



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TREBALL DE FI DE GRAU**

# **ANÀLISI DE L'EFECTE DE LA INGESTA MODERADA DE CERVESA SOBRE ELS SISTEMES MONOAMINÈRGICS CEREBRALS EN UN MODEL DE RATA: COMPARACIÓ D'UN CONSUM CONTINUAT RESPECTE AL CONSUM ABUSIU DURANT EL CAP DE SETMANA**

**Alba M<sup>a</sup> Gómez Valero**

**Grau de: Biologia**

**Facultat de: Ciències**

**Any acadèmic 2020-21**

# **ANÀLISI DE L'EFECTE DE LA INGESTA MODERADA DE CERVESA SOBRE ELS SISTEMES MONOAMINÈRGICS CEREBRALS EN UN MODEL DE RATA: COMPARACIÓ D'UN CONSUM CONTINUAT RESPECTE AL CONSUM ABUSIU DURANT EL CAP DE SETMANA**

**Alba M<sup>a</sup> Gómez Valero**

**Treball de Fi de Grau**

**Facultat de: Ciències**

**Universitat de les Illes Balears**

**Any acadèmic 2020-21**

Paraules clau del treball:

Envelliment, deteriorament cognitiu, polifenols, cervesa, sistemes monoaminèrgics, consum continuat, consum abusiu, monoamines, hipocamp, estriat

*Nom del tutor / la tutora del treball Susana C Esteban Valdés*

Autoritz la Universitat a incloure aquest treball en el repositori institucional per consultar-lo en accés obert i difondre'l en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor/a		Tutor/a	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## **RESUM**

L'avanç amb l'edat afecta les capacitats cognitives i motores de les persones, deteriorant la seva qualitat de vida. Aquestes alteracions augmenten la predisposició a trastorns neurodegeneratius i psiquiàtrics. Tot i que no es coneixen completament els processos que ocorren en l'envelliment, es creu que l'estrès oxidatiu té un paper important. En aquesta línia, els polifenols, que presenten propietats antiinflamatòries i antioxidants, podrien actuar prevenint o retardant els efectes associats a l'edat a nivell cerebral. En aquest experiment es va plantejar que la cervesa, una beguda rica en polifenols, pogués tenir un efecte neuroprotector sobre els sistemes monoaminèrgics, i si aquest efecte era diferent segons el tipus de consum. Per això, els animals es van distribuir en 3 tractaments: control (aigua), consum continuat (cervesa diàriament) i consum abusiu (2 dies exclusivament cervesa). A més, dins els grups del consum es va diferenciar entre cervesa amb alcohol i sense alcohol. Es van analitzar mitjançant HPLC, la síntesi, l'acumulació de neurotransmissors monoaminèrgics i el metabolisme d'aquests. Els resultats obtinguts suggereixen que el consum continuat i moderat de cervesa presenta efectes neuroprotectors sobre els sistemes dopaminèrgics de l'estriat i serotoninèrgics de l'estriat i l'hipocamp. A més, aquest efecte es veuria tant en la cervesa amb alcohol com sense alcohol. Per contra, el consum abusiu s'equipararia al grup control, pel que no presentaria propietats beneficioses sobre els sistemes monoaminèrgics.

## **ABSTRACT**

Advancing age affects people's cognitive and motor skills, that deteriorate their quality of life. These alterations increase the predisposition to neurodegenerative and psychiatric disorders. Although the processes that occur in aging are not fully understood, oxidative stress is thought to play an important role. In this line, polyphenols, which have anti-inflammatory and antioxidant properties, could act by preventing or delaying the effects associated with age in the brain. In this experiment it was suggested that beer, a beverage rich in polyphenols, could have a neuroprotective effect on monoaminergic systems, and whether this effect was different depending on the type of consumption. Therefore, the animals were distributed in 3 treatments: control (water), continuous consumption (beer daily) and abusive consumption (2 days exclusively beer). In addition, within consumption groups a distinction was made between alcoholic and non-alcoholic beer. The synthesis, accumulation of monoaminergic neurotransmitters and their metabolism were analysed by HPLC. The results suggest that continued and moderate beer consumption has neuroprotective effects on the dopaminergic systems of the striatum and serotonergic systems of the striatum and hippocampus. In addition, this effect would be seen in both alcoholic and non-alcoholic beer. In contrast, abusive consumption would be equated with the control group, so it would not have beneficial properties on monoaminergic systems.

# ÍNDEX

INTRODUCCIÓ .....	1
a. Envelliment .....	1
b. Sistemes monoaminèrgics.....	1
c. Prevenció de l'envelliment amb polifenols: cervesa .....	3
d. Hipòtesi i objectius de l'estudi.....	4
MATERIAL I MÈTODES .....	4
a. Animals d'experimentació .....	4
b. Tractaments i disseny experimental.....	4
c. Dissecció i recollida de mostres.....	5
d. Determinació de la síntesi de 5-HT, DA i NA.....	5
e. Preparació de les mostres.....	6
f. Determinació cromatogràfica de la síntesi de monoamines (HPLC) .....	6
g. Anàlisi estadístic .....	7
RESULTATS.....	8
a) Estat dels animals.....	8
b) Estriat .....	8
c) Hipocamp.....	12
DISCUSSIÓ.....	20
CONCLUSIONS .....	22
REFERÈNCIES .....	23

## ABREVIATURES

5-HIAA	Àcid 5-Hidroxiindoleacètic
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptòfan
ANOVA	de l'anglès <i>ANalysis Of VARIances</i>
BBB	de l'anglès <i>Blood Brain Barrier</i>
DA	Dopamina
DOPA	L-3,4-dihidroxiifenilalanina
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
HPLC	de l'anglès <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HVA	Àcid Homovanílic
MAO	enzim Monoamino Oxidasa
NA	Noradrenalina, norepinefrina
NSD 1015	Clorhidrat de 3-hidroxi benzil-hidrazina (inhibidor descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics)
OSA	Àcid octà sulfònic
ROS	de l'anglès <i>Reactive Oxygen Species</i> / Espècies Reactives d'Oxigen
RNS	de l'anglès <i>Reactive Nitrogen Species</i> / Espècies Reactives de Nitrogen
TH	enzim Tirosina Hidroxilasa
TPH	enzim Triptòfan Hidroxilasa

# INTRODUCCIÓ

## a. Envel·liment

L'envelliment és un fenomen complex, biològic i inevitable, caracteritzat per canvis fisiològics en les cèl·lules i teixits, i que comporta canvis estructurals i funcionals al cervell (Gupta *et al.*, 2019). Degut a aquestes alteracions es produeix una disminució en les capacitats funcionals, com ara les capacitats cognitives i motores, afectant finalment la qualitat de vida (Ho *et al.*, 2010; Konar *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2021). Tots aquests canvis suggereixen l'envelliment com un factor de risc important pel desenvolupament de patologies neurodegeneratives com el deteriorament cognitiu, la demència, la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson i certs trastorns psiquiàtrics com la depressió, l'ansietat i trastorns del son (Ho *et al.*, 2010; Srivas i Thakur, 2019). D'aquesta manera, el deteriorament cognitiu associat a l'edat s'ha convertit en una preocupació biomèdica creixent i un repte per a possibles intervencions per a un envelliment saludable (Konar *et al.*, 2016; Srivas i Thakur, 2019).

Entre les possibles causes per explicar l'envelliment, es creu que els radicals lliures que inclouen espècies reactives de nitrogen (RNS, de l'anglès *Reactive Nitrogen Species*) i espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès *Reactive Oxygen Species*) tenen un paper important en la disminució de les funcions relacionades amb l'edat (Dhalaria *et al.*, 2020; Ho *et al.*, 2010).

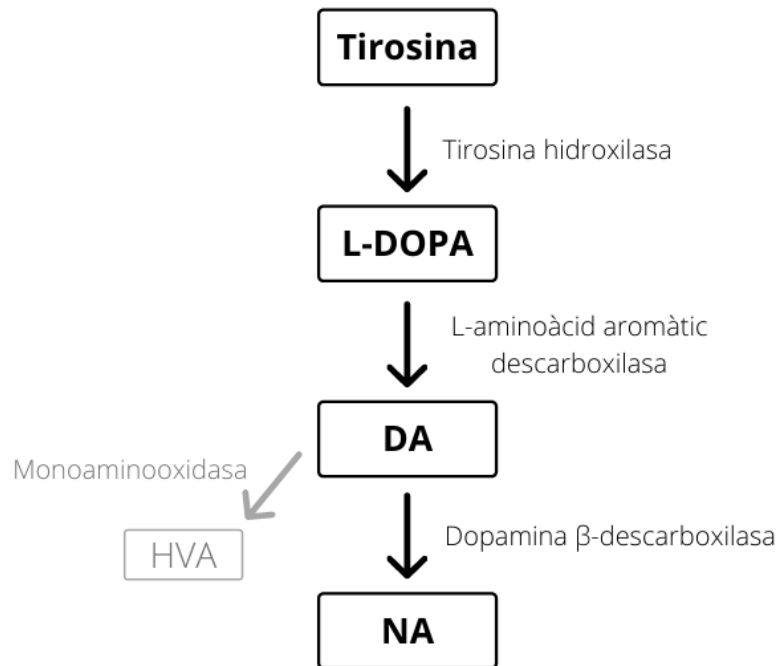
## b. Sistemes monoaminèrgics

Moltes de les funcions cerebrals estan modulades per sistemes monoaminèrgics, formats per neurotransmissors de tipus monoamina, com els dopaminèrgics, serotoninèrgics i noradrenèrgics (Palmer i DeKosky, 1993; Ramis *et al.*, 2020; Sarubbo *et al.*, 2018). Per tant, aquests sistemes es veuran afectats davant els canvis que es produeixen durant l'envelliment. S'ha associat la disminució de les capacitats cognitives i motores lligada a l'envelliment amb la disminució de neurotransmissors monoaminèrgics, principalment en l'hipocamp i el cos estriat (Ramis *et al.*, 2016, 2020; Tsunemi *et al.*, 2005). Aquest fet és degut a que els enzims implicats en la síntesi de les monoamines, com la tirosina hidroxilasa (TH) i la triptòfan hidroxilasa (TPH), són susceptibles a danys oxidatius i es veuen afectats en presència d'espècies reactives d'oxigen (Cash, 1998; De La Cruz *et al.*, 1996; Hussain i Mitra, 2004).

Les monoamines es sintetitzen i s'alliberen en les terminals nervioses de regions cerebrals com l'hipocamp i el cos estriat, que estan relacionades amb processos cognitius i motors com l'aprenentatge i la memòria (Esteban *et al.*, 2010a, 2010b; Ramis *et al.*, 2016). Totes les monoamines deriven d'aminoàcids aromàtics com la tirosina o el triptòfan. Els neurotransmissors de tipus monoamina inclouen principalment la dopamina (DA), noradrenalina (NA) i la 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina), juntament amb els seus precursors i metabòlits (Ma *et al.*, 2020).

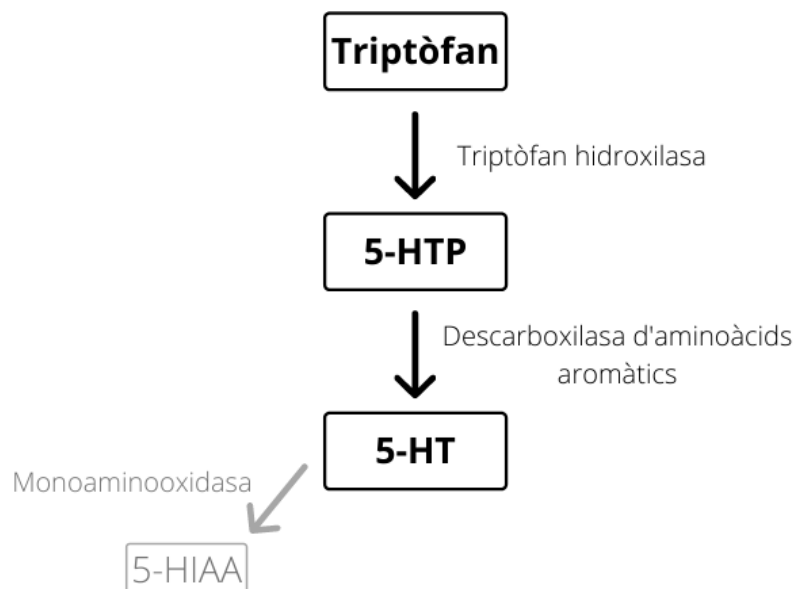
La DA i la NA es sintetitzen a partir de la tirosina, que es transforma en L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina). A continuació, aquesta es transforma en DA, i finalment en NA (Figura 1). La DA també es pot metabolitzar en HVA (Àcid Homovanílic) mitjançant l'enzim monoamino oxidasa (MAO). La tirosina hidroxilasa (TH) és l'enzim limitant d'aquesta via i catalitza el primer pas de la reacció. (Felten i Shetty, 2010; Fernstrom i Fernstrom, 2007).

D'aquesta manera, la síntesi de DA i NA estan determinats majoritàriament per l'activitat d'aquest enzim.



