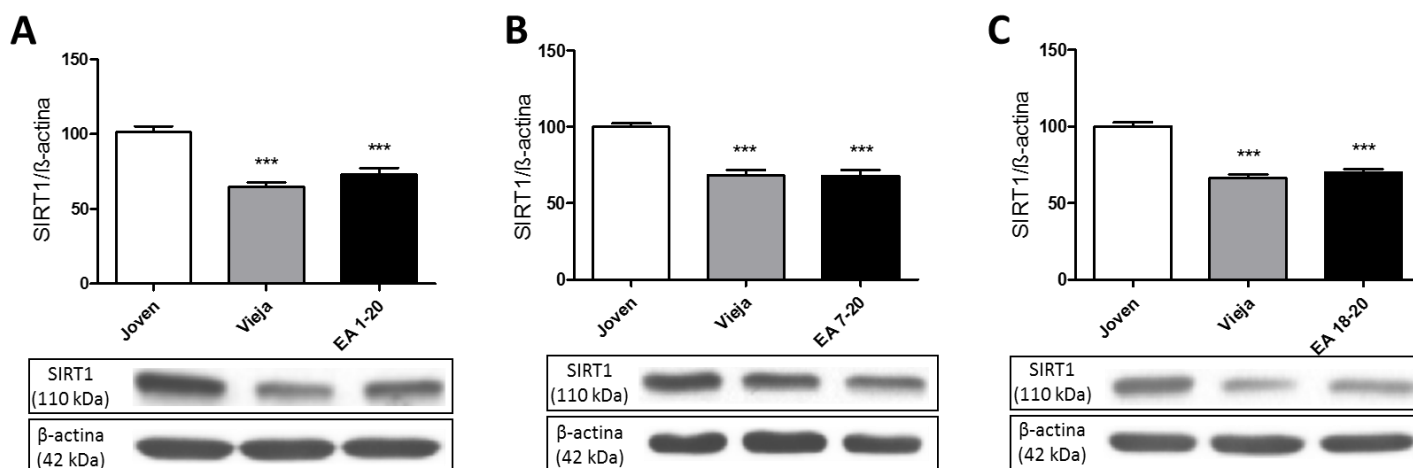


Figura 9 – Valores de Sirt1 de ratas jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y viejas sometidas a EA (20 meses), obtenidos mediante Western Blot, estandarizados respecto al valor de  $\beta$ -actina y posteriormente respecto al valor de las ratas jóvenes. A: Valores de ratas jóvenes, viejas y sometidas a EA desde 1 mes de edad. B: Valores de ratas jóvenes, viejas y sometidas a EA desde 7 meses de edad. C: Valores de ratas jóvenes, viejas y sometidas a EA desde 18 meses de edad.



## NF-κB Y NF-κB-ACETILADO

Para estudiar los niveles de NF-κB, los datos fueron estudiados de tres modos distintos, ya que se estudiaron los niveles totales de NF-κB, los niveles de NF-κB acetilado, y el ratio de NF-κB acetilado respecto al total. Estos resultados son analizados de modo distinto al resto de proteínas, donde se miden todos los resultados de forma directa, debido a que la forma acetilada de NF-κB presenta una mayor actividad y por tanto es

