



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Efecto de la restricción calórica en la prevención del envejecimiento cerebral. Estudio neuroquímico y comportamental.

Nerea López Afán

Grado de Biología

Año académico 2014-15

DNI del alumno: 47407733H

Trabajo tutelado por Susana Esteban Valdés

Departamento de Fisiología Animal



Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas i de investigación.

Palabras clave del trabajo:

Envejecimiento, restricción calórica, memoria, coordinación motora, Radial Maze, Rota-Rod, Reconocimiento de objetos, noradrenalina, dopamina, serotonina, tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa.

Índice

Resumen	4
Introducción	5
1. El envejecimiento	5
2. La restricción calórica	5
3. Efectos del envejecimiento en el sistema monoaminérgico.....	6
Objetivos	8
Materiales y métodos	8
1. Animales.....	8
2. Tratamiento.....	9
3. Pruebas comportamentales	9
3.1 Radial Maze.....	9
3.2 Reconocimiento de objetos	10
3.3 Rota-Rod	13
4. Determinación cromatográfica de la actividad de la enzima tirosina triptófano hidroxilasa in vivo	13
4.1 Análisis cromatográfico	14
5. Análisis estadístico.....	16
Resultados	17
Peso.....	17
1. Memoria espacial.....	17
2. Memoria de trabajo no espacial	20
3. Coordinación motora	20
4. Efecto de la restricción calórica en el sistema monoaminérgico en estriado y en hipocampo de ratas adultas	21
Discusión	25
1. Efecto de la restricción calórica en el sistema dopaminérgico.....	25
2. Efecto de la restricción calórica en el sistema noradrenérgico	26
3. Efecto de la restricción calórica en el sistema serotoninérgico.....	26
Conclusiones	27
Agradecimientos	27
Bibliografía	28

Resumen

Actualmente, la esperanza de vida ha aumentado considerablemente a nivel mundial propiciando una mayor incidencia de enfermedades asociadas a la edad, por lo que la investigación sobre estrategias que puedan retrasar el envejecimiento cerebral y mejorar la calidad de vida en el anciano resultan de gran interés para la sociedad actual. Existen evidencias de que la restricción calórica, sin desnutrición, prolonga la vida de muchas especies por lo que en el presente trabajo se estudió el posible efecto beneficioso de la restricción calórica sobre el envejecimiento cerebral. Para ello, se realizaron pruebas comportamentales que permitieron evaluar las capacidades cognitivas y motoras de ratas control y ratas sometidas a restricción calórica, y se midieron los niveles de diversas monoaminas relacionadas con dichas funciones en áreas cerebrales involucradas en las mismas. Los resultados ponen de manifiesto una mejora en las capacidades cognitivas y motoras de las ratas sometidas a restricción calórica respecto a los animales control así como un aumento en la actividad de los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico en hipocampo y estriado, ambos involucrados en las funciones cognitivas y motoras en dichas regiones. Por el contrario, se observó una reducción en la actividad serotoninérgica que podría explicarse por un déficit de triptófano, el precursor de la serotonina.

En resumen, los resultados del estudio realizado sugieren que la restricción calórica podría ser utilizado como mecanismo de prevención para contrarrestar el descenso en neurotransmisión de NA y DA así como el deterioro de las capacidades cognitivas y la coordinación motora que se producen con la edad.

Abstract

Currently, life expectancy has increased considerably in the world, leading to increased incidence of age-related diseases. In this manner, researches on strategies that can slow brain aging and improve the quality of life in the elderly are of great interest to the society. There is evidence that caloric restriction without malnutrition extends life in many species, therefore in this study the possible beneficial effect of caloric restriction on the aging brain was studied. To do this, behavioral tests were used to assess cognitive and motor abilities in control rats and rats submitted to caloric restriction. Also, it was measured the levels of monoamines (DA, NA and 5-HT) in brain areas involved in those functions, as hippocampus and striatum. The results show an improvement in cognitive and motor abilities of rats subjected to caloric restriction respect to the control animals. It was also observed an increase in the activity of dopaminergic and noradrenergic systems in hippocampus and striatum, both involved in cognitive and motor functions in these regions. Conversely, a reduction was observed in the serotonergic activity which could be explained by a reduction of tryptophan, the precursor of serotonin.