**Figura 1.** Esquema de la síntesi de dopamina i noradrenalina

Per altra banda, la serotonina es sintetitza a partir de triptòfan, que es transforma en 5-HTP (5-hidroxitriptòfan) i aquest posteriorment en 5-HT (Figura 2). Finalment, aquesta es pot metabolitzar en 5-HIAA (àcid 5-hidroxiindoleacètic) mitjançant la MAO. La triptòfan hidroxilasa (TPH) és l'enzim limitant de la síntesi de 5-HT, i catalitza la conversió de triptòfan en 5-HTP (Felten i Shetty, 2010).



**Figura 2.** Esquema de la síntesi de serotonina

### **c. Prevenció de l'envelliment amb polifenols: cervesa**

Durant els darrers anys s'han desenvolupat diverses estratègies per revertir els canvis de l'envelliment, millorar la memòria i prevenir o retardar l'aparició de trastorns neurodegeneratius associats a l'edat (Srivivas i Thakur, 2019). A més, s'ha observat que mantenir un estil de vida saludable i una dieta nutricional adequada és beneficiós per prevenir o retardar els efectes nocius de l'envelliment (Dhalaria *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2021). Concretament, els polifenols presenten propietats antiinflamatòries i antioxidants que permeten prevenir o retardar diverses malalties associades a l'edat, incrementant així l'esperança de vida (Joseph *et al.*, 2005; Manach *et al.*, 2004). S'ha observat que tenen efectes beneficiosos com a agents antienvelliment, mitjançant la modulació de les propietats distintives de l'envelliment com la inflamació, el dany oxidatiu, el desgast telomèric i la senescència cel·lular (Dhalaria *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018).

A nivell cerebral, els polifenols també són beneficiosos per millorar els efectes adversos de l'envelliment sobre el sistema nerviós o el cervell. Aquests compostos tenen la capacitat de creuar la barrera hematoencefàlica (BBB, de l'anglès *Blood Brain Barrier*), pel que podran arribar al teixit cerebral (Pandey i Rizvi, 2009). S'han associat els efectes protectors dels antioxidants, com els polifenols, amb la recuperació o protecció dels sistemes monoaminèrgics. Concretament, s'ha suggerit que poden protegir els enzims implicats en les rutes monoaminèrgiques com la TPH, TH i MAO contra el dany oxidatiu (Sarubbo *et al.*, 2015). Tot i això, encara es desconeixen els mecanismes moleculars lligats a les propietats beneficioses dels polifenols (Sarubbo *et al.*, 2018).

Els polifenols es troben principalment en cereals, fruites, verdures i begudes (Gupta *et al.*, 2019; Manach *et al.*, 2004). Entre les begudes riques en polifenols, s'ha observat que el vi negre, per la presència de resveratrol (compost polifenòlic) posseeix propietats neuroprotectores (Neafsey i Collins, 2011). També s'ha observat que el consum de te verd, ric en polifenols, permet retardar la senescència cerebral i millorar la qualitat de vida (Ramis *et al.*, 2020). Seguint aquesta línia, en els darrers anys s'ha incrementat l'interès nutricional de la cervesa degut a la presència de quantitats significatives de polifenols i baix contingut d'etanol (Elrod, 2018; Martinez-Gomez *et al.*, 2020).

La cervesa està formada a partir d'aigua, d'ordi maltat, de llúpul i de llevat. És rica en nutrients com carbohidrats, aminoàcids, minerals, vitamines, polifenols i altres composts (Arranz *et al.*, 2012). Els polifenols de la cervesa provenen principalment del l'ordi (aproximadament el 70 %) i del llúpul (al voltant del 30 %). A més d'aquests components, la cervesa també conté etanol i altres alcohols, tot i que en concentracions relativament baixes (Olas i Brys, 2020).

S'ha suggerit que el consum baix o moderat de cervesa ( $\leq 2$  begudes al dia per homes i  $\leq 1$  per dones) pot reduir el risc de deteriorament cognitiu i el desenvolupament de demència. Per contra, el consum excessiu d'alcohol ( $>3-4$  begudes al dia) s'ha associat amb un major risc de deteriorament cognitiu i demència (Ano *et al.*, 2019; Neafsey i Collins, 2011). No obstant, tot i ser la beguda alcohòlica més beguda en el món, encara no hi ha evidències sobre l'efecte protector de la ingesta moderada de cervesa sobre els sistemes monoaminèrgics.



## **d. Hipòtesi i objectius de l'estudi**

En aquest estudi es va plantejar si la ingesta moderada de cervesa presentava efectes beneficiosos sobre els sistemes monoaminèrgics. A més, es va plantejar si aquest efecte era diferent en un consum continuat o exclusiu durant dos dies de la setmana.

Per tant, l'objectiu general d'aquest treball és analitzar si la cervesa presenta propietats neuroprotectores davant l'envelliment i analitzar si el seu consum continuat o el seu abús únicament durant el cap de setmana afecta aquestes propietats beneficioses.

A més, es va plantejar l'objectiu específic d'analitzar si hi ha un efecte diferenciat de la presència d'alcohol en la cervesa.

## **MATERIAL I MÈTODES**

### **a. Animals d'experimentació**

Per dur a terme l'estudi es van utilitzar rates femelles velles (18 mesos a l'inici de l'experiment,  $343 \pm 9$  g). Les rates es col·locaren en parelles dins gàbies translúcides, amb accés lliure a menjar estàndard (Panlab A04) i aigua. Durant tot l'experiment els individus es mantingueren en l'estabulari de la Universitat de les Illes Balears (Tipus II, Institute for Laboratory Animal Research (ILAR)) sota condicions ambientals controlades (temperatura:  $22 \pm 2$  °C; humitat: 50-60 %; cicle de llum/fosc de 12 h, llum de 8:00 a 20:00 h).

Tots els procediments es van dur a terme d'acord amb les directrius ètiques de la Convenció Europea per a la Protecció d'Animals Vertebrats utilitzats amb fins experimentals i d'altres científics (Directiva 86/609 / CEE), i d'acord amb la Comissió de Bioètica de la Universitat de les Illes Balears.

### **b. Tractaments i disseny experimental**

Les rates es van dividir en dos grups segons el període de tractament: *consum continuat* (n=8) i *consum abusiu de cap de setmana* (n=8). Dins cada un d'aquests dos grups es van dividir en dos subgrups segons les característiques del tractament: cervesa amb alcohol (n=4) i cervesa sense alcohol (n=4). A més, es va establir un grup control (n=6).

L'administració dels tractaments es va dur a terme durant 3 mesos, entre les 12:00 i les 14:00 h del migdia. El subministrament es va fer a través de biberons (per via oral), i es van tenir en compte les variacions de pes entre les rates per ajustar la dosi al pes real dels animals.

A les rates del grup *consum continuat* es va subministrar una dosi de cervesa (amb alcohol o sense alcohol segons el subgrup) equivalent a una dosi diària de dues cerveses en humans (adult de 70 kg), que correspon a 34 ml/kg. Per altra banda, al grup de *consum abusiu durant el cap de setmana* es va administrar exclusivament cervesa durant dos dies de la setmana (els altres dies aigua), d'igual forma en totes les condicions (cervesa amb alcohol i sense alcohol). Finalment, al grup control només es va subministrar aigua durant tot el període de l'experiment.

### c. Dissecció i recollida de mostres

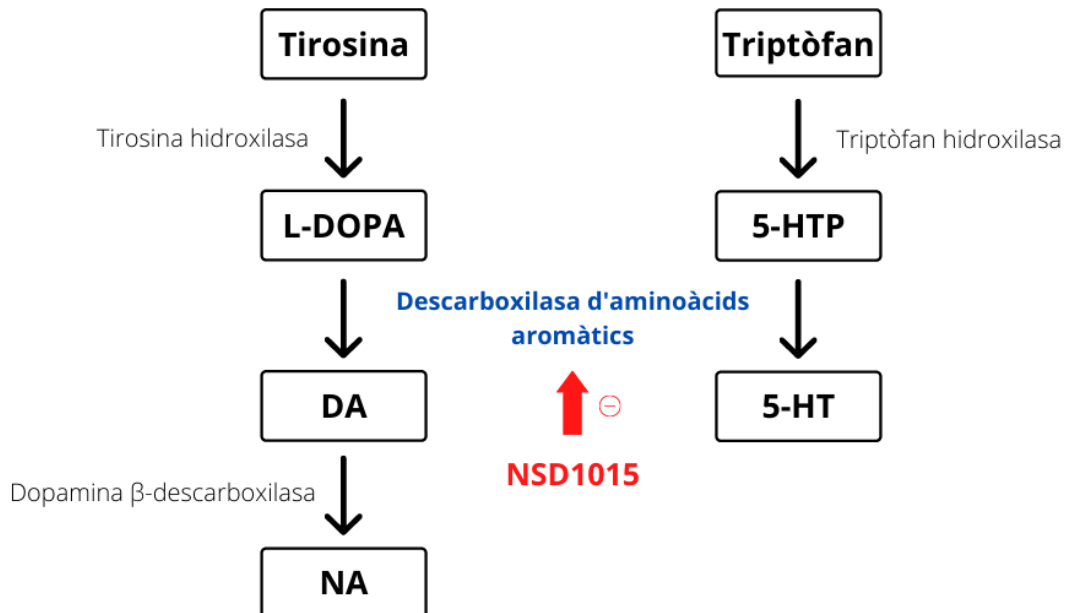
Una vegada acabat el període d'administració dels tractaments, les rates es van sacrificar per decapitació. El sacrifici es va dur a terme un dia després de la finalització dels tractaments, a primera hora del matí (durant el canvi fosc/llum).

Per tal d'analitzar la síntesi de les monoamines, es va administrar a totes les rates un inhibidor de la descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics NSD 1015 (100 mg/kg, per via intraperitoneal) 30 min abans del seu sacrifici (veure més avall). Els cervells es van retirar ràpidament i es van disseccionar sobre una placa freda amb gel per separar l'hipocamp i el cos estriat de l'hemisferi esquerre. Les regions cerebrals seleccionades es van congelar immediatament en nitrogen líquid i posteriorment es van guardar a -80 °C fins el seu anàlisi (Esteban *et al.*, 2010a).

### d. Determinació de la síntesi de 5-HT, DA i NA

En condicions normals, la tirosina es transforma en L-DOPA mitjançant la TH, enzim limitant de la reacció. A continuació, la L-DOPA es transforma ràpidament en DA o NA. Per altra banda, el triptòfan es transforma en 5-HTP mitjançant la TPH, que també és l'enzim limitant de la reacció. Posteriorment, el 5-HTP es transforma ràpidament en 5-HT.

El clorhidrat de 3-hidroxibenzil-hidrazina (NSD 1015) és un compost que inhibeix l'activitat de la descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics, la qual catalitza el pas de L-DOPA a DA o NA, i de 5-HTP a 5-HT (Figura 3). D'aquesta manera, inhibint aquest pas s'obté l'acumulació dels dos precursors en un temps determinat, que serà directament proporcional a l'activitat de la TH i la TPH.



**Figura 3.** Esquema de l'efecte del NSD1015 sobre les vies de síntesi de monoamines.

Per tant, per tal d'analitzar la síntesi *in vivo* de la DA, NA i 5-HT després dels tractaments, es va mesurar l'activitat dels dos enzims limitadors de la síntesi de les monoamines (TH i TPH) mitjançant l'acumulació de 5-HTP i L-DOPA en els 30 minuts després de la injecció d'una dosi

màxima efectiva de NSD 1015 (100 mg/kg, per via intraperitoneal) (Carlsson i Lindqvist, 1973).

L'acumulació de L-DOPA al cos estriat indica preferentment la síntesi de DA, mentre que a l'hipocamp, es relaciona principalment amb la síntesi de NA (Esteban *et al.*, 2010a). D'aquesta manera, es va mesurar la síntesi de DA en el cos estriat, una regió rica en terminals dopaminèrgics, i la síntesi de NA a l'hipocamp, una zona rica en terminals nervioses noradrenèrgiques. Per altra banda, l'acumulació de 5-HTP indica la síntesi de 5-HT en ambdues regions cerebrals ja que les dues son riques en terminals nervioses serotoninèrgics.

Aquest mètode també permet quantificar el conjunt de 5-HT, DA i NA emmagatzemat prèviament a les neurones i que no s'ha vist afectat per la síntesi recent. A més, també permet determinar els nivells d'alguns metabòlits monoaminèrgics com l'àcid 5-hidroxiindolacètic (5-HIAA) i l'àcid homovanílic (HVA), indicant l'ús recent dels neurotransmissors (Sarubbo *et al.*, 2018).

Tots aquests compostos (monoamines, precursors i metabòlits) es van determinar simultàniament per cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC, de l'anglès *High Performance Liquid Chromatography*) amb detecció electroquímica.