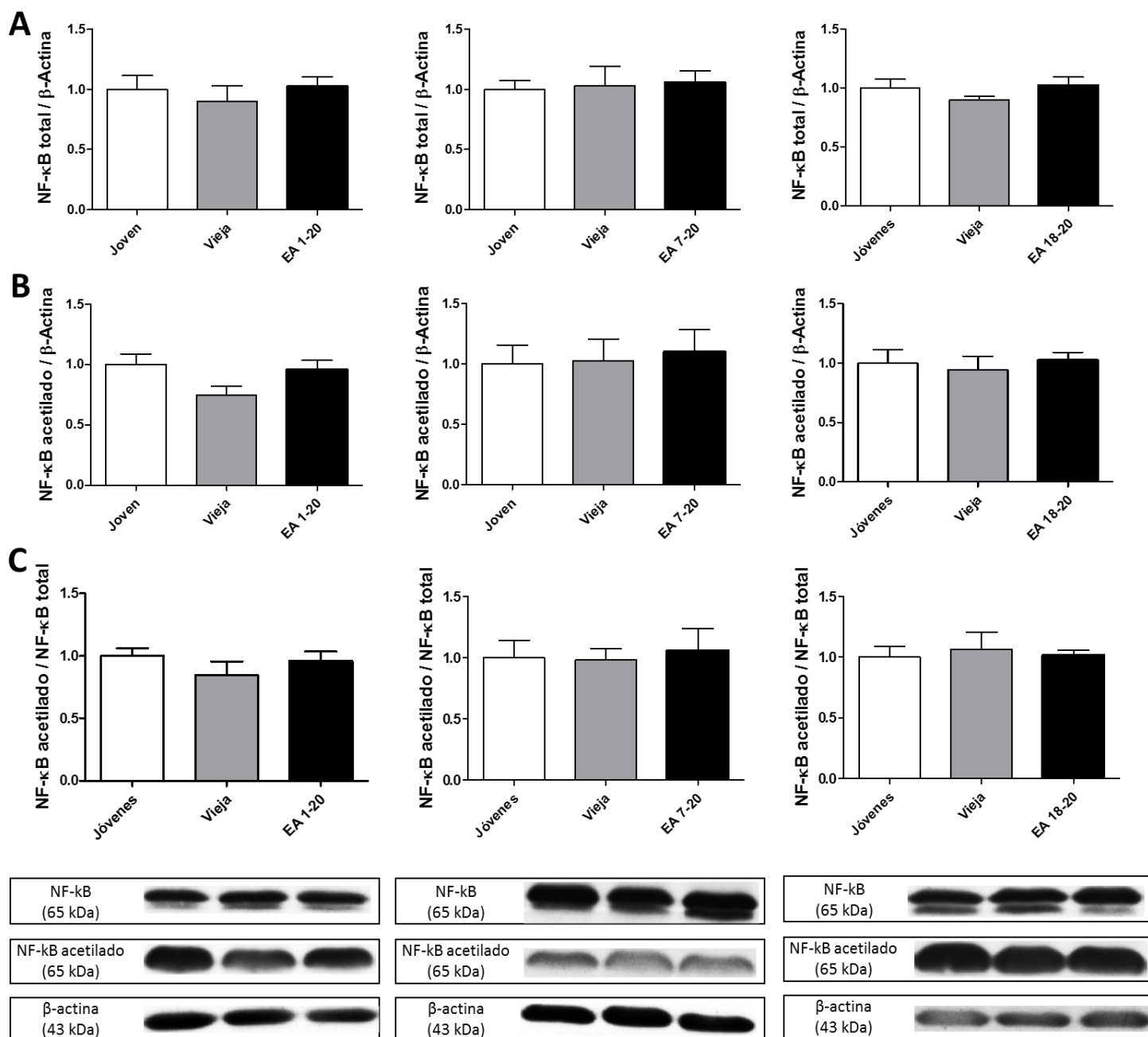


Figura 10 – Valores de NF-κB y NF-κB acetilado de ratas jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y viejas sometidas a EA (20 meses), obtenidos mediante Western Blot, estandarizados respecto al valor de β-actina y posteriormente respecto al valor de las ratas jóvenes. A: Valores de NF-κB total de ratas jóvenes, viejas y viejas sometidas a EA desde 1, 7, o 18 meses. B: Valores de NF-κB acetilado total de ratas jóvenes, viejas y viejas sometidas a EA desde 1, 7 o 18 meses. C: Ratio de NF-κB acetilado respecto al total de ratas jóvenes, viejas, y viejas sometidas a EA desde 1, 7 o 18 meses.

de elevada importancia biológica. El peso molecular de todas las formas observadas de NF- $\kappa$ B fue de aproximadamente 65 kDa.

Mediante la realización de un test ANOVA de 1 vía, no se encontraron diferencias entre las cantidades de NF- $\kappa$ B total entre ratas jóvenes, viejas y sometidas a EA en ninguno de los grupos estudiados. EA1-20 ( $F_{(2,14)}=0.32$ ,  $p > 0.05$ ); EA7-20 ( $F_{(2,14)}=0.065$ ,  $p > 0.05$ ); EA18-20 ( $F_{(2,17)}=1.14$ ,  $p > 0.05$ ). El mismo procedimiento fue realizado para estudiar si existían diferencias en los niveles de NF- $\kappa$ B acetilado o en el ratio de acetilación, pero no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos factores entre ninguno de los grupos estudiados. Para los niveles de NF- $\kappa$ B acetilado los resultados obtenidos fueron los siguientes: EA1-20 ( $F_{(2,14)}=2.638$ ,  $p > 0.05$ ); EA7-20 ( $F_{(2,14)}=0.10$ ,  $p > 0.05$ ); EA18-20 ( $F_{(2,17)}=0.18$ ,  $p > 0.05$ ), mientras que para el ratio de acetilación fueron los siguientes: EA1-20 ( $F_{(2,14)}=0.87$ ,  $p > 0.05$ ); EA7-20 ( $F_{(2,14)}=0.076$ ,  $p > 0.05$ ); EA18-20 ( $F_{(2,17)}=0.12$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 10).

## BDNF

Se realizó un test ANOVA de 1 vía para estudiar si existían diferencias en los niveles de BDNF entre ratas jóvenes, viejas, y viejas sometidas a EA desde 1 mes, 7 meses o 18 meses. No se encontraron diferencias en ninguno de los grupos mediante la realización del test estadístico: EA1-20 ( $F_{(2,17)}=1.48$ ,  $p > 0.05$ ); EA7-20 ( $F_{(2,18)}=0.058$ ,  $p > 0.05$ ); EA18-20 ( $F_{(2,13)}=0.91$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 11). Los datos obtenidos corresponden a la forma madura de BDNF, de un peso aproximado de 14 kDa.

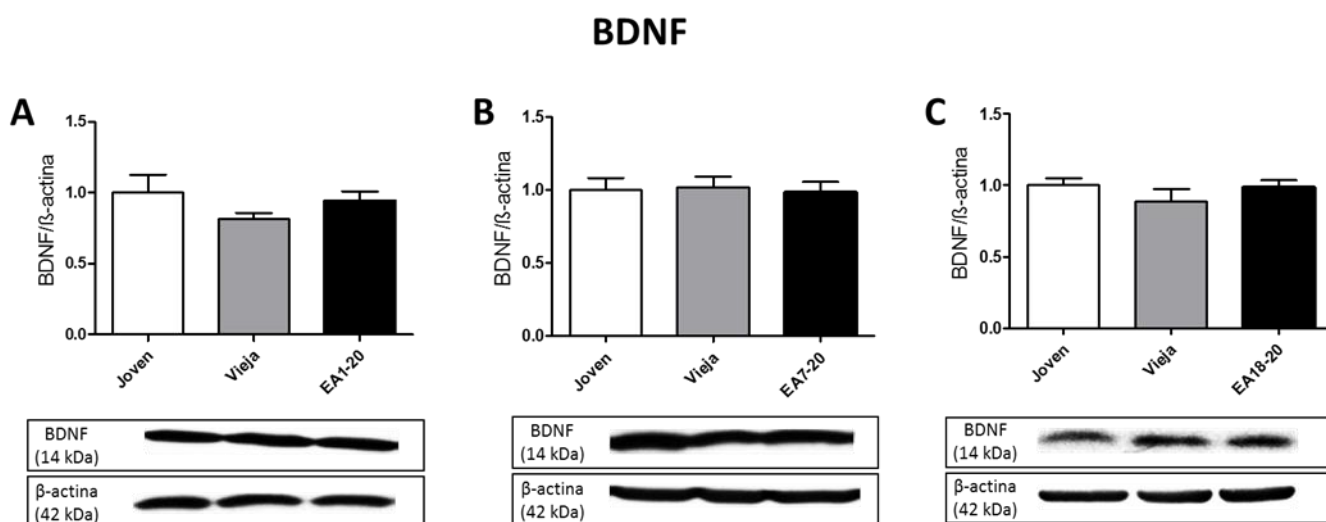


Figura 11 – Valores de BDNF de ratas jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y viejas sometidas a EA (20 meses), obtenidos mediante Western Blot, estandarizados respecto al valor de  $\beta$ -actina y posteriormente respecto al valor de las ratas jóvenes. A: Valores de ratas jóvenes, viejas y sometidas a EA desde 1 mes de edad. B: Valores de ratas jóvenes, viejas y sometidas a EA desde 7 meses de edad. C: Valores de ratas jóvenes, viejas y sometidas a EA desde 18 meses de edad.