In summary, the results of this study suggest that caloric restriction could be used as a preventive mechanism to counteract the decline in NA and DA neurotransmission and the cognitive and motor decline that occur with age.

Introducción

El envejecimiento

Hasta hace poco, el proceso de envejecimiento, es decir, el detrimento gradual que afecta al organismo en el tiempo llevándolo a la muerte, era considerado inalterable. Sin embargo, la investigación durante los últimos 30 años ha desafiado este supuesto proporcionando pruebas concluyentes de que el proceso del envejecimiento puede verse afectado por varios factores, incluyendo la composición genética del organismo, así como las experiencias que el organismo tiene con su ambiente (Bouchard & Villeda 2015).

Hoy en día, el envejecimiento de la población es un problema importante en los países desarrollados, lo que ha llevado a aumentar la prevalencia de las enfermedades dependientes de la edad, como la depresión, la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Los cambios bioquímicos que ocurren en el cerebro envejecido son los responsables de este deterioro cognitivo asociado a la edad y también son cruciales en el desarrollo de estas enfermedades neurodegenerativas (Sarubbo et al. 2015)

La maleabilidad del proceso de envejecimiento plantea la emocionante posibilidad de que el aprovechamiento de esta plasticidad puede proporcionar un medio para frenar o incluso revertir el proceso de envejecimiento en sí y rejuvenecer los sistemas fisiológicos (Bouchard & Villeda 2015).

En particular, las evidencias sugieren que el sistema nervioso central (SNC) es especialmente vulnerable a los efectos del envejecimiento (Mattson and Magnus 2006). El SNC no sólo integra la información sensorial desde el ambiente externo, sino también responde a los cambios desde dentro a través de la comunicación con el medio ambiente. Recientemente, las interacciones del SNC con el medio ambiente han sido implicadas en la regulación directamente de la esperanza de vida del organismo. Por lo tanto, el SNC exhibe una dualidad única que no se refleja en otros tejidos, que sirve tanto como un sitio vulnerable a los efectos de envejecimiento, mientras que también actúa como un regulador maestro potencial de envejecimiento en sí (Bouchard & Villeda 2015).

Cada vez hay un mayor número de evidencias que indican que se pueden producir cambios en el envejecimiento a través del ejercicio, la restricción calórica (RC) y la parabiosis heterocrónica contrarrestando parcialmente la pérdida de la plasticidad del SNC relacionada con la edad (Bouchard & Villeda 2015).

En este trabajo nos centraremos en el estudio del papel que ejerce la restricción calórica en cuanto al envejecimiento cerebral y las capacidades cognitivas.

La restricción calórica

La restricción calórica (RC) sin desnutrición aumenta la longevidad y retrasa la aparición de los trastornos asociados con la edad. La RC sin causar desnutrición, es la única intervención

que se conoce que aumenta de forma contundente la vida útil en muchas especies, incluyendo levaduras, moscas de la fruta, nematodos, peces, ratas, ratones, hámsteres y perros (Weindruch 1996; Masoro 2005; Ingram & Roth 2015) y posiblemente incluso en los primates (Ingram et al, 2006; Colman et al, 2009). La evidencia de que la longevidad de mamíferos podría aumentarse surgió en 1935 en el estudio de roedores que muestra que la restricción calórica extendió la esperanza de vida media y retrasó la aparición de patologías asociadas a la edad en ratas (McCay et al. 1935). Pero no fue hasta la década de 1990, sin embargo, que la restricción calórica fue ampliamente visto como un modelo científico bien validado que podría proporcionar conocimientos sobre el retardo del proceso de envejecimiento y un medio para identificar los mecanismos subyacentes del envejecimiento (Kennedy et al. 2007). La restricción calórica es una manipulación no genética cuyos beneficios se cree que se deben a la inducción de las sirtuínas, una antigua familia histonas desacetilasas dependientes de NAD⁺ ampliamente distribuido en todos los phyla. La acumulación de pruebas indica que las sirtuínas son importantes reguladores de la vida del organismo (Ramis et al. 2015).