#### **e. Preparació de les mostres**

Les regions congelades d'hipocamp i de cos estriat, ambdós de l'hemisferi esquerre, es van pesar i homogeneïtzar en una proporció 1:10 pes/volum de tampó d'homogeneïtzació fred ( $K_2EDTA$  0,01 %, 50 mg de  $Na_2S_2O_5$  0,1% i 2,18 ml de  $HClO_4$  0,4 M). Es va utilitzar un homogeneïtzador Ultra-Turrax a alta velocitat dues vegades durant 10 segons (deixant 10 segons entre cada homogeneïtzador). Els homogenats obtinguts es van centrifugar a 18.199 rpm durant 20 min a 4 °C. A continuació, el sobrenedant resultant es va filtrar mitjançant un filtre de xeringa de 0,45 µm de diàmetre de porus i es van guardar a -80 °C fins la seva anàlisi per HPLC amb detecció electroquímica.

#### **f. Determinació cromatogràfica de la síntesi de monoamines (HPLC)**

Els nivells de monoamines i dels seus precursors i metabòlits es van determinar mitjançant cromatografia líquida d'alta eficàcia amb detecció electroquímica (HPLC-ED). Es van injectar diverses alíquotes de 30 µl dels sobrenedants de les mostres d'hipocamp i estriat al sistema HPLC.

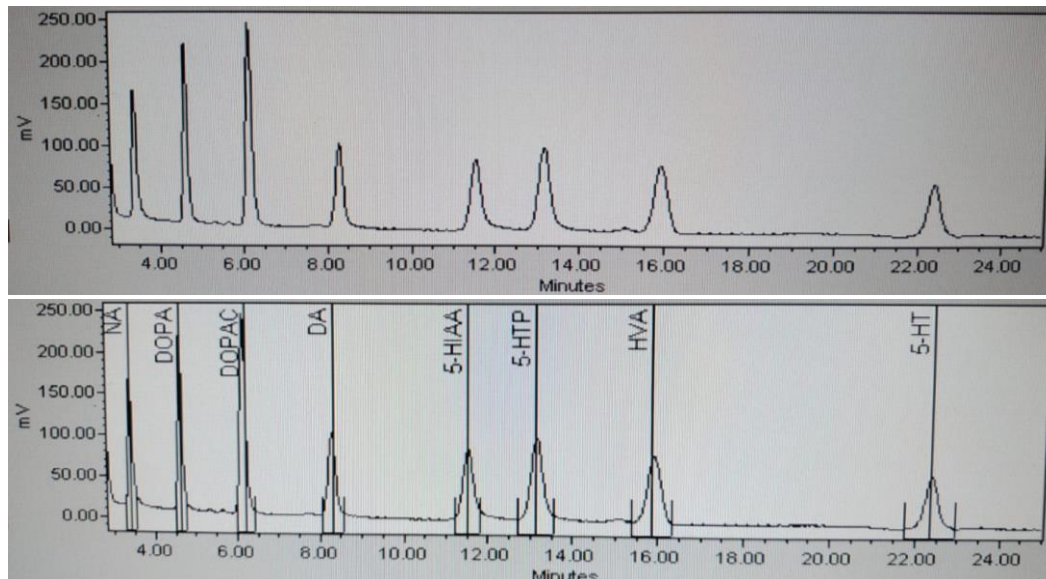
Per a la separació dels diferents composts, es va utilitzar una columna de fase reversa (Spherisorb S3 ODS1; 5 µm de mida de partícula; 4,6 mm x 100 mm, a 35 °C; Waters) acoblada a una precolumna Tracer ODS2 C18 (2-5 µm de mida de partícula; Teknokroma).

La fase mòbil, que consistia en  $KH_2PO_4$  0,1 M, àcid octà sulfònic (OSA) 2,1 M,  $K_2EDTA$  0,1 M,  $KCl$  2 mM i metanol 10 % (v/v) (pH 2,72-2,76 ajustat amb  $H_3PO_4$  85 %), va ser impulsat per una bomba de doble pistó tipus Waters 600 a un flux de 0,8 ml/min.

Els diferents composts van ser detectats electroquímicament, mantenint un potencial aplicat de + 0,75 V contra l'elèctrode de referència *in situ* (Ag/AgCl) (Waters 2465 Electrochemical

Detector). El corrent generat va ser captat per un ordinador a través d'una interfase (Waters busSAT/IN Module).

Per tal de quantificar les concentracions de les monoamines (NA, DA i 5-HT), dels seus precursors (DOPA i 5-HTP), i dels seus metabòlits (HVA i 5-HIAA) de les mostres, es va realitzar prèviament una corba estàndard a partir de solucions preparades de cada compost a estudiar (Figura 4). Posteriorment, les quantitats dels composts de les mostres es van calcular interpolant els pics de la corba resultant en la corba estàndard, mitjançant el software Empower Pro (Waters). Es va tenir en compte el pes i la dilució de la mostra i el volum injectat per corregir les dades de les concentracions.



**Figura 4.** Representació de l'anàlisi cromatogràfic corresponent a un estàndard. En la figura superior s'observen els pics de cada compost, i en la figura inferior el compost al que correspon el pic. S'identifiquen, per ordre d'aparició: NA, DOPA, DOPAC (no quantificat), DA, 5-HIAA, 5-HTP, HVA i 5-HT.

### g. Anàlisi estadístic

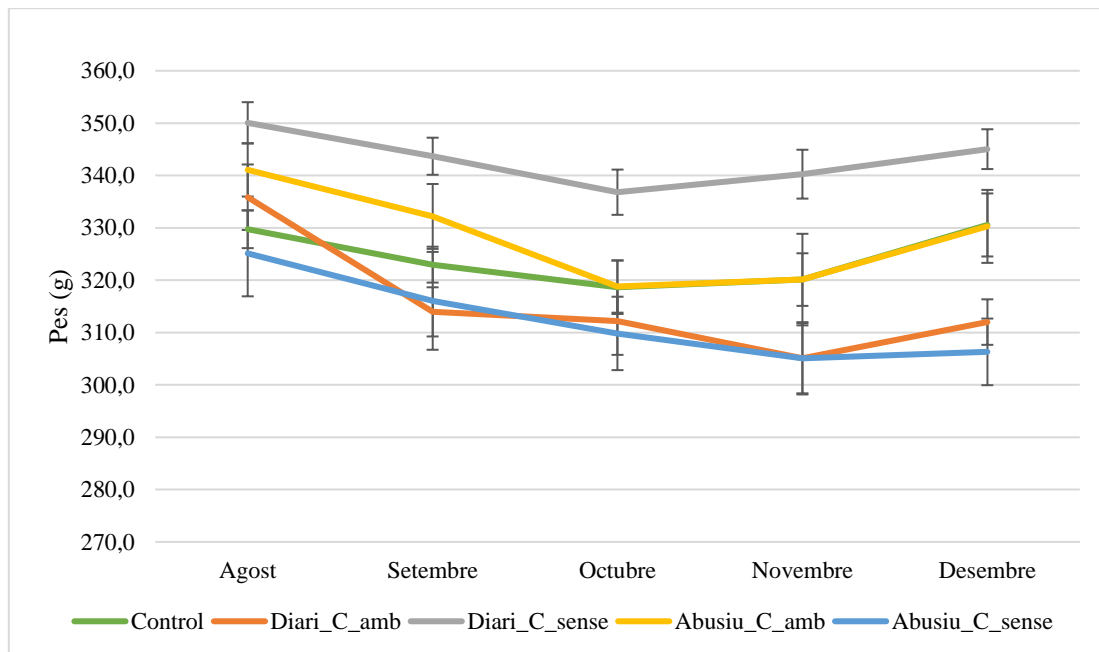
Tots els resultats obtinguts es van analitzar mitjançant el programa estadístic RStudio (Horton i Kleinman, 2015). Per la comparació de més de dos grups experimentals, com és el cas de la comparació entre el control, el consum continuat i l'abús en l'estriat, s'empraren ANOVAs (de l'anglès *ANalysis Of VAriances*) d'un factor o ANOVA de Welch. En els casos en què hi va haver diferències significatives, es van realitzar els tests *a posteriori* de Bonferroni (ANOVA d'un factor) i de Games-Howell (ANOVA de Welch). Per la comparació de dos grups experimentals, com és el cas de la comparació entre la cervesa amb alcohol i sense alcohol, i entre el control i el consum diari en l'hipocamp, es van realitzar tests t de Student, T de Welch o Wilcoxon-Mann-Whitney.

Els resultats s'han expressat com mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana (SEM), i en tots els casos es va considerar com estadísticament significatiu quan  $p \leq 0,05$  amb un interval de confiança del 95 %.

## RESULTATS

### a) Estat dels animals

Es va analitzar l'estat dels animals durant l'experiment mitjançant el pes corporal per veure si el tractament afectava a aquest. Tal i com es veu en la Figura 5, tots els tractaments mostren el mateix patró: una davallada lleu del pes. D'aquesta manera, no es veu un efecte diferenciat del pes dels animals segons el tractament.



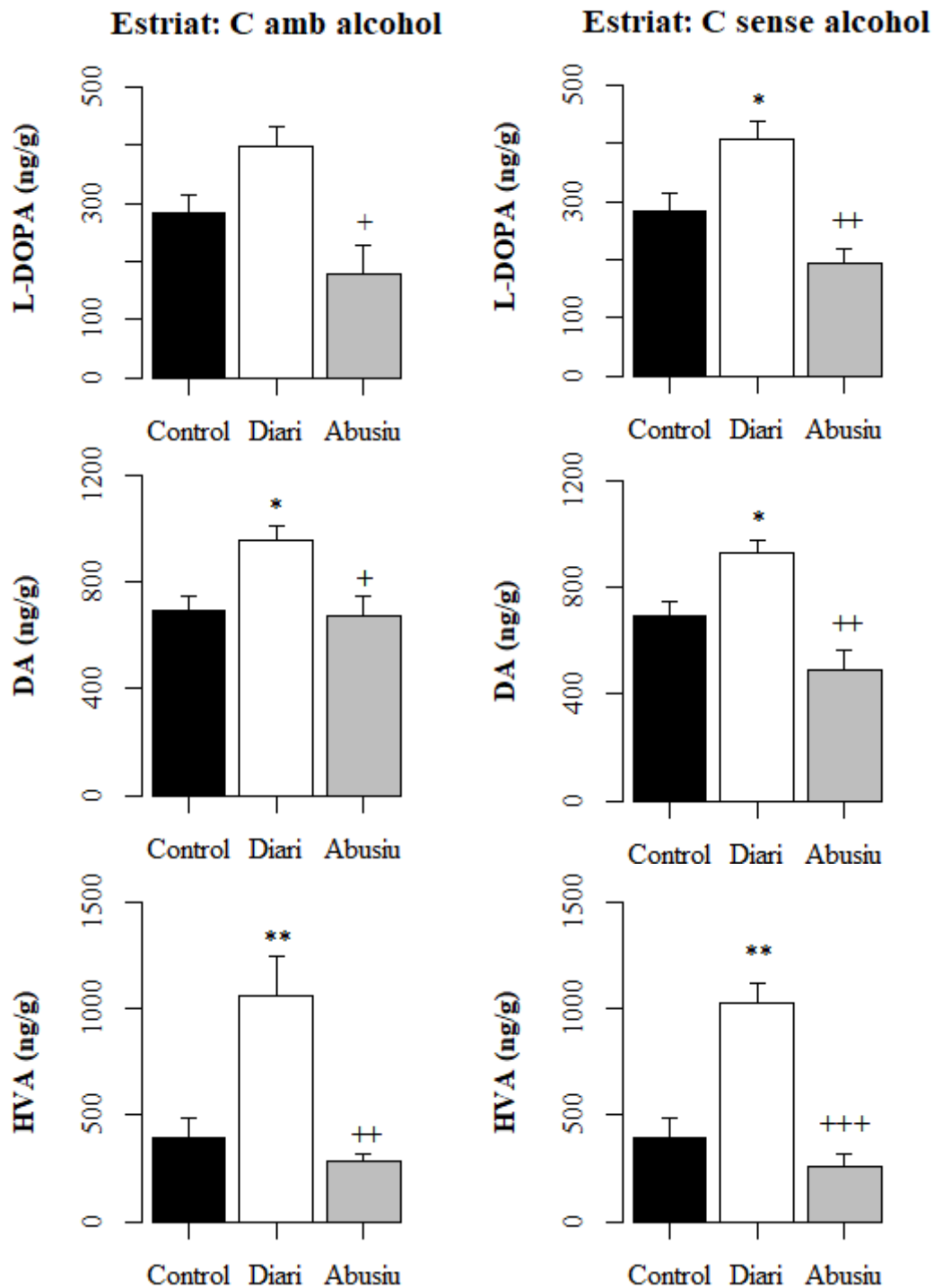
**Figura 5.** Representació del pes de les rates al llarg de l'experiment segons el tipus de tractament. Les línies representen les mitjanes de cada grup en funció del temps  $\pm$  l'error estàndard de la mitjana.

Un altre fet informatiu de l'estat de les rates és que algunes d'elles van desenvolupar tumors mamaris. Per aquest motiu, algunes es van haver de sacrificar d'acord amb les directrius ètiques.

Per altra banda, es va observar el consum de cervesa per part de les rates ja que, al ser en biberons, la quantitat de cervesa ingerida és voluntària. Es va observar que les rates s'acabaven el contingut de cervesa que s'administrava als biberons. A més, es va veure una preferència de les rates per la cervesa en comparació amb l'aigua, tot i que no es va quantificar.