Se realizó un test ANOVA de 1 vía para estudiar si ratas jóvenes, viejas y viejas sometidas a EA desde 1 mes o 7 meses presentaban diferencias en los niveles de RbAp46/48. En este caso no se comprobó si existían diferencias en el grupo que iniciaba el EA a los 18 meses debido a los resultados negativos en los otros dos grupos y a la falta de anticuerpo.

El test ANOVA de 1 vía muestra diferencias significativas en los niveles de RbAp46/48 entre distintos grupos. Posteriormente se realizó el test de Bonferroni para conocer entre que grupos existían diferencias, y se encontraron diferencias entre ratas viejas y ratas jóvenes, y entre ratas viejas sometidas a EA y ratas jóvenes. Estos resultados se encuentran tanto en el grupo EA1-20 ( $F_{(2,21)}=11.57$ ,  $p < 0.001$ ) en ratas viejas ( $p < 0.001$ ) y viejas sometidas a EA ( $p < 0.001$ ) como en el grupo EA7-20 ( $F_{(2,19)}=34.47$ ,  $p < 0.0001$ ), también en ratas viejas ( $p < 0.001$ ) y viejas sometidas a EA ( $p < 0.001$ ). En ningún caso se encontraron diferencias en los niveles de RbAp46/48 entre ratas viejas y ratas viejas sometidas a EA ( $p > 0.05$ ) (Fig. 12).

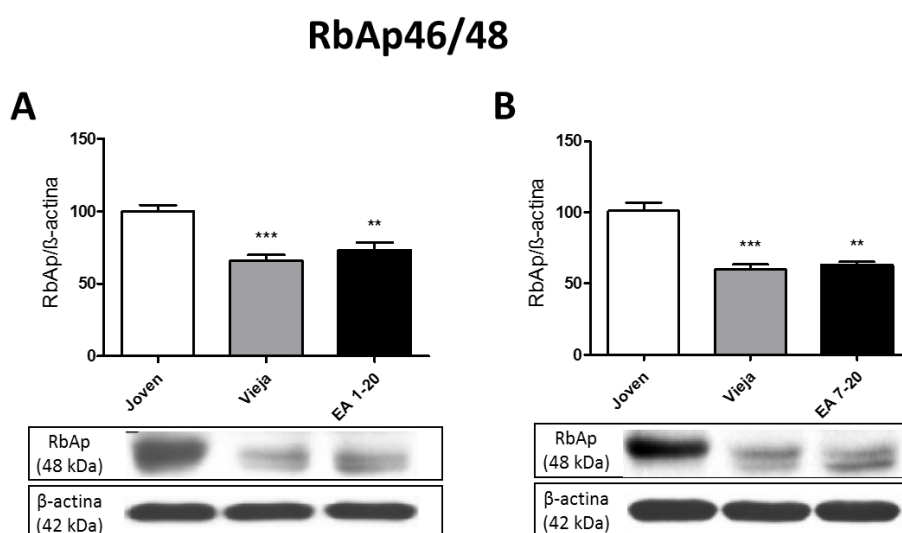


Figura 12 – Valores de RbAp46/48 de ratas jóvenes (3 meses), viejas (20 meses) y viejas sometidas a EA (20 meses), obtenidos mediante Western Blot, estandarizados respecto al valor de  $\beta$ -actina y posteriormente respecto al valor de las ratas jóvenes. A: Valores de ratas jóvenes, viejas y sometidas a EA desde 1 mes de edad. B: Valores de ratas jóvenes, viejas y sometidas a EA desde 7 meses de edad. C: Valores de ratas jóvenes, viejas y sometidas a EA desde 18 meses de edad.

## DISCUSIÓN

El EA continuado, independientemente de la edad de inicio, produce mejoras significativas en la memoria espacial de ratas viejas (20 meses), ya que se ha observado una mejoría en el test de Barnes respecto a ratas de la misma edad estabuladas en condiciones estándar. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros grupos en trabajos similares, donde se encontraron mejoras en la memoria espacial en ratas sometidas a EA desde 1 mes hasta los 18 meses (Cummins et al., 1973), desde los 6 meses hasta los 8 meses (Kempermann et al., 1998) y desde los 18 hasta los 19 meses (Frick et al., 2003), aunque en estos estudios el test utilizado para conocer la memoria espacial fue el Morris water maze y no el test de Barnes. Aun así, nuestros resultados únicamente muestran mejoras en la memoria espacial a los 20 meses de edad en los 3 grupos, es decir, en las ratas viejas, mientras que otros estudios como los trabajos de Kempermann (1997, 1998), Pham (1999) y Duffy (2001) muestran mejoras en ratas adultas y jóvenes. En nuestro caso, parece que no se producen mejoras cognitivas globales, sino que lo que encontramos es prevención del deterioro cognitivo, que se produce al llegar a una determinada edad y no tras un tiempo concreto de EA, ya que en el grupo EA18-20 los cambios se producen después de solo 2 meses de EA, mientras que en el grupo EA1-20 los animales tienen que estar sometidos a EA durante 19 meses para que se produzcan estos cambios. Las posibles explicaciones de nuestras diferencias con las obtenidas por otros grupos serán discutidas posteriormente en este apartado.

Los resultados de Sirt1 demuestran que esta proteína se encuentra disminuida en ratas viejas (20 meses) respecto a las ratas jóvenes (3 meses), en concordancia con los resultados obtenidos por Quintas (2011), Chang (2013), Sarubbo (tesis doctoral) y Ramis et al., (resultados no publicados), pero en disonancia con Sidorova-Darmos (2014) y Braidy (2015). En los estudios de Quintas, Sidorova-Darmos y Braidy se han estudiado los niveles en el hipocampo ratas Wistar jóvenes (3 meses) y viejas (24 meses) mediante Western-Blot. Además, en el caso de Quintas, Sidorova-Darmos y nuestro estudio se ha utilizado el mismo anticuerpo, y en sus casos, el mismo tipo de ratas, en las mismas edades siguiendo protocolos similares, por lo que los valores de Sirt1 en ratas viejas (24 meses) parecen presentar una elevada variabilidad entre grupos y serían necesarios más estudios para aclarar los cambios en sus niveles durante el envejecimiento, aunque en todos los estudios realizados se aclara que la actividad de Sirt1 y el resto de las sirtuinas disminuye durante el envejecimiento (Braidy et al., 2011). Aun así, los resultados obtenidos en nuestro estudio, juntamente con los obtenidos por otros grupos parecen indicar una tendencia de Sirt1 a disminuir en el envejecimiento.