En cuanto a las capacidades cognitivas, la memoria de trabajo disminuye en la edad adulta tardía (Borella et al. 2008) y es considerado como uno de los principales factores que contribuyen al deterioro cognitivo en la vejez (Park et al., 2002). Por lo tanto, no es sorprendente que muchos estudios investiguen la capacidad de mejorar la memoria de trabajo durante toda la vida (Takeuchi et al. 2010; Morrison & Chein 2011; Shipstead et al. 2010).

La RC se asocia con la atenuación de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, puede preservar la función cognitiva durante el envejecimiento a través de un mecanismo todavía desconocido (Emily et al. 2013). También es el medio más eficaz conocido de reducción de la incidencia de cáncer y el aumento de la edad media de aparición de enfermedades relacionadas con la edad y los tumores (Cao et al. 2001).

Efectos del envejecimiento en el sistema monoaminérgico

Entre los múltiples factores que se ven afectados en el envejecimiento cerebral se encuentran la actividad de neurotransmisores y neuromoduladores que disminuyen en edades avanzadas. Entre ellos es especialmente importante la reducción en los sistemas noradrenérgico, serotoninérgico y dopaminérgico (Esteban et al. 2010 a, 2010 b, Luine et al. 1990; Míguez et al. 1999; Sarubbo et al. 2015; Venero et al. 1991) que tienen como consecuencia un empeoramiento en las funciones cognitivas y motoras (Collier et al. 2004; Koprowska et al. 2004; Lemon and Manahan-Vaughan 2006; Meneses 1999; Murchison et al. 2004).

Sistema dopaminérgico y noradrenérgico

La síntesis de DA y NA se da a partir de la hidroxilación de la tirosina (Malgor & Valseca 2000). A partir del aminoácido l-tirosina obtiene DOPA (dihidroxifenilalanina) mediante la acción de la enzima tirosina-hidroxilasa TH (Malgor et al. 2000), enzima limitante de todas las reacciones de síntesis de catecolaminas (Nagatsu et al. 1964) (Ver figura 1).

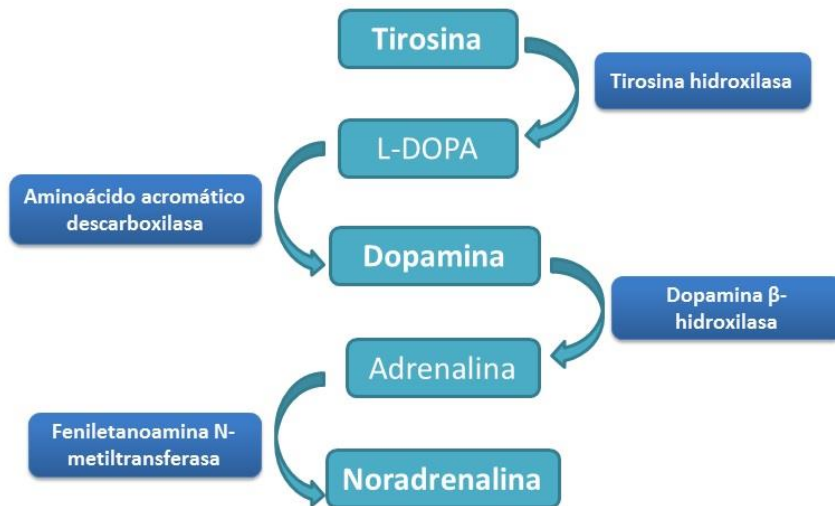


Figura 1. Representación esquemática de la vía de síntesis de catecolaminas: DA y NA.