### b) Estriat

A la zona de l'estriat, rica en neurones dopaminèrgiques i serotoninèrgiques, es va analitzar l'estat dels sistemes monoaminèrgics principals en funció del tractament que es va aplicar. Es va analitzar la diferència entre el grup control (aigua diàriament), el grup de consum continuat (cervesa diàriament) i el grup de consum abusiu (cervesa exclusiva dos dies de la setmana). Aquesta comparativa es va realitzar tant amb la cervesa amb alcohol com amb la cervesa sense alcohol. Posteriorment, es van comparar els nivells dels precursors, monoamines i metabòlits en funció del tipus de cervesa per analitzar si hi havia diferències entre la cervesa amb alcohol i la cervesa sense alcohol.



**Figura 6.** Efecte del consum continuat (n=4; barres blanques) o abusiu (n=4; barres grises) de cervesa amb alcohol (esquerra) o sense alcohol (dreta), en comparació amb rates control (n=6; barres negres), sobre el sistema dopaminèrgic en l'estriat. Les barres representen les mitjanes  $\pm$  error estàndard de la mitjana (ng/g de teixit) de l'acumulació de DOPA (durant 30 minuts després de la inhibició de la descarboxilasa amb NSD 1015), el contingut tissular de DA, i els nivells del metabòlit HVA. Per l'anàlisi estadístic es va dur a terme un ANOVA d'un factor, seguit de la prova *a posteriori* de Bonferroni: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 en comparació amb el grup control; + p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 en comparació amb el grup de consum continuat (diari).

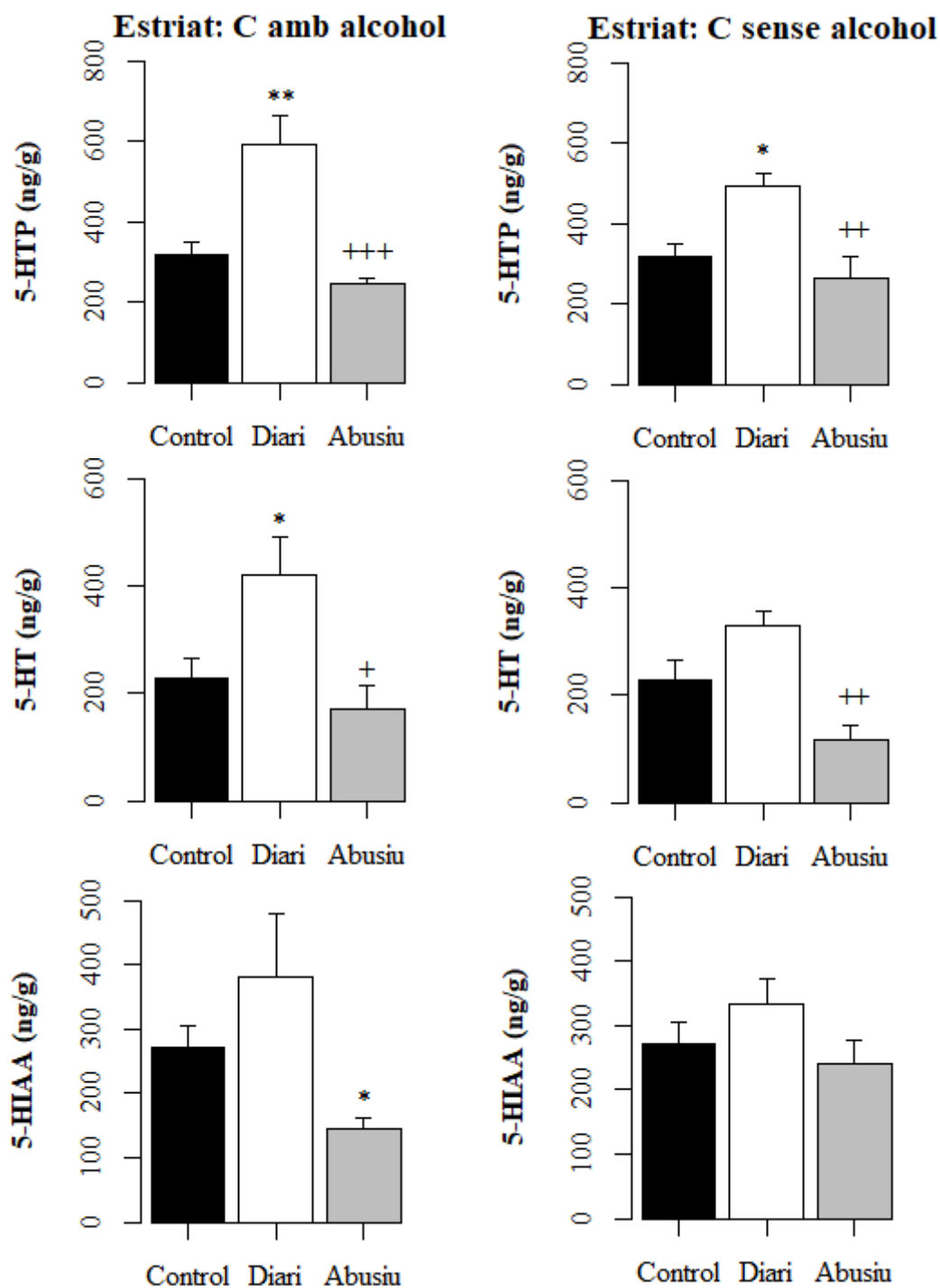
Quant al sistema dopaminèrgic, el consum continuat, tant de cervesa amb alcohol com sense alcohol, va induir una millora del sistema dopaminèrgic de l'estriat en les rates (Figura 6). Concretament, en el grup de cervesa amb alcohol es va produir un increment estadísticament significatiu [ANOVA  $F_{(2,11)} = 10,04$ ,  $p = 0,003$ ; Bonferroni  $p = 0,047$ ] dels nivells de L-DOPA, el que suggereix un augment de l'activitat de la TH a l'estriat. En canvi, tot i que pareix que hi hagi un augment en el consum continuat de cervesa amb alcohol, no va assolir significació estadística [ANOVA  $F_{(2,11)} = 7,14$ ,  $p = 0,01$ ; Bonferroni  $p = 0,155$ ]. Altrament, ambdues cerveses van implicar un augment estadísticament significatiu del contingut total de dopamina [ANOVA esquerre  $F_{(2,11)} = 6,84$ ,  $p = 0,012$ ; Bonferroni  $p = 0,023$ ] [ANOVA dret  $F_{(2,11)} = 12,76$ ,  $p = 0,001$ ; Bonferroni  $p = 0,001$ ] i del metabòlit HVA [ANOVA esquerre  $F_{(2,11)} = 11,76$ ,  $p = 0,002$ ; Bonferroni  $p = 0,005$ ] [ANOVA dret  $F_{(2,11)} = 18,77$ ,  $p = 0,0003$ ; Bonferroni  $p = 0,001$ ], el que suggereix un augment de la neurotransmissió dopaminèrgica.

Per contra, en el consum abusiu de cervesa durant dos dies de la setmana, tot i que pareix que hi ha una lleugera disminució, no hi va haver en cap dels casos diferències significatives respecte al control (Bonferroni  $p > 0,05$  en tots els casos). No obstant, si que es varen observar en tots els casos diferències estadísticament significatives del consum abusiu respecte al consum diari (Bonferroni  $p < 0,05$  en tots els casos). Concretament, el consum abusiu presenta valors més baixos que el consum continuat.

Per altra banda, a la Figura 7 s'observa que el consum continuat tant de cervesa amb alcohol com sense alcohol, va augmentar l'activitat de TPH (mesurada com l'acumulació de 5-HTP) [ANOVA esquerre  $F_{(2,11)} = 16,26$ ,  $p = 0,0005$ ; Bonferroni  $p = 0,002$ ] [ANOVA dret  $F_{(2,11)} = 8,34$ ,  $p = 0,006$ ; Bonferroni  $p = 0,024$ ], el que indica un augment de la síntesi de 5-HT. En conseqüència, el contingut total de serotonina també va augmentar, tot i que només va assolir significació estadística el grup de la cervesa amb alcohol [ANOVA  $F_{(2,11)} = 6,59$ ,  $p = 0,013$ ; Bonferroni  $p = 0,045$ ]. A més, no es va observar cap efecte significatiu del consum de cervesa en la neurotransmissió serotoninèrgica en la regió de l'estriat, ja que no es van observar diferències en els nivells del metabòlit 5-HIAA en comparació amb el grup control ( $p > 0,05$  en els dos casos).

En el consum abusiu pareix que hi ha una lleugera disminució dels nivells de 5-HTP i 5-HT respecte al control, però en cap cas no va donar diferències significatives ( $p > 0,05$ ). Per contra, en el grup de la cervesa amb alcohol, es va veure una disminució significativa dels nivells de 5-HIAA respecte al control (ANOVA  $F_{(2,11)} = 6,88$ ,  $p = 0,031$ ; Bonferroni  $p = 0,034$ ). Finalment, el consum abusiu durant dos dies va mostrar diferències significatives respecte al consum diari en la síntesi (Bonferroni esquerre  $p = 0,0007$ ) (Bonferroni dret  $p = 0,008$ ) i acumulació de 5-HT (Bonferroni esquerre  $p = 0,017$ ) (Bonferroni dret  $p = 0,005$ , però no en la neurotransmissió serotoninèrgica (nivells de 5-HIAA) ( $p > 0,05$ )).

D'aquesta manera, el consum continuat de cervesa va induir una millora en els sistemes monoaminèrgics de l'estriat, tot i que es va veure un efecte més lleu al sistema serotoninèrgic, ja que en molts casos no va assolir significació estadística. Tot i això, en els casos del sistema serotoninèrgic en què es van donar un augment significatiu, aquest va ser al voltant del doble respecte al control.



**Figura 7.** Efecte del consum continuat (n=4; barres blanques) o abusiu (n=4; barres grises) de cervesa amb alcohol (esquerra) o sense alcohol (dreta), en comparació amb rates control (n=6; barres negres), sobre el sistema serotoninèrgic en l'estriat. Les barres representen les mitjanes  $\pm$  error estàndard de la mitjana (ng/g de teixit) de l'acumulació 5-HTP (durant 30 minuts després de la inhibició de la descarboxilasa amb NSD 1015), el contingut tissular de 5-HT, i els nivells del metabòlit 5-HIAA. Per l'anàlisi estadístic es va dur a terme un ANOVA d'un factor o ANOVA de Welch (5-HIAA), seguit de la prova *a posteriori* de Bonferroni o Games-Howell, respectivament: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  en comparació amb el grup control; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$  en comparació amb el grup de consum continuat (diari).



Després de l'anàlisi de l'efecte del tipus de consum de cervesa sobre els sistemes monoaminèrgics, es va analitzar si el tipus de cervesa (amb alcohol o sense alcohol) mostrava efectes diferents.

Respecte al sistema dopaminèrgic, l'activitat de la TH (acumulació de L-DOPA) no va mostrar diferències entre els tipus de cervesa ni en el consum continuat ni en l'abús (Figura 8). L'acumulació de DA i els nivells de HVA pareixen una mica inferiors en el consum abús de cervesa sense alcohol respecte a la cervesa amb alcohol, tot i que no va ser suficient per donar significació estadística. En el consum continuat no es va veure una diferència entre el tipus de cervesa en cap dels casos.

Quant al sistema serotoninèrgic de l'estriat, el consum continuat de cervesa sense alcohol pareix que va disminuir l'activitat de la TPH (acumulació de 5-HTP), l'acumulació de 5-HT i la neurotransmissió serotoninèrgica (Figura 9). No obstant, en cap cas va ser estadísticament significatiu.

Per altra banda, sembla que el consum abús de cervesa sense alcohol va induir un augment en la síntesi de 5-HT (nivell de 5-HTP) i en la neurotransmissió (nivell de 5-HIAA). En aquest cas, només va donar significatiu l'augment dels nivells del metabòlit (T de Student  $t = -2,50$ ,  $gl = 6$ ,  $p = 0,047$ ). Finalment, en el consum abús de cervesa sense alcohol, tot i que pareix que hi ha una lleu disminució, no es van trobar diferències estadístiques en l'acumulació de 5-HT.

D'aquesta manera, en la majoria dels casos el tipus de cervesa (amb alcohol o sense alcohol) no va influir en els sistemes dopaminèrgics i serotoninèrgics de l'estriat.