Sería interesante la realización de un estudio sobre los niveles de Sirt1 (y el resto de sirtuinas) en el núcleo y en el citoplasma de ratas jóvenes y viejas, ya que se conoce que Sirt1 y Sirt2 tienen capacidad de translocación entre el núcleo y el citoplasma, y estos niveles podrían encontrarse modificados durante el envejecimiento, afectando de esta manera al individuo de manera distinta, ya que se ha demostrado que la sobreexpresión de Sirt1 en el núcleo produce la deacetilación de la histona H3, y que únicamente cuando se encuentra en el núcleo inhibe la apoptosis inducida por antimicina A (Tanno et al., 2007). Hasta el momento, los estudios realizados siguiendo

esta base se han realizado únicamente comparando los niveles de Sirt1 en ratas adultas, en embriones y ratas recién nacidas, por lo que existe una falta de conocimiento sobre los posibles cambios producidos en el envejecimiento.

Nuestros resultados también indican que el EA no afecta a los niveles de Sirt1 en el hipocampo de ratas viejas, coincidiendo con estudios anteriores (Polito et al., 2014). Aun así, sería posible que existiesen diferencias en la actividad de Sirt1 debidas al EA, por lo que se podrían realizar estudios de actividad de Sirt1 en el cerebro de ratas viejas sometidas a EA para observar si existen cambios en su actividad, de modo similar a otros estudios donde se encuentran cambios en la actividad de Sirt1 en el envejecimiento. En esta misma línea, se podría estudiar si el EA afecta a los niveles cerebrales de NAD<sup>+</sup>, que se ve reducido en el envejecimiento, y es necesario para la acción de las sirtuinas (Braidy et al., 2011). Pese a que no parece que el EA afecte a los niveles de Sirt1, otros tratamientos más directos, como el uso de antioxidantes, sí que produce una recuperación de los niveles de Sirt1 en ratas viejas. Así, se conoce que el tratamiento con resveratrol (Sarubbo, 2016) y con  $\alpha$ -tocoferol (Ullate, 2015) produce un aumento de los niveles de Sirt1 en ratas viejas tratadas con estos antioxidantes. Además, también se conoce que la restricción calórica produce aumentos similares en los niveles de Sirt1 (Park et al., 2013).

Tal como se esperaba, no se han encontrado diferencias en los niveles totales de NF- $\kappa$ B entre ratas jóvenes, viejas, y viejas sometidas a EA (Helenius et al., 1996), pero, en este caso a diferencia de lo obtenido por otros grupos, no se han encontrado diferencias en los niveles de NF- $\kappa$ B acetilado, ya sea en sus niveles globales o en el ratio de acetilación respecto al total. En un estudio reciente, Neidl (2016) encontró aumentos en el ratio de acetilación de NF- $\kappa$ B en ratas sometidas a EA, resultado diferente al obtenido en nuestro estudio. Aun así, no está claro el efecto de NF- $\kappa$ B en el cerebro envejecido, ya que presenta efectos neuroprotectores, pero también produce neuroinflamación. Muchos estudios muestran los efectos de NF- $\kappa$ B en la memoria y en el proceso de aprendizaje, por lo que NF- $\kappa$ B es considerado en muchas ocasiones como un marcador de plasticidad sináptica y de neuroprotección (Alberini, 2009), pero NF- $\kappa$ B también presenta importantes efectos en la inflamación, de modo que en el cerebro envejecido, donde hay unos mayores niveles de inflamación (Holmes y Butchart, 2011), NF- $\kappa$ B podría producir efectos perjudiciales para la memoria.

La teoría de que NF- $\kappa$ B produce efectos perjudiciales relacionados con un aumento de la inflamación encaja con los resultados de Maqbool (2013), donde demuestra que la activación mantenida en el tiempo de NF- $\kappa$ B produce déficits de memoria y disminución de BDNF, que sí que se conoce que presenta una elevada función en la plasticidad. Por el contrario, Neidl (2016) muestra que ratas sometidas a EA muestran un aumento en la forma acetilada de NF- $\kappa$ B que correlaciona con mejoras en la memoria, por lo que no queda claro si un aumento en la actividad de NF- $\kappa$ B es positivo o negativo para la memoria. Aun así, hay que tener en cuenta que NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción, y que por tanto produce sus efectos en el núcleo, donde se transloca cuando es activado, por tanto, deberían llevarse a cabo estudios donde se pudiesen observar los niveles de NF- $\kappa$ B en el citoplasma y en el núcleo, ya que una mayor cantidad global de NF- $\kappa$ B no siempre correlaciona con una mayor cantidad en el núcleo, y por tanto de actividad, de

esta proteína (Helenius et al., 1996).

Se ha encontrado una disminución en los niveles de RbAp46/48 en ratas viejas respecto a las jóvenes, coincidiendo con otros estudios (Pavlopoulos et al., 2013), pero, al igual que con el resto de proteínas estudiadas no se ha encontrado un efecto del EA sobre sus niveles. En el estudio de Pavlopoulos, las diferencias en los niveles de RbAp se producen a nivel del giro dentado, mientras que en nuestro estudio, estas diferencias han sido encontradas utilizando todo el hipocampo. En su estudio también demuestra que el aumento en los niveles de RbAp en el giro dentado produce mejoras cognitivas que compensan el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento, por lo que sería interesante estudiar específicamente los niveles de RbAp en el giro dentado mediante inmunohistoquímica y no en todo el hipocampo, de modo que podríamos ver si el EA produce cambios específicos a nivel del giro dentado o si por el contrario, el EA no produce cambios en los niveles de RbAp.