Sistema serotoninérgico

La síntesis de serotonina (5-HT) depende del triptófano proveniente de la dieta, que mediante la hidroxilación efectuada por la enzima limitante triptófano hidroxilasa TPH, da lugar a 5-hidroxitriptófano (5-HTP). La 5-HT se obtiene finalmente por la descarboxilación del 5-HTP (Vera 2005) (Ver figura 2).

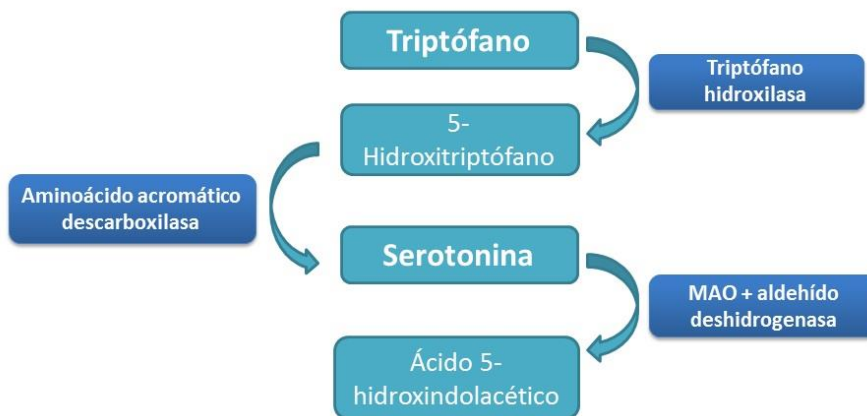


Figura 2. Representación esquemática de la vía de síntesis y degradación de 5-HT.

Por todo ello se ha planteado como **objetivo general del presente trabajo** analizar el efecto de la restricción calórica en la memoria de trabajo y las capacidades motoras de ratas adultas, y su posible correlación con los niveles de algunos neurotransmisores que están implicados en los procesos cognitivos y motores, como son el sistema dopaminérgico, el sistema noradrenérgico y el sistema serotoninérgico.

Objetivos

1. Estudiar el efecto de la restricción calórica sobre el deterioro de la memoria de trabajo y coordinación motora que ocurre generalmente con la edad.
2. Estudiar el efecto que presenta la restricción calórica sobre el sistema dopaminérgico en el estriado de rata.
3. Analizar el efecto de la restricción calórica sobre el sistema noradrenérgico en el hipocampo de ratas.
4. Evaluar el efecto de la restricción calórica sobre el sistema serotoninérgico en el estriado e hipocampo.
5. Comparar los resultados obtenidos de tipo comportamental con los resultados bioquímicos.

Materiales y métodos

1. Animales

Se utilizaron ratas adultas macho Sprague-Dawley (9 meses, que pesan $630\pm 10\text{g}$, $n=10$) libres de patógenos específicos. Fueron adquiridas en Charles River (Barcelona, España) y se introdujeron en jaulas de metacrilato transparentes (Panlab, Barcelona) con virutas de madera en su base para la nidificación (Ultrasorb, Panlab).

Permanecieron en el estabulario de la *Universidad de las Islas Baleares* (Tipo II, registro nº ES704000000540 en la *Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears*), apto para la realización de experimentos con animales libres de parásitos específicos. Dentro de este estabulario permanecieron bajo condiciones de humedad (60%) y temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$) controladas y ciclos de luz/oscuridad de 12:12h (período de luz: 9:00 am hasta las 21:00).

Antes de someterlos al tratamiento, los animales fueron manipulados durante unos días para reducir la aparición de estrés y agresividad que podría darse durante la realización de las pruebas comportamentales y que podrían alterar los resultados. Durante el tratamiento los animales fueron pesados todos los días anotando también la cantidad de comida ingerida.