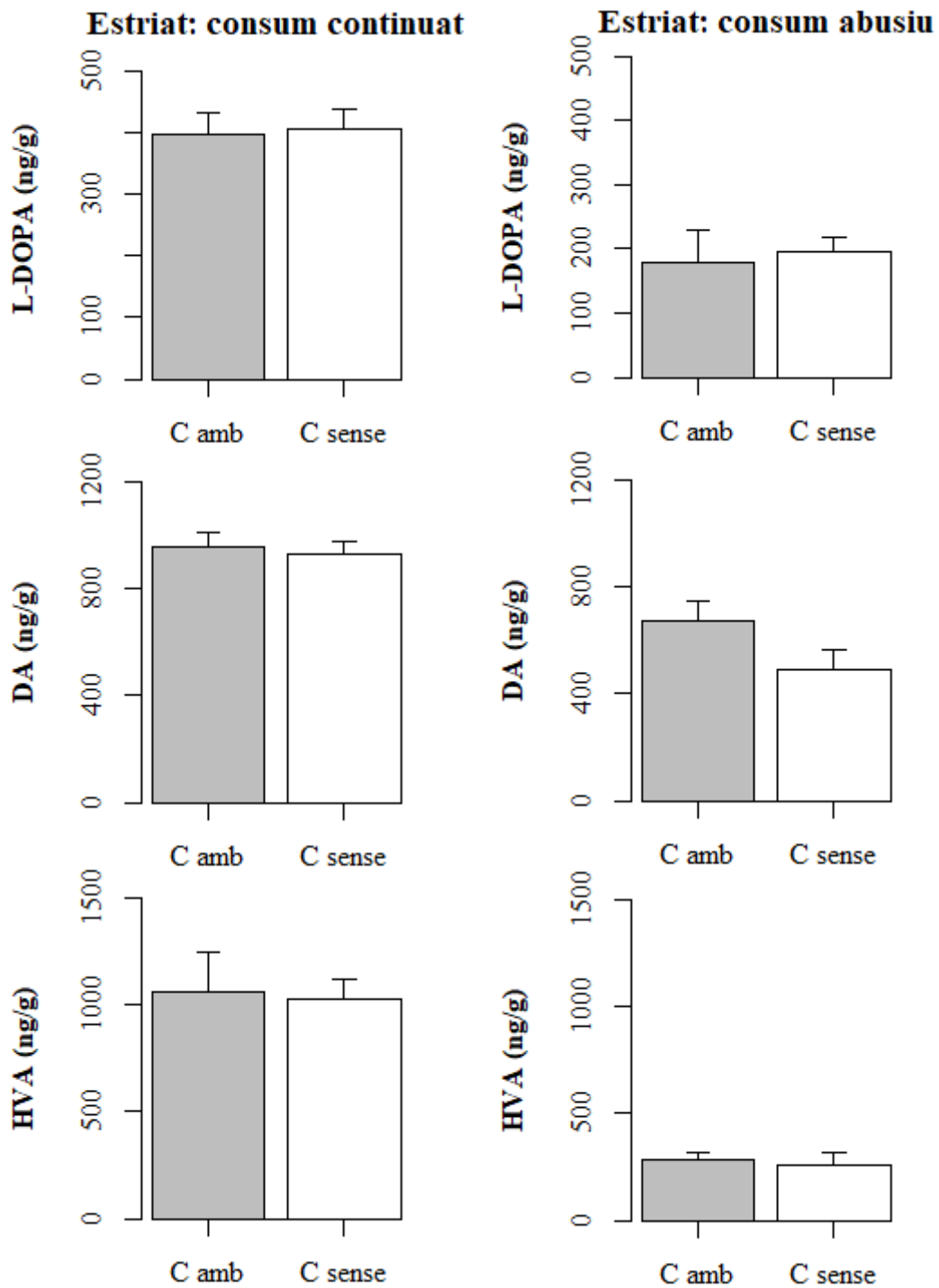
### **c) Hipocamp**

L'hipocamp, igual que l'estriat és una zona rica en neurones serotoninèrgiques, però pobre en dopaminèrgiques. A diferència de l'estriat, en l'hipocamp predominen les neurones noradrenèrgiques. Per aquest motiu, es van analitzar els nivells de L-DOPA, NA, 5-HTP, 5-HT i 5-HIAA. El mètode utilitzat per la determinació d'aquests composts no permet detectar cap metabòlit de la NA, pel que no es pot analitzar el seu metabolisme.

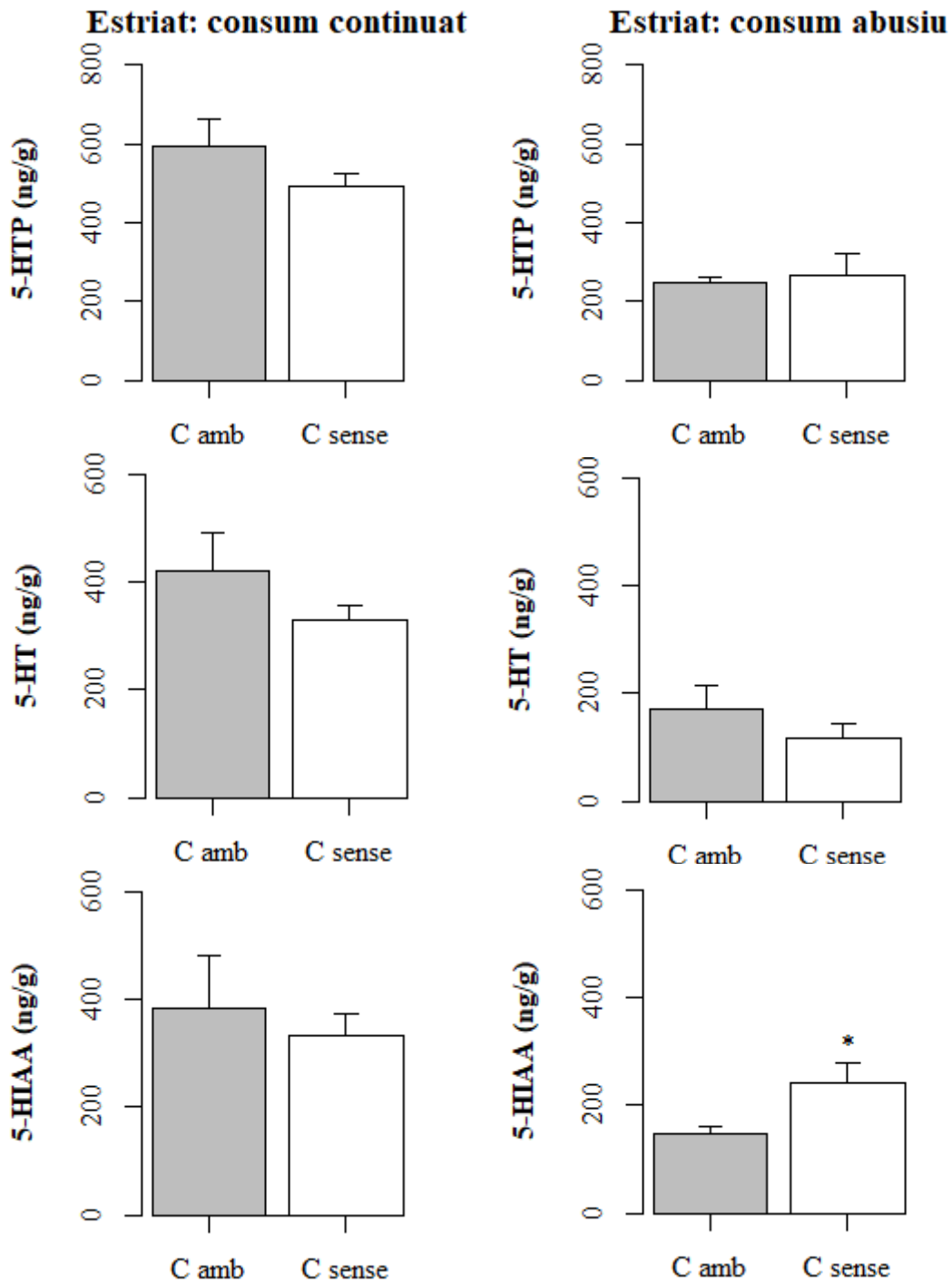
Igual que en l'estriat, es va fer la comparativa entre el grup control, el consum continuat i el consum abús, tant de cervesa amb alcohol com sense alcohol. A més, també es va analitzar si hi havia diferència entre els dos tipus de cervesa (amb alcohol o sense alcohol).

No obstant, de les dades de l'hipocamp del consum abús només es va poder analitzar una mostra, pel que s'ha representat en les figures (sense l'error) però no s'ha utilitzat per fer l'anàlisi estadístic.

Tal i com es pot observar en la Figura 10, el consum diari tant de cervesa amb alcohol com sense alcohol pareix disminuir l'activitat de la TH a l'hipocamp (mesurada com l'acumulació de L-DOPA en aquesta regió) respecte al control, però no suficient com per donar diferències estadísticament significatives. De la mateixa manera, el consum continuat de cervesa amb alcohol sembla disminuir, sense significació estadística, el contingut total de NA de l'hipocamp. En canvi, el consum diari de cervesa sense alcohol pareix que disminueix els valors de NA, tot i que no s'han aconseguit diferències estadístiques.



**Figura 8.** Efecte del consum continuat (esquerra) o abusiu (dreta) de cervesa amb alcohol (n=4; barres grises) en comparació amb el consum de cervesa sense alcohol (n=4; barres blanques) sobre el sistema dopaminèrgic en l'estriat. Les barres representen les mitjanes  $\pm$  error estàndard de la mitjana (ng/g de teixit) de l'acumulació de DOPA (durant 30 minuts després de la inhibició de la descarboxilasa amb NSD 1015), el contingut tissular de DA, i els nivells del metabòlit HVA. Per l'anàlisi estadístic es va dur a terme un test t de Student: no es van detectar diferències significatives entre els dos grups ( $p > 0,05$  en tots els casos).



**Figura 9.** Efecte del consum continuat (esquerra) o abusiu (dreta) durant dos dies de la setmana de cervesa amb alcohol (n=4; barres grises) en comparació amb el consum de cervesa sense alcohol (n=4; barres blanques) sobre el sistema serotoninèrgic en l'estriat. Les barres representen les mitjanes  $\pm$  error estàndard de la mitjana (ng/g de teixit) de l'acumulació de 5-HTP (durant 30 minuts després de la inhibició de la descarboxilasa amb NSD 1015), el contingut tissular de 5-HT, i els nivells del metabòlit 5-HIAA. Per l'anàlisi estadístic es va dur a terme un test t de Student: \*  $p < 0,05$ .

Per altra banda, el consum abusiu de cervesa amb alcohol pareix augmentar l'activitat de la TH, augmentant així la síntesi de NA. En conseqüència, el contingut total de NA també pareix augmentat. Per contra, la cervesa sense alcohol sembla que tendria l'efecte oposat, disminuint els nivells de L-DOPA i NA. No obstant, no s'ha pogut dur a terme cap anàlisi estadístic amb aquestes dades ja que només es va poder extreure el valor d'una sola mostra.

L'ús recent de la NA no es pot avaluar ja que no es varen poder detectar metabòlits del neurotransmissor a l'hipocamp.

Quant al sistema serotoninèrgic, el consum continuat de cervesa, en comparació amb el control, pareix tenir un patró similar a l'estriat (Figura 11). L'activitat de la TPH (acumulació de 5-HTP) no es veu incrementada amb el consum continuat de cervesa, independentment del tipus de cervesa. En canvi, el contingut tissular de 5-HT sí mostra un augment estadísticament significatiu amb el consum continuat de cervesa amb alcohol (T de Welch  $t = -4,46$ ,  $gl = 3,22$ ,  $p = 0,018$ ) o cervesa sense alcohol (T de Welch  $t = -3,24$ ,  $gl = 3,02$ ,  $p = 0,047$ ). De fet, la cervesa sense alcohol augmenta gairebé el triple els nivells de 5-HT, i la cervesa amb alcohol aproximadament el doble. De la mateixa manera, els nivells del metabòlit 5-HIAA també mostren un increment estadísticament significatiu quan s'administra cervesa amb alcohol (T de Welch  $t = -5,01$ ,  $gl = 3,16$ ,  $p = 0,013$ ) o sense alcohol (T de Student  $t = -3,57$ ,  $gl = 6$ ,  $p = 0,012$ ) de manera continuada, en comparació amb el grup control. Aquest augment del metabòlit suggereix un augment de la neurotransmissió serotoninèrgica en l'hipocamp. En aquest cas, els nivells de 5-HIAA del consum diari de cervesa amb alcohol són gairebé cinc vegades més alts que els valors del control.

El consum abusiu de cervesa amb alcohol pareix augmentar els nivells de 5-HTP i 5-HT. Per contra, els nivells de 5-HIAA en el grup de cervesa amb alcohol, i els nivells de 5-HTP, 5-HT i 5-HIAA en el grup de cervesa sense alcohol, també pareixen mostrar el mateix patró que en l'estriat. És a dir, una disminució dels nivells dels composts. No obstant, no s'ha pogut determinar si hi havia diferències significatives entre els grups.

D'aquesta manera, el consum continuat o abusiu de cervesa amb o sense alcohol no mostra un efecte en el sistema noradrenèrgic, però sí en el sistema serotoninèrgic.

A continuació, es va dur a terme l'anàlisi en funció del tipus de cervesa administrada als animals. Per una banda, pareix que hi ha una disminució en l'activitat de la TH (acumulació de L-DOPA) amb el consum continuat de cervesa sense alcohol (Figura 12). Per contra, amb el mateix tipus de consum pareixen augmentar els nivells tissulars de NA en l'hipocamp. Tot i això, no s'han vist diferències significatives entre els dos tipus de cervesa en el sistema noradrenèrgic.