Nuestros resultados no muestran diferencias en los niveles de BDNF entre ratas jóvenes y viejas, algo que ha sido ampliamente demostrado en la literatura existente (Berchtold et al., 2013). El hecho de que no encontremos estas diferencias puede ser debido al uso de ratas de diferente cohorte en este estudio, ya que las ratas pertenecientes al grupo joven fueron sacrificadas tiempo después de la realización de los protocolos de EA, por lo que nacieron aproximadamente 2 años después que las ratas viejas del grupo control y del grupo sometido a EA, y se conoce que existen diferencias comportamentales entre grupos de ratas de la misma cepa (Fitzpatrick et al., 2013), y se cree que también pueden existir diferencias bioquímicas, tales como diferencias en neurogénesis (García-Cabrerizo y García-Fuster, 2016). Los resultados de esta proteína pueden comprometer la fiabilidad de otros resultados obtenidos en el estudio, ya que si BDNF se ha visto afectada por este factor, otras proteínas también podrían verse afectados por las diferencias entre los grupos utilizados.

No se ha encontrado un aumento de BDNF en ninguno de los grupos de ratas sometidas a EA, a diferencia de lo encontrado por otros autores (Young et al., 1999; Ickes et al., 2000; Neidl et al., 2016). Las causas de que no se produzca este aumento serán debatidas a continuación.

Los cambios descritos en otros artículos (aumentos en BDNF, cambios en los niveles de acetilación de NFκB (Neidl, 2016), mejoras en la memoria espacial en ratas jóvenes-adultas (Pham et al., 1999; Duffy et al., 2001)) han sido obtenidos en estudios donde el protocolo de EA difiere del nuestro, ya que las ratas son estabuladas en grupos grandes de modo que hay un mayor enriquecimiento social, algo que no ocurre en nuestro caso, ya que tanto las ratas sometidas a EA como las del grupo control están estabuladas en parejas. Es posible que los efectos producidos por el uso de objetos (únicamente enriquecimiento ambiental) y los efectos producidos por el enriquecimiento social y ambiental puedan seguir vías diferentes, de modo que en nuestro trabajo no hemos obtenido diferencias en las proteínas estudiadas debido a que estas se ven afectadas únicamente cuando hay enriquecimiento social, pero sí que deben existir cambios en otras proteínas o factores bioquímicos, ya que se ha observado que hay mejoras en la memoria espacial. Esta hipótesis está respaldada por el estudio de Stein (2016), donde no encuentra cambios en los niveles de BDNF pero sí en LTP tras realizar un protocolo

de EA en el cual las ratas se encuentran estabuladas individualmente, pero son trasladadas en grupos de 3 diariamente a un caja de mayor tamaño, de modo que no existe un enriquecimiento social continuo, y además, cuando se realiza el EA, las ratas no están en grupos grandes como los que encontramos en otros trabajos, donde se encuentran estabuladas en grupos de hasta 13 ratas (Ickes et al., 2000; Neidl et al., 2016). Otro factor que se conoce que afecta a diversas proteínas es el ejercicio, y alguno de los estudios encontrados en la bibliografía añaden ruedas de correr a las jaulas para promover el ejercicio voluntario, lo que se ha demostrado que produce mejoras en memoria espacial, en otros factores tales como neurogénesis (Van Praag et al., 1999) y en otras proteínas como BDNF (Noble et al., 2014).

Además, nuestro estudio muestra que las diferencias en memoria espacial solo se producen cuando las ratas son viejas (diferencias únicamente a los 20 meses), no encontrándose estas diferencias en las ratas adultas (ver Figuras 6, 7 y 8), lo cual difiere de los resultados de otros grupos donde el EA produce mejoras en la memoria espacial de ratas jóvenes-adultas (Kempermann et al., 1997; Pham et al., 1999), aunque de nuevo, en ambos estudios utilizan el Morris water maze. Como hemos comentado, es posible que el EA sin enriquecimiento social produzca unos efectos diferentes, y que estos solo produzcan mejoras observables durante el envejecimiento, por lo que existe la posibilidad de que sacrificando las ratas a los 24 meses en lugar de a los 20 se hubiesen encontrado diferencias en alguna de las proteínas estudiadas, aunque existe la posibilidad de que algunos de los animales hubiesen muerto durante este tiempo, reduciendo así el número de animales utilizados y por tanto invalidando los resultados obtenidos.

En un futuro, se podría repetir un estudio similar a este, tal vez eligiendo únicamente uno de los grupos utilizados (EA1-20 o EA7-20 posiblemente), ya que no se han encontrado diferencias en los resultados obtenidos entre los 3 grupos, y comprobar de nuevo los resultados obtenidos en este estudio, estudiando además nuevas proteínas y factores neuroquímicos que puedan estar afectadas en el EA sin enriquecimiento social, tratando de buscar nuevas dianas que pueden ser importantes para el mantenimiento de la memoria y las capacidades cognitivas durante el envejecimiento. Sería posible realizar estudios para comprobar si tras realizar un protocolo de EA sin enriquecimiento social existen diferencias en LTP como las encontradas por Stein (2016). Además, todavía queda mucho por conocer sobre como el envejecimiento afecta a Sirt1 y NF- $\kappa$ B, y se podría realizar un estudio para conocer los niveles nucleares y citoplasmáticos de Sirt1, y para conocer los cambios en el ratio de acetilación de NF- $\kappa$ B que ocurren durante el envejecimiento, dos factores que tienen una importancia vital en la actividad de estas proteínas y que no han sido estudiados hasta el momento. En este hipotético estudio debería añadirse un grupo en el cual las ratas estuviesen sometidas a un protocolo de EA similar al utilizado en otros estudios, donde las ratas estuviesen en grupos grandes, de modo que se podría realizar una comparación entre los efectos del EA con enriquecimiento social y sin enriquecimiento social respecto a un grupo control.

Nuestros resultados además demuestran que no parece existir una edad límite en la cual el EA deja de producir mejoras cognitivas, ya que las ratas sometidas a EA desde los 18 meses presentan mejoras en la memoria espacial casi inmediatas (tras solo dos

meses) al ser sometidas a EA. Aplicados al mundo real, estos resultados indican que las personas de mayor edad pueden ser estimuladas para tratar de retrasar o disminuir el déficit cognitivo asociado al envejecimiento.