Se utilizó el menor número de animales posible para obtener resultados estadísticamente significativos evitando a la vez su malestar. Todos los procedimientos realizados sobre estos se hicieron siguiendo las pautas de ética estándar (Comunidades Europeas la Directiva 86/609 / CEE) que a su vez están aprobadas por el Comité de Bioética local de la Universidad de las Islas Baleares (UIB).

2. Tratamiento

Se distribuyeron de forma aleatoria las ratas adultas en dos grupos (n=13). Las pertenecientes al grupo control (n=6) y un segundo grupo (n=7) estaba compuesto por ratas sometidas a restricción calórica.

El grupo control permaneció con dieta estándar (Panlab A04) y agua. El grupo de restricción calórica (RC), permanecieron durante 9 meses ad libitum iniciando posteriormente el tratamiento de RC que disminuyó progresivamente el peso de los animales al 75% en un periodo de 25 días. Posteriormente, fueron mantenidos durante 15 días con una reducción de ingesta de alimentos de un 40%. Los animales eran observados para detectar la posible aparición de alguna carencia nutricional, lo que no se observó a lo largo del estudio. Todos los reactivos utilizados se adquirieron de Sigma Chemical Company (St. Louis MO, EE.UU.).

3. Pruebas comportamentales

Todas las pruebas deben realizarse a la misma hora, aproximadamente, para que los resultados puedan ser comparables y no se vean alterados por los niveles de actividad que presentan los animales a lo largo del día. En nuestro caso, estas se realizaron entre las 8:00 y las 13:00 horas. Después de la realización de cada test, todos los dispositivos fueron limpiados con etanol al 70%.

3.1 Radial Maze

La prueba del *Radial Maze* es muy útil para evaluar la memoria de trabajo de tipo espacial. Consiste en un laberinto radial (Ver figura 3) formado por 8 brazos equidistantes (70x10 cm) conectados por una plataforma central (28cm de diámetro). En los extremos de estos brazos se sitúan 8 pocillos dentro de los cuales se coloca una pequeña cantidad de comida.

Antes de realizar el test se somete a los animales a 48h de ayuno (con acceso libre al agua) como refuerzo positivo a la hora de entrar a los brazos para buscar comida.

El animal inicia la prueba en la parte central del laberinto de manera que se va anotando los brazos que este visita a lo largo del test, el tiempo necesario para completarlo (estableciendo un tiempo máximo de 20 minutos), la distancia recorrida y los pocillos que han quedado sin porción de comida (Esteban et al., 2010 a, 2010 b, Sarubbo et al., 2015).



Figura 3. Dispositivo del *Radial Maze* Imagen obtenida en el laboratorio de Fisiología.

Los parámetros analizados han sido: tiempo total, errores cometidos (se consideran errores los brazos no visitados y las reentradas en los brazos ya visitados) y distancia recorrida. El tiempo total y los errores cometidos nos permiten analizar la memoria de trabajo espacial, mientras que con la distancia recorrida respecto al tiempo total podemos determinar la actividad motora del animal durante la prueba.

El test finaliza cuando el animal ha entrado en todos los brazos y ha consumido la pequeña porción de comida o transcurridos los 20 minutos máximos establecidos.

Los resultados se analizan mediante el programa *Smart v2.5* (Panlab, S.L. Barcelona, España), el cual está conectado a una cámara de vídeo digital que graba el recorrido del animal.

3.2 Reconocimiento de objetos

Para analizar la memoria de tipo no espacial en animales adultos, se ha realizado el test de reconocimiento de un objeto nuevo basado en la capacidad exploratoria espontánea de la rata. Este test analiza la capacidad de integrar información nueva además de requerir que el animal recuerde el objeto a corto plazo (10 minutos), es decir, recuperar la información que ya ha sido adquirida.