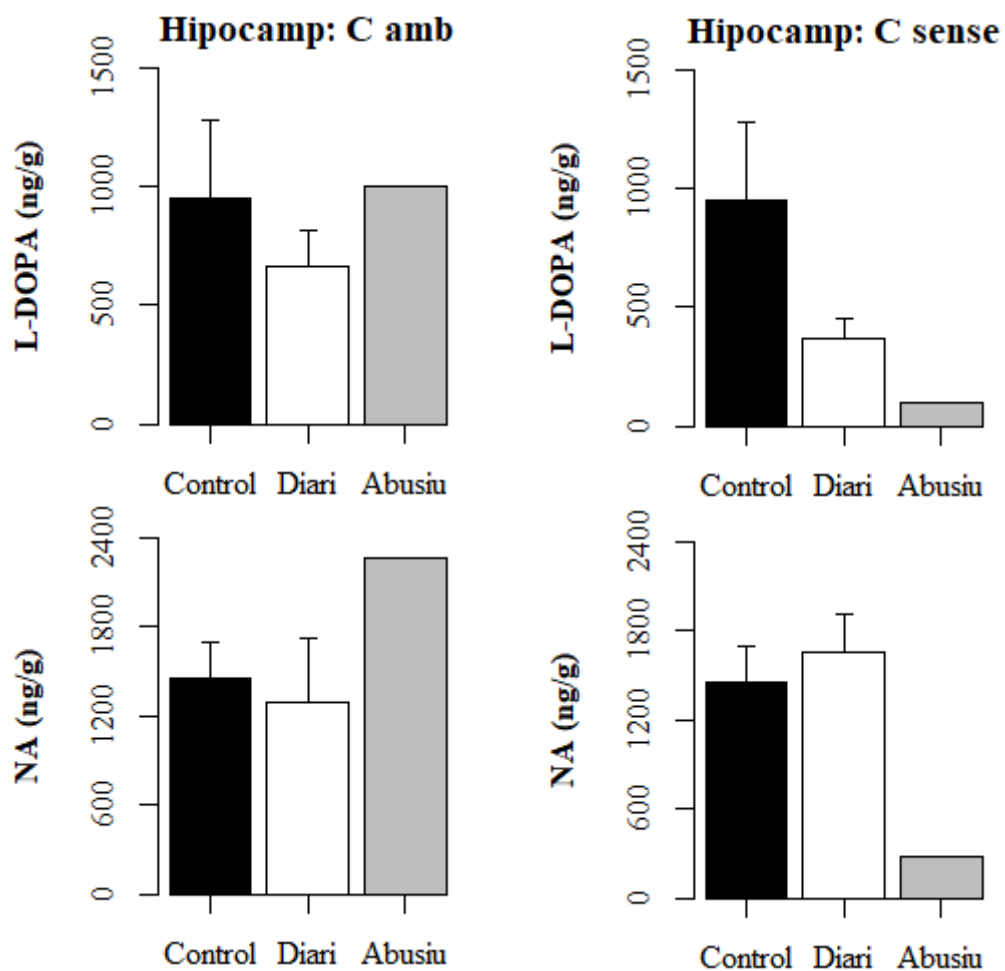
Respecte al consum abusiu, no s'ha pogut dur a terme un anàlisi estadístic, però tant la L-DOPA com la NA mostren el mateix patró de disminució amb el consum de cervesa sense alcohol.

Per altra banda, el consum continuat de cervesa sense alcohol va provocar un augment estadísticament significatiu (T de Student  $t = -3,30$ ,  $gl = 6$ ,  $p = 0,016$ ) dels nivells de 5-HTP (activitat TPH) (Figura 13). De la mateixa manera, pareix que els nivells de 5-HT són superiors en la cervesa sense alcohol, però no s'han observat diferències estadístiques. En canvi, la neurotransmissió serotoninèrgica (nivells de 5-HIAA) es veu estadísticament disminuïda (T de

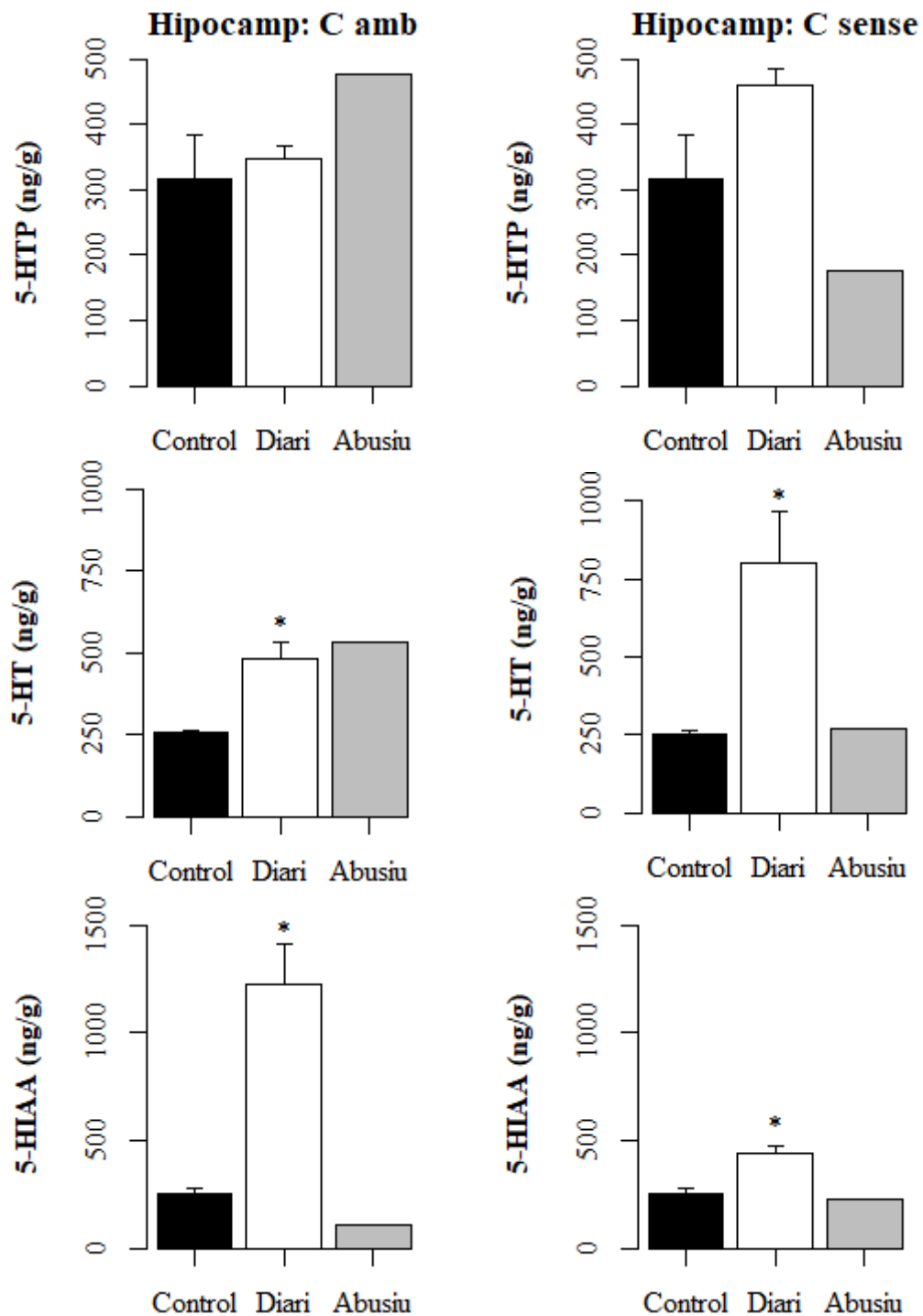
Welch  $t = 4,01$ ,  $gl = 3,28$ ,  $p = 0,023$ ) amb el consum continuat de cervesa sense alcohol respecte a la cervesa amb alcohol (aproximadament la meitat).

Finalment, el consum abusiu de cervesa sense alcohol pareix disminuir la síntesi i acumulació de 5-HT en l'hipocamp. Per contra, pareix augmentar els nivells del metabòlit 5-HIAA. Tot i això, no s'ha pogut dur a terme estadística a partir d'aquestes dades.

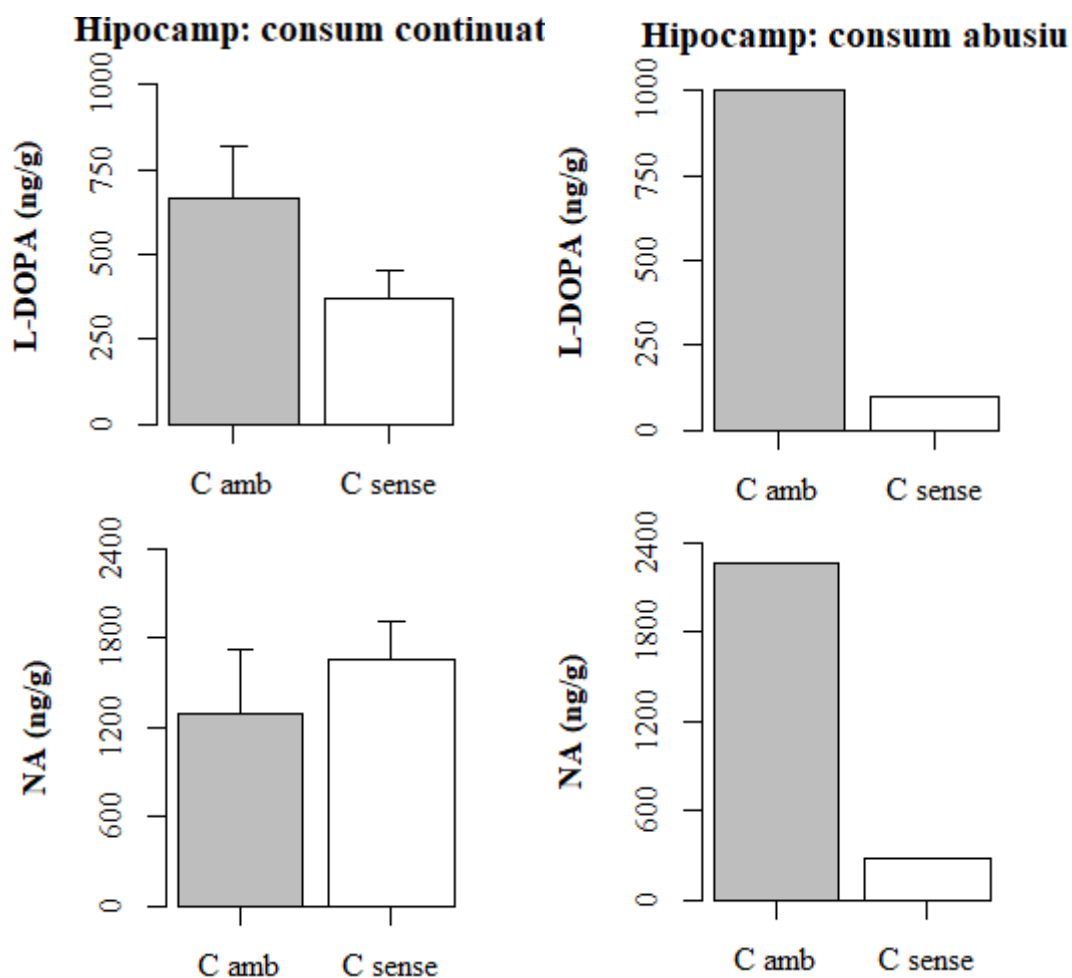
D'aquesta manera, en la majoria dels casos no s'han observat diferències en el tipus de cervesa administrada, tot i que en el sistema serotoninèrgic sí s'ha pogut veure un efecte diferenciat en dos dels tres composts.