## CONCLUSIONES

El enriquecimiento ambiental continuado, independientemente de la edad de inicio, produce mejoras significativas en la memoria espacial de ratas viejas (20 meses) respecto a ratas de la misma edad estabuladas en condiciones estándar. Se ha demostrado que Sirt1 y RbAp46/48 presentan menores niveles en el hipocampo de ratas viejas respecto a ratas jóvenes, mientras que el envejecimiento no afecta a los niveles de NF- $\kappa$ B ni a su ratio de acetilación. Nuestros resultados sobre los niveles de BDNF no parecen encajar con la bibliografía existente, lo cual puede ser debido al uso de ratas de cohortes distintas en este estudio.

No parece existir una edad límite a partir de la cual el EA deje de producir efectos beneficiosos en las capacidades cognitivas de ratas viejas, ya que presentan mejoras en memoria espacial tras iniciar un protocolo de EA a los 18 meses de vida similares a las encontradas cuando el EA se inicia al mes de vida o a los 7 meses. Aun así, en este estudio no se han encontrado diferencias en algunas proteínas donde se esperaba que se encontrasen, tales como BDNF y NF- $\kappa$ B acetilado. Sería razonable pensar que estas diferencias con otros estudios sean debidas al protocolo de EA utilizado, ya que en nuestro caso no existía enriquecimiento social, existente en otros grupos, y es posible que los cambios en estas proteínas sean mediados por el enriquecimiento social, de modo que los cambios mediados por el EA utilizado en este estudio podrían afectar a otras proteínas o vías que no han sido estudiadas en este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a toda la gente del laboratorio C11 por hacer más amenas las horas de laboratorio y de redacción y por toda la ayuda dada siempre que la he necesitado, y al Dr. García Sevilla y a la Dra. García Fuster por permitirme utilizar su laboratorio. También quiero agradecer a la (casi) Dra. Marga Ramis por toda la paciencia y ayuda en la multitud de veces que la he necesitado, a la Dra. Susana Esteban por la ayuda prestada en la obtención de datos, y al director de este trabajo, el Dr. Antoni Miralles por su gran ayuda.

Finalmente, agradecer a mis amigos, y especialmente a mi novia, Marina, por toda la paciencia cada vez que les contaba algo del trabajo fuese bueno o malo, y por todo el apoyo dado durante este tiempo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological reviews*, 89(1), 121-145.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2010). *Biología Molecular de la Célula*. Barcelona: Ediciones Omega.
3. Allen, J. S., Bruss, J., Brown, C. K., & Damasio, H. (2005). Normal neuroanatomical variation due to age: the major lobes and a parcellation of the temporal region. *Neurobiology of aging*, 26(9), 1245-1260.
4. Alqarni, S. S., Murthy, A., Zhang, W., Przewloka, M. R., Silva, A. P., Watson, A. A., ... & Wang, H. (2014). Insight into the architecture of the NuRD complex structure of the RbAp48-MTA1 subcomplex. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 21844-21855.
5. Artero, S., Tiemeier, H., Prins, N. D., Sabatier, R., Breteler, M. M. B., & Ritchie, K. (2004). Neuroanatomical localisation and clinical correlates of white matter lesions in the elderly. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 75(9), 1304-1308.
6. Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, 93(1), 74.
7. Barrientos, R. M., Higgins, E. A., Biedenkapp, J. C., Sprunger, D. B., Wright-Hardesty, K. J., Watkins, L. R., ... & Maier, S. F. (2006). Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. *Neurobiology of aging*, 27(5), 723-732.
8. Barrientos, R. M., Frank, M. G., Hein, A. M., Higgins, E. A., Watkins, L. R., Rudy, J. W., & Maier, S. F. (2009). Time course of hippocampal IL-1  $\beta$  and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection. *Brain, behavior, and immunity*, 23(1), 46-54.
9. Barrientos, R. M., Kitt, M. M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2015). Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience*, 309, 84-99.
10. Berchtold, N. C., Coleman, P. D., Cribbs, D. H., Rogers, J., Gillen, D. L., & Cotman, C. W. (2013). Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 34(6), 1653-1661.
11. Braidy, N., Guillemin, G. J., Mansour, H., Chan-Ling, T., Poljak, A., & Grant, R. (2011). Age related changes in NAD<sup>+</sup> metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PloS one*, 6(4), e19194.
12. Braidy, N., Poljak, A., Grant, R., Jayasena, T., Mansour, H., Chan-Ling, T., ... & Guillemin, G. J. (2015). Differential expression of sirtuins in the aging rat brain. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 167.
13. Budni, J., Bellettini-Santos, T., Mina, F., Garcez, M. L., & Zugno, A. I. (2015). The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging and disease*, 6(5), 331.
14. Buerki, C., Rothgiesser, K. M., Valovka, T., Owen, H. R., Rehrauer, H., Fey, M., ... & Hottiger, M. O. (2008). Functional relevance of novel p300-mediated lysine 314 and 315 acetylation of RelA/p65. *Nucleic acids research*, 36(5), 1665-1680.

15. Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 30-40.
16. Chang, H. C., & Guarente, L. (2013). SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell*, 153(7), 1448-1460.
17. Chen, L. F., Fischle, W., Verdin, E., & Greene, W. C. (2001). Duration of nuclear NF- $\kappa$ B action regulated by reversible acetylation. *Science*, 293(5535), 1653-1657.
18. Chen, Z. Y., Jing, D., Bath, K. G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C. J., ... & Hempstead, B. L. (2006). Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*, 314(5796), 140-143.
19. Christensen, K., Doblhammer, G., Rau, R., & Vaupel, J. W. (2009). Ageing populations: the challenges ahead. *The Lancet*, 374(9696), 1196-1208.
20. Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J. W., Arunachalam, G., & Rahman, I. (2010). Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Archives of biochemistry and biophysics*, 501(1), 79-90.
21. Cummins, R. A., Walsh, R. N., Budtz-Olsen, O. E., Konstantinos, T., & Horsfall, C. R. (1973). Environmentally-induced changes in the brains of elderly rats. *Nature*.
22. Denis-Donini, S., Dellarole, A., Crociara, P., Francese, M. T., Bortolotto, V., Quadrato, G., ... & Bonini, S. A. (2008). Impaired adult neurogenesis associated with short-term memory defects in NF- $\kappa$ B p50-deficient mice. *The Journal of Neuroscience*, 28(15), 3911-3919.
23. Duffy, S. N., Craddock, K. J., Abel, T., & Nguyen, P. V. (2001). Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learning & Memory*, 8(1), 26-34.
24. Fitzpatrick, C. J., Gopalakrishnan, S., Cogan, E. S., Yager, L. M., Meyer, P. J., Lovic, V., ... & Flagel, S. B. (2013). Variation in the form of Pavlovian conditioned approach behavior among outbred male Sprague-Dawley rats from different vendors and colonies: sign-tracking vs. goal-tracking. *PLoS One*, 8(10), e75042.
25. Fjell, A. M., Sneve, M. H., Storsve, A. B., Grydeland, H., Yendiki, A., & Walhovd, K. B. (2015). Brain events underlying episodic memory changes in aging: a longitudinal investigation of structural and functional connectivity. *Cerebral Cortex*, bhv102.
26. Frick, K. M., Stearns, N. A., Pan, J. Y., & Berger-Sweeney, J. (2003). Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. *Learning & Memory*, 10(3), 187-198.
27. Frick, K. M., & Benoit, J. D. (2010). Use it or lose it: environmental enrichment as a means to promote successful cognitive aging. *The Scientific World Journal*, 10, 1129-1141.
28. García-Cabrerizo, R., & García-Fuster, M. J. (2016). Comparative effects of amphetamine-like psychostimulants on rat hippocampal cell genesis at different developmental ages. *NeuroToxicology*, 56, 29-39.
29. García-Fuster, M. J., Miralles, A., & García-Sevilla, J. A. (2007). 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, 32(2), 399-411
30. Godbout, J. P., Chen, J., Abraham, J., Richwine, A. F., Berg, B. M., Kelley, K. W., & Johnson, R. W. (2005). Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *The FASEB journal*, 19(10), 1329-1331.
  31. Gomes, A. R., Yong, J. S., Kiew, K. C., Aydin, E., Khongkow, M., Laohasinnarong, S., & Lam, E. W. F. (2016). Sirtuin1 (SIRT1) in the Acetylation of Downstream Target Proteins. *Histone Deacetylases: Methods and Protocols*, 169-188.
  32. Green, E. J., Greenough, W. T., & Schlumpf, B. E. (1983). Effects of complex or isolated environments on cortical dendrites of middle-aged rats. *Brain research*, 264(2), 233-240.
  33. Greenberg, M. E., Xu, B., Lu, B., & Hempstead, B. L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *The Journal of neuroscience*, 29(41), 12764-12767.
  34. Häcker, H., & Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci Stke*, 357(13), 12-14.
  35. Helenius, M., Hänninen, M., Lehtinen, S. K., & Salminen, A. (1996). Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Biochemical Journal*, 318(2), 603-608.
  36. Holmes, C., & Butchart, J. (2011). Systemic inflammation and Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions*, 39(4), 898-901.
  37. Hwang, J. W., Yao, H., Caito, S., Sundar, I. K., & Rahman, I. (2013). Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radical Biology and Medicine*, 61, 95-110.
  38. Ickes, B. R., Pham, T. M., Sanders, L. A., Albeck, D. S., Mohammed, A. H., & Granholm, A. C. (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental neurology*, 164(1), 45-52.
  39. Kaltschmidt, B., & Kaltschmidt, C. (2009). NF- $\kappa$ B in the nervous system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(3), a001271.
  40. Kaplan, D. R., & Hempstead, B. L. (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, 252(5005), 554.
  41. Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624), 493-495.
  42. Kempermann, G., Kuhn, H. G., & Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience*, 18(9), 3206-3212.
  43. Kiernan, R., Brès, V., Ng, R. W., Coudart, M. P., El Messaoudi, S., Sardet, C., ... & Benkirane, M. (2003). Post-activation turn-off of NF- $\kappa$ B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2758-2766.
  44. Kirasic, K. C. (1991). Spatial cognition and behavior in young and elderly adults: implications for learning new environments. *Psychology and aging*, 6(1), 10.
  45. Klein, R., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E., & Barbacid, M. (1991). The trk proto-

- oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 65(1), 189-197. (a)
46. Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., ... & Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, 66(2), 395-403. (b)
47. Koponen, E., Vöikar, V., Riekk, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., ... & Castrén, E. (2004). Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLC $\gamma$  pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(1), 166-181.
48. Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*, 19(8), 312-318.
49. Lamballe, F., Klein, R., & Barbacid, M. (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, 66(5), 967-979.
50. Leal-Galicia, P., Castañeda-Bueno, M., Quiroz-Baez, R., & Arias, C. (2008). Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiology of learning and memory*, 90(3), 511-518.
51. Lessmann, V., Gottmann, K., & Malsangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in neurobiology*, 69(5), 341-374.
52. Lodish, H. (2008). *Molecular cell biology*. Macmillan.
53. Lyons, W. E., Mamounas, L. A., Ricaurte, G. A., Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., ... & Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 15239-15244.
54. Mandrekar-Colucci, S., & Landreth, G. E. (2010). Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 9(2), 156-167.
55. Maqbool, A., Lattke, M., Wirth, T., & Baumann, B. (2013). Sustained, neuron-specific IKK/NF- $\kappa$ B activation generates a selective neuroinflammatory response promoting local neurodegeneration with aging. *Molecular neurodegeneration*, 8(1), 1.
56. Marini, A. M., Jiang, X., Wu, X., Tian, F., Zhu, D., Okagaki, P., & Lipsky, R. H. (2004). Role of brain-derived neurotrophic factor and NF- $\kappa$ B in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restorative neurology and neuroscience*, 22(2), 121-130.
57. Mattson, M. P., Culmsee, C., Yu, Z., & Camandola, S. (2000). Roles of nuclear factor  $\kappa$ B in neuronal survival and plasticity. *Journal of neurochemistry*, 74(2), 443-456.
58. Minichiello, L., Calella, A. M., Medina, D. L., Bonhoeffer, T., Klein, R., & Korte, M. (2002). Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 36(1), 121-137.
59. Mohan, A., Mather, K. A., Thalamuthu, A., Baune, B. T., & Sachdev, P. S. (2016). Gene expression in the aging human brain: an overview. *Current opinion in*