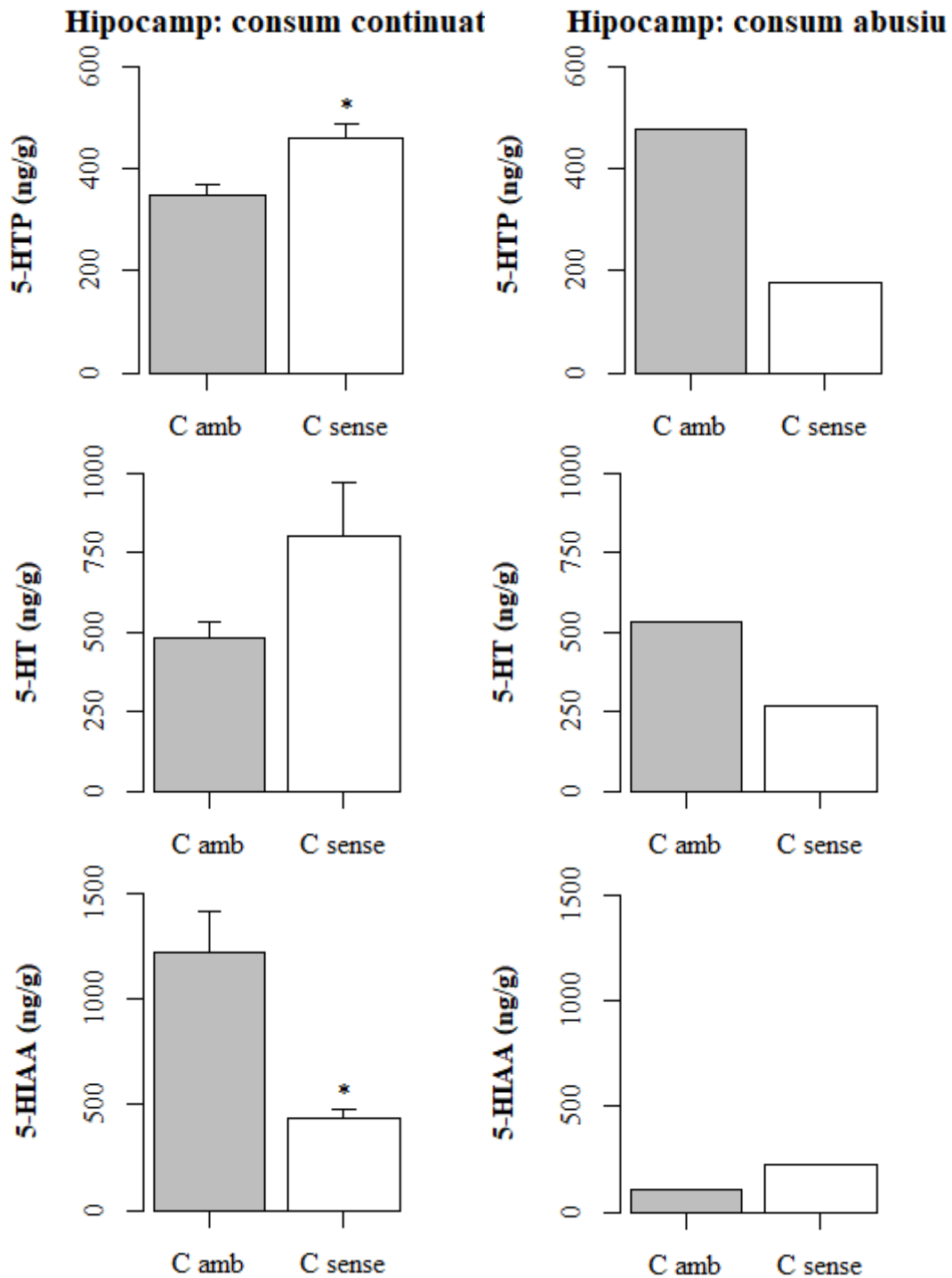
**Figura 10.** Efecte del consum continuat ( $n=4$ ; barres blanques) o abusiu ( $n=1$ ; barres grises) de cervesa amb alcohol (esquerra) o sense alcohol (dreta), en comparació amb rates control ( $n=4$ ; barres negres), sobre el sistema noradrenèrgic en l'hipocamp. Les barres negra i blanca representen les mitjanes  $\pm$  error estàndard de la mitjana (ng/g de teixit) de l'acumulació de L-DOPA (durant 30 minuts després de la inhibició de la descarboxilasa amb NSD 1015) i el contingut tissular de NA. Per l'anàlisi estadístic es va dur a terme un test  $t$  de Student o un test Wilcoxon-Mann-Whitney (NA C sense) entre el grup control i el diari. Les barres grises corresponen al valor d'una única mostra, pel que no es representa l'error i no s'ha utilitzat per l'estadística. No es van observar diferències significatives ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11.** Efecte del consum continuat (n=4; barres blanques) o abusiu (n=1; barres grises) de cervesa amb alcohol (esquerra) o sense alcohol (dreta), en comparació amb rates control (n=4; barres negres), sobre el sistema noradrenèrgic en l'hipocamp. Les barres negra i blanca representen les mitjanes  $\pm$  error estàndard de la mitjana (ng/g de teixit) de l'acumulació de 5-HTP (durant 30 minuts després de la inhibició de la descarboxilasa amb NSD 1015), el contingut tissular de 5-HT, i els nivells del metabòlit 5-HIAA. Per l'anàlisi estadístic es va dur a terme un test t de Student, un test T de Welch (5-HT en ambdós casos i 5-HIAA C amb) o un test Wilcoxon-Mann-Whitney (NA C sense) entre el grup control i el diari: \* p < 0,05. Les barres grises corresponen al valor d'una única mostra, pel que no es representa l'error i no s'ha utilitzat per l'estadística.



**Figura 12.** Efecte del consum continuat (esquerra) o abusiu (dreta) de cervesa amb alcohol (n=4; barres grises) en comparació amb el consum de cervesa sense alcohol (n=1; barres blanques) sobre el sistema noradrenèrgic en l'hipocamp. Les barres grises representen les mitjanes  $\pm$  error estàndard de la mitjana (ng/g de teixit) de l'acumulació de DOPA (durant 30 minuts després de la inhibició de la descarboxilasa amb NSD 1015) i el contingut tissular de NA. Per l'anàlisi estadístic es va dur a terme un test t de Student (L-DOPA) o un test Wilcoxon-Mann-Whitney (NA) entre la cervesa amb alcohol i la cervesa sense alcohol del grup consum continuat. Les barres blanques corresponen al valor d'una única mostra, pel que no es representa l'error i no s'ha utilitzat per l'estadística. No es van observar diferències significatives ( $p > 0,05$ ).



**Figura 13.** Efecte del consum continuat (esquerra) o abusiu (dreta) de cervesa amb alcohol (n=4; barres grises) en comparació amb el consum de cervesa sense alcohol (n=1; barres blanques) sobre el sistema serotoninèrgic en l'hipocamp. Les barres grises representen les mitjanes  $\pm$  error estàndard de la mitjana (ng/g de teixit) de l'acumulació de 5-HTP (durant 30 minuts després de la inhibició de la descarboxilasa amb NSD 1015), el contingut tissular de 5-HT, i els nivells del metabòlit 5-HIAA. Per l'anàlisi estadística es va dur a terme un test t de Student o un test T de Welch (5-HIAA) entre la cervesa amb alcohol i la cervesa sense alcohol del grup consum continuat: \* p < 0,05. Les barres blanques corresponen al valor d'una única mostra, pel que no es representa l'error i no s'ha utilitzat per l'estadística.



## DISCUSSIÓ

L'avanç amb l'edat provoca un deteriorament de les capacitats cognitives i motores de les persones, augmentant la seva predisposició a trastorns neurodegeneratius i psiquiàtrics (Ho *et al.*, 2010; Srivas i Thakur, 2019). Es creu que l'estrès oxidatiu disminueix els nivells de neurotransmissors monoaminèrgics, implicats en funcions cognitives i motores (Ramis *et al.*, 2016; Tsunemi *et al.*, 2005), afectant als enzims implicats en la seva síntesi i metabolisme (Cash, 1998; De La Cruz *et al.*, 1996). S'ha observat que els polifenols, presents en aliments i begudes com la cervesa, presenten propietats antiinflamatòries i antioxidants que permeten prevenir o retardar els efectes associats a l'edat (Joseph *et al.*, 2005; Manach *et al.*, 2004).

Seguint aquesta línia, en aquest estudi s'ha analitzat el possible efecte neuroprotector del consum de cervesa en rates femelles velles. Concretament, s'ha analitzat l'efecte del consum continuat respecte al consum abusiu, a més de la comparació entre la cervesa amb alcohol i sense alcohol. Per aquest motiu, es van analitzar els sistemes monoaminèrgics de dues regions cerebrals implicades en processos cognitius i motors: l'estriat i l'hipocamp.

Per una part, a la zona de l'estriat, rica en neurones dopaminèrgiques i serotoninèrgiques, es va analitzar l'estat d'aquests dos sistemes en funció del tractament aplicat. Els resultats obtinguts mostren un augment significatiu en la síntesi i acumulació de DA en rates que consumien una quantitat equivalent a una dosi diària de dues cerveses en humans (adult de 70 Kg). Aquest efecte es va veure principalment en la cervesa sense alcohol, tot i que el contingut de DA tissular també va ser significatiu amb el consum de cervesa amb alcohol. D'aquesta manera, el consum continuat de cervesa va induir una millora del sistema dopaminèrgic de l'estriat en rates. Aquest mateix efecte es va observar en el sistema serotoninèrgic, en què la ingesta de cervesa continuada va augmentar la síntesi i acumulació de 5-HT en la majoria dels casos.

A més, també es va analitzar la taxa de metabolització mitjançant l'acumulació dels metabòlits de la DA i la 5-HT, és a dir, HVA i 5-HIAA, respectivament. El consum continuat de cervesa va incrementar els nivells de HVA en l'estriat, mentre que no es van observar canvis significatius en el cas del 5-HIAA. La MAO és l'enzim que metabolitza la 5-HT fins 5-HIAA i la DA fins HVA, i presenta dues isoformes en el cervell: la MAO-A metabolitza totes les monoamines, mentre que la MAO-B té com a substrat preferent la dopamina (Lenders *et al.*, 1996; Martín-López *et al.*, 2008). Per tant, les diferències observades podrien ser degudes a la distinta l'afinitat de les isoformes de la MAO pes les diferents monoamines.

Per altra banda, la zona de l'hipocamp és una regió rica en terminacions noradrenèrgiques i serotoninèrgiques, pel que es van analitzar aquests dos sistemes. Al contrari que els resultats obtinguts en els altres sistemes de l'estriat, el sistema noradrenèrgic no va presentar canvis significatius del consum continuat de cervesa en cap dels paràmetres mesurats. Per tant, el consum continuat de cervesa no va tenir un efecte sobre la via noradrenèrgica de l'hipocamp. En canvi, el sistema serotoninèrgic va presentar un patró similar a l'estriat, augmentant el contingut tissular de 5-HT i el metabòlit 5-HIAA amb el consum continuat, tant de cervesa amb alcohol com sense.

D'aquesta manera, el consum continuat de cervesa va mostrar un increment en la taxa de síntesi de DA i 5-HT en l'estriat en la majoria dels casos (mesurat com l'acumulació de L-DOPA i 5-

HTP després de la inhibició de la descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics). L'augment de l'activitat dels enzims TH i TPH possiblement és degut a que els polifenols són capaços de reduir les ROS, pel que protegirien els enzims del dany oxidatiu (Martinez-Gomez *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2011). L'increment de la síntesi de DA i 5-HT possiblement va ser la causa de l'increment en el contingut total dels neurotransmissors, induint a la vegada un augment en la neurotransmissió (nivells dels metabòlits). En el cas de l'hipocamp, no obstant, no es va veure un increment significatiu de l'activitat de la TPH en cap dels casos, però sí que es van incrementar els nivells tissulars de serotonina i la seva transmissió. Aquest fet podria explicar-se ja que hi ha altres factors implicats en l'acumulació dels neurotransmissors, com la captació de les monoamines per altres components com les plaquetes. S'ha observat que el resveratrol, un polifenol present en el vi, és capaç d'inhibir la captació de 5-HT, augmentant així els nivells de serotonina tissular (Yáñez *et al.*, 2006). L'activitat de la TH en l'hipocamp amb el consum continuat tampoc va mostrar diferències respecte al control. En conseqüència, els nivells de NA tampoc varen variar. Per tant, aquests resultats suggereixen que el consum continuat de cervesa té un efecte neuroprotector en les neurones dopaminèrgiques de l'estriat i serotoninèrgiques d'ambdues regions.

Quant al consum abusiu durant dos dies de la setmana, en la majoria dels casos no es van veure diferències significatives respecte el control, el que significa que no va tenir un efecte neuroprotector. No obstant, en la majoria de les condicions, tant en el sistema dopaminèrgic com en el serotoninèrgic de l'estriat, si es varen apreciar diferències significatives respecte al consum continuat. El consum abusiu en l'hipocamp no es va poder analitzar de manera correcta degut a que només es va poder quantificar una sola mostra. Tot i això, els resultats suggereixen una disminució en la síntesi i l'acumulació de NA i 5-HT, i el metabolisme de la serotonina amb el consum abusiu de cervesa sense alcohol, i un augment amb el consum de cervesa amb alcohol.

En pràcticament tots els casos, no es va veure un efecte diferenciat de la cervesa amb alcohol i la cervesa sense alcohol ja que no es varen apreciar diferències significatives entre els dos grups. Aquest fet suggereix que els efectes beneficiosos obtinguts es deuen als components no alcohòlics de la cervesa, concretament als polifenols. S'ha demostrat que el consum de iso- $\alpha$ -àcids (IAA), uns components de la cervesa amb propietats antioxidants, atenua el deteriorament de la memòria relacionat amb l'edat en ratolins envellits (Ano *et al.*, 2019). També s'ha observat que el xanthohumol, un polifenol únicament associat a la cervesa, és capaç de disminuir el dany oxidatiu i actua com a agent antiinflamatori, millorant els paràmetres cerebrals (Elrod, 2018)

Tots aquests resultats mostren que sí que hi ha diferències entre el tipus de consum que es segueix, de manera que una ingesta continuada de cervesa presenta més beneficis que un consum abusiu. A més, suggereixen que el consum moderat de cervesa diàriament presenta un efecte neuroprotector en els sistemes monoaminèrgics. Finalment, indiquen que no hi ha un efecte diferenciat entre la cervesa amb alcohol i sense alcohol. Aquests fets concorden amb la bibliografia ja existent, ja que hi ha evidències de què el consum moderat d'alcohol té millors resultats que el consum excessiu, i inclús que l'abstinència (Arranz *et al.*, 2012; Brányik *et al.*, 2012; Ferreira i Willoughby, 2008; Mukamal i Rimm, 2008). Tot i això, la majoria d'aquests estudis es centren en els beneficis cardiovasculars o del càncer. A nivell cerebral encara no hi ha evidències sobre l'efecte protector de la ingesta moderada de cervesa sobre els sistemes

monoaminèrgics. No obstant, s'ha suggerit que el consum baix o moderat de cervesa ( $\leq 2$  begudes al dia per homes i  $\leq 1$  per dones) pot reduir el risc de deteriorament cognitiu i el desenvolupament de demència. Per contra, el consum excessiu d'alcohol ( $>3-4$  begudes al dia) s'ha associat amb un major risc de deteriorament cognitiu i demència (Año *et al.*, 2019; Neafsey i Collins, 2011; Osorio-Paz *et al.*, 2019; Ruitenber *et al.*, 2002).

Aquest fet podria explicar-se ja que la ingesta continuada i moderada de la cervesa permetria als mecanismes homeostàtics compensar els efectes negatius de l'alcohol. D'aquesta manera, es veurien els efectes beneficiosos dels components no alcohòlics de la cervesa per sobre dels negatius de l'alcohol. En canvi, l'administració puntual i excessiva no permet una adaptació adequada de l'organisme, pel que els efectes negatius de l'alcohol podrien inhibir els beneficis dels altres components.

Aquest estudi ha tengut certes limitacions que cal tenir en compte. En primer lloc, la mida mostral dels grups hauria de ser superior per poder veure uns efectes més clars i més precisos. En segon lloc, no s'han tengut en compte les proves comportamentals que es varen dur a terme, i que podrien donar més informació als resultats obtinguts i una visió diferent. En tercer lloc, l'administració es va dur a terme a través de biberons i la ingesta era voluntària. Tot i que es va veure que tenien una preferència per la cervesa, es podria haver administrat mitjançant una cànula oral de manera forçada perquè tots els animals consumissin la mateixa quantitat. En quart lloc, el tractament va començar més tard de l'esperat, pel que les rates es van haver de sacrificar per l'edat avançada. Finalment, degut a un mal funcionament de l'HPLC, no es van poder tenir més resultats dels obtinguts. Concretament, en el grup del consum abusiu de l'hipocamp, s'esperava tenir un número més elevat de mostres per poder dur a terme un anàlisi estadístic però no va poder ser.

## CONCLUSIONS

En funció dels resultats obtinguts en aquest estudi, podem concloure que:

1. El tipus de consum que es segueix (continuat o abusiu) influeix de manera diferent en l'efecte de la cervesa sobre els sistemes monoaminèrgics.
2. El consum continuat de cervesa millora l'estat dels sistemes dopaminèrgics de l'estriat i serotoninèrgics de l'estriat i l'hipocamp, observant en la majoria de casos un augment en la síntesi, l'acumulació i el metabolisme dels neurotransmissors monoaminèrgics respecte al grup control. En canvi, la ingesta continuada de cervesa no afecta al sistema noradrenèrgic de l'hipocamp.
3. El consum abusiu de cervesa pareix inhibir els efectes positius trobats en la ingesta continuada, de manera que els resultats s'equiparen als del grup control.
4. El tipus de cervesa (amb alcohol o sense alcohol) no influeix en els efectes del consum d'aquesta. Per tant, els efectes beneficiosos obtinguts es deuen als components no alcohòlics de la cervesa, com els polifenols.

## REFERÈNCIES

- Ano, Y., Ohya, R., Kondo, K., i Nakayama, H. (2019). Iso- $\alpha$ -acids, hop-derived bitter components of beer, attenuate age-related inflammation and cognitive decline. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00016>
- Arranz, S., Chiva-Blanch, G., Valderas-Martínez, P., Medina-Remón, A., Lamuela-Raventós, R. M., i Estruch, R. (2012). Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*, 4(7), 759-781. <https://doi.org/10.3390/nu4070759>
- Brányik, T., Silva, D. P., Baszczyński, M., Lehnert, R., i Almeida E Silva, J. B. (2012). A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. *Journal of Food Engineering*, 108(4), 493-506. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.020>
- Carlsson, A., i Lindqvist, M. (1973). In-vivo measurements of tryptophan and tyrosine hydroxylase activities in mouse brain. *Journal of Neural Transmission*, 34(2), 79-91. <https://doi.org/10.1007/BF01244661>
- Cash, C. D. (1998). Why tryptophan hydroxylase is difficult to purify: A reactive oxygen-derived species-mediated phenomenon that may be implicated in human pathology. *General Pharmacology*, 30(4), 569-574. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(97\)00308-X](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00308-X)
- De La Cruz, C. P., Revilla, E., Venero, J. L., Ayala, A., Cano, J., i Machado, A. (1996). Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. *Free radical biology & medicine*, 20(1), 53-61. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02025-x](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02025-x)
- Dhalaria, R., Verma, R., Kumar, D., Puri, S., Tapwal, A., Kumar, V., Nepovimova, E., i Kuca, K. (2020). Bioactive compounds of edible fruits with their anti-aging properties: A comprehensive review to prolong human life. *Antioxidants*, 9(11), 1-38. <https://doi.org/10.3390/antiox9111123>
- Elrod, S. M. (2018). Xanthohumol and the medicinal benefits of beer. En *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (2a ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00003-9>
- Esteban, S., Garau, C., Aparicio, S., Moranta, D., Barceló, P., Fiol, M. A., i Rial, R. (2010a). Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *Journal of Pineal Research*, 48(2), 170-177. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00741.x>
- Esteban, S., Garau, C., Aparicio, S., Moranta, D., Barceló, P., Ramis, M., Tresguerres, J. A. F., i Rial, R. (2010b). Improving effects of long-term growth hormone treatment on monoaminergic neurotransmission and related behavioral tests in aged rats. *Rejuvenation Research*, 13(6), 707-716. <https://doi.org/10.1089/rej.2010.1053>
- Felten, D. L., i Shetty, A. N. (2010). *Netter Atlas de Neurociencia* (2<sup>a</sup> ed.). Elsevier Masson.
- Fernstrom, J. D., i Fernstrom, M. H. (2007). Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *Journal of Nutrition*, 137(6), 1539-1547. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1539s>

- Ferreira, M. P., i Willoughby, D. (2008). Alcohol consumption: The good, the bad, and the indifferent. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 33(1), 12-20. <https://doi.org/10.1139/H07-175>
- Gupta, B., Kumar, B., Sharma, A., Sori, D., Sharma, R., i Mehta, S. (2019). Nutraceuticals for Antiaging. *Nutraceuticals in Veterinary Medicine*, 383-392. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-04624-8\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-030-04624-8_25)
- Ho, Y. S., So, K. F., i Chang, R. C. C. (2010). Anti-aging herbal medicine-How and why can they be used in aging-associated neurodegenerative diseases? *Ageing Research Reviews*, 9(3), 354-362. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.10.001>
- Horton, N. J., i Kleinman, K. (2015). Using R and rstudio for data management, statistical analysis, and graphics, second edition. En *Using R and RStudio for Data Management, Statistical Analysis, and Graphics, Second Edition*. <https://doi.org/10.1201/b18151>
- Hussain, A. M., i Mitra, A. K. (2004). Effect of reactive oxygen species on the metabolism of tryptophan in rat brain: Influence of age. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 258(1), 145-153. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000012849.16750.00>
- Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., i Casadesus, G. (2005). Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 313-316. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.313s>
- Konar, A., Singh, P., i Thakur, M. K. (2016). Age-associated cognitive decline: Insights into molecular switches and recovery avenues. *Ageing and Disease*, 7(2), 121-129. <https://doi.org/10.14336/AD.2015.1004>
- Lenders, J. W. M., Eisenhofer, G., Abeling, N. G. G. M., Berger, W., Murphy, D. L., Konings, C. H., Bleeker Wagemakers, L. M., Kopin, I. J., Karoum, F., Van Gennip, A. H., i Brunner, H. G. (1996). Specific genetic deficiencies of the A and B isoenzymes of monoamine oxidase are characterized by distinct neurochemical and clinical phenotypes. *Journal of Clinical Investigation*, 97(4), 1010-1019. <https://doi.org/10.1172/JCI118492>
- Li, Y. R., Li, S., i Lin, C. C. (2018). Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. *BioFactors*, 44(1), 69-82. <https://doi.org/10.1002/biof.1400>
- Ma, L., Zhao, T., Zhang, P. P., Liu, M., Shi, H., i Kang, W. (2020). Determination of monoamine neurotransmitters and metabolites by high-performance liquid chromatography based on Ag(III) complex chemiluminescence detection. *Analytical Biochemistry*, 593, 113594. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113594>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., i Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Martín-López, M., Perea, J. M., Morabet, L., i Navarro, J. F. (2008). Update of the role of the MAO-A enzyme in regulating aggressive behavior. *Psiquiatria Biologica*, 15(5), 175-181. [https://doi.org/10.1016/s1134-5934\(08\)76488-1](https://doi.org/10.1016/s1134-5934(08)76488-1)

- Martinez-Gomez, A., Caballero, I., i Blanco, C. A. (2020). Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*, 10(3), 400. <https://doi.org/10.3390/biom10030400>
- Mukamal, K. J., i Rimm, E. B. (2008). Alcohol consumption: Risks and benefits. *Current Atherosclerosis Reports*, 10(6), 536-543. <https://doi.org/10.1007/s11883-008-0083-2>
- Neafsey, E. J., i Collins, M. A. (2011). Moderate alcohol consumption and cognitive risk. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 7(1), 465-484. <https://doi.org/10.2147/ndt.s23159>
- Olas, B., i Bryś, M. (2020). Beer components and their beneficial effect on the hemostasis and cardiovascular diseases– truth or falsehood. *Food and Chemical Toxicology*, 146, 111782. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111782>
- Osorio-Paz, I., Brunauer, R., i Alavez, S. (2019). Beer and its non-alcoholic compounds in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(20), 3492-3505. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1696278>
- Palmer, A. M., i DeKosky, S. T. (1993). Monoamine neurons in aging and Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 91(2), 135-159. <https://doi.org/10.1007/BF01245229>
- Pandey, K. B., i Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Ramis, M. R., Sarubbo, F., Tejada, S., Jiménez, M., Esteban, S., Miralles, A., i Moranta, D. (2020). Chronic polyphenon-60 or catechin treatments increase brain monoamines syntheses and hippocampal sirt1 levels improving cognition in aged rats. *Nutrients*, 12(2), 326. <https://doi.org/10.3390/nu12020326>
- Ramis, M. R., Sarubbo, F., Terrasa, J. L., Moranta, D., Aparicio, S., Miralles, A., i Esteban, S. (2016). Chronic  $\alpha$ -tocopherol increases central monoamines synthesis and improves cognitive and motor abilities in old rats. *Rejuvenation Research*, 11, 12-14.
- Ruitenbergh, A., Van Swieten, J. C., Witteman, J. C. M., Mehta, K. M., Van Duijn, C. M., Hofman, A., i Breteler, M. M. B. (2002). Alcohol consumption and risk of dementia: The Rotterdam Study. *Lancet*, 359(9303), 281-286. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07493-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07493-7)
- Sarubbo, F., Ramis, M. R., Aparicio, S., Ruiz, L., Esteban, S., Miralles, A., i Moranta, D. (2015). Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats. *Age*, 37(3), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9777-x>
- Sarubbo, F., Ramis, M. R., Kienzer, C., Aparicio, S., Esteban, S., Miralles, A., i Moranta, D. (2018). Chronic Silymarin, Quercetin and Naringenin Treatments Increase Monoamines Synthesis and Hippocampal Sirt1 Levels Improving Cognition in Aged Rats. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 13(1), 24-38. <https://doi.org/10.1007/s11481-017-9759-0>
- Singh, P., Sivanandam, T. M., Konar, A., i Thakur, M. K. (2021). Role of nutraceuticals in cognition during aging and related disorders. *Neurochemistry International*, 143, 104928.

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104928>

- Srivas, S., i Thakur, M. K. (2019). Aging of the brain. En *Encyclopedia of Biomedical Gerontology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11398-4>
- Tsunemi, A., Utsuyama, M., Seidler, B. K. H., Kobayashi, S., i Hirokawa, K. (2005). Age-related decline of brain monoamines in mice is reversed to young level by Japanese herbal medicine. *Neurochemical Research*, 30(1), 75-81. <https://doi.org/10.1007/s11064-004-9688-1>
- Wang, Y., Xu, H., Fu, Q., Ma, R., i Xiang, J. (2011). Protective effect of resveratrol derived from *Polygonum cuspidatum* and its liposomal form on nigral cells in Parkinsonian rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 304(1-2), 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.02.025>
- Yáñez, M., Fraiz, N., Cano, E., i Orallo, F. (2006). Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(2), 688-695. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.190>