- psychiatry, 29(2), 159-167.
60. Morrison, J. H., & Baxter, M. G. (2012). The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(4), 240-250.
  61. Neidl, R., Schneider, A., Bousiges, O., Majchrzak, M., Barbelivien, A., de Vasconcelos, A. P., ... & Boutillier, A. L. (2016). Late-Life Environmental Enrichment Induces Acetylation Events and Nuclear Factor  $\kappa$ B-Dependent Regulations in the Hippocampus of Aged Rats Showing Improved Plasticity and Learning. *The Journal of Neuroscience*, 36(15), 4351-4361.
  62. Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., & Eriksson, P. S. (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Journal of neurobiology*, 39(4), 569-578.
  63. Noble, E. E., Mavanji, V., Little, M. R., Billington, C. J., Kotz, C. M., & Wang, C. (2014). Exercise reduces diet-induced cognitive decline and increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor in CA3 neurons. *Neurobiology of learning and memory*, 114, 40-50.
  64. Park, S., Mori, R., & Shimokawa, I. (2013). Do sirtuins promote mammalian longevity?: A Critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction. *Molecules and cells*, 35(6), 474-480.
  65. Pavlopoulos, E., Jones, S., Kosmidis, S., Close, M., Kim, C., Kovalerchik, O., ... & Kandel, E. R. (2013). Molecular mechanism for age-related memory loss: the histone-binding protein RbAp48. *Science translational medicine*, 5(200), 200ra115-200ra115.
  66. Pham, T. M., Ickes, B., Albeck, D., Söderström, S., Granholm, A. C., & Mohammed, A. H. (1999). Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience*, 94(1), 279-286.
  67. Polito, L., Chierchia, A., Tunesi, M., Bouybayoune, I., Kehoe, P. G., Albani, D., & Forloni, G. (2014). Environmental enrichment lessens cognitive decline in APP23 mice without affecting brain sirtuin expression. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42(3), 851-864.
  68. Qian, Y. W., Wang, Y. C., Hollingsworth Jr, R. E., Jones, D., Ling, N., & Lee, E. Y. (1993). A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. *Nature*, 364(6438), 648-652.
  69. Quintas, A., de Solís, A. J., Díez-Guerra, F. J., Carrascosa, J. M., & Bogónez, E. (2012). Age-associated decrease of SIRT1 expression in rat hippocampus: prevention by late onset caloric restriction. *Experimental gerontology*, 47(2), 198-201.
  70. Ramis, M. R., Esteban, S., Miralles, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2015). Caloric restriction, resveratrol and melatonin: Role of SIRT1 and implications for aging and related-diseases. *Mechanisms of ageing and development*, 146, 28-41.
  71. Raz, N., & Rodrigue, K. M. (2006). Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 30(6), 730-748.
  72. Rothgiesser, K. M., Erener, S., Waibel, S., Lüscher, B., & Hottiger, M. O. (2010).

- SIRT2 regulates NF- $\kappa$ B-dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J Cell Sci*, 123(24), 4251-4258.
73. Saha, R. N., Liu, X., & Pahan, K. (2006). Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF- $\alpha$ : a case for the neuroprotective role of cytokine. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(3), 212-222.
  74. Salminen, A., Huuskonen, J., Ojala, J., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., & Suuronen, T. (2008). Activation of innate immunity system during aging: NF- $\kappa$ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing research reviews*, 7(2), 83-105.
  75. Sarubbo, MF. (2016). Estrategias neuroprotectoras en el envejecimiento cerebral. Mecanismos neuroquímicos y moléculas y su correlación con los efectos sobre las capacidades cognitivas. Universitat de les Illes Balears, Palma.
  76. Salthouse, T. A. (2010). Selective review of cognitive aging. *Journal of the International neuropsychological Society*, 16(5), 754.
  77. Satoh, A., & Imai, S. I. (2014). Systemic regulation of mammalian ageing and longevity by brain sirtuins. *Nature communications*, 5.
  78. Sidorova-Darmos, E., Wither, R. G., Shulyakova, N., Fisher, C., Ratnam, M., Aarts, M., ... & Eubanks, J. H. (2014). Differential expression of sirtuin family members in the developing, adult, and aged rat brain. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 333.
  79. Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W., & Kida, S. (1998). CREB and memory. *Annual review of neuroscience*, 21(1), 127-148.
  80. Skaper, S. D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Neurotrophic Factors: Methods and Protocols*, 1-12.
  81. Stein, L. R., O'Dell, K. A., Funatsu, M., Zorumski, C. F., & Izumi, Y. (2016). Short-term environmental enrichment enhances synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats. *Neuroscience*, 329, 294-305.
  82. Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., & Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6823-6832.
  83. Tisserand, D. J., & Jolles, J. (2003). On the involvement of prefrontal networks in cognitive ageing. *Cortex*, 39(4), 1107-1128.
  84. Torchy, M. P., Hamiche, A., & Klaholz, B. P. (2015). Structure and function insights into the NuRD chromatin remodeling complex. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(13), 2491-2507.
  85. Ullate, J. (2015). Efecto del tratamiento crónico con  $\alpha$ -tocoferol sobre la sirtuina 1 hipocampal en ratas viejas. Universitat de les Illes Balears, Palma.
  86. Van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience*, 2(3), 266-270.
  87. Wang, E. (1997). Regulation of apoptosis resistance and ontogeny of age-dependent diseases. *Experimental gerontology*, 32(4), 471-484.
  88. West, R. L. (1996). An application of prefrontal cortex function theory to cognitive aging. *Psychological bulletin*, 120(2), 272.
  89. Yang, T., & Sauve, A. A. (2006). NAD metabolism and sirtuins: metabolic

- regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. *The AAPS journal*, 8(4), E632-E643.
90. Yang, X. J., & Seto, E. Y. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, 26(37), 5310-5318.
  91. Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., & Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal*, 23(12), 2369-2380.
  92. Young, D., Lawlor, P. A., Leone, P., Dragunow, M., & During, M. J. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature medicine*, 5(4), 448-453.
  93. Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., & Lindholm, D. (1990). Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *The EMBO journal*, 9(11), 3545.
  94. Zhao, Y. N., Li, W. F., Li, F., Zhang, Z., Dai, Y. D., Xu, A. L., ... & Gao, J. (2013). Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 435(4), 597-602.
  95. Ziegler, D. A., Piguet, O., Salat, D. H., Prince, K., Connally, E., & Corkin, S. (2010). Cognition in healthy aging is related to regional white matter integrity, but not cortical thickness. *Neurobiology of aging*, 31(11), 1912-1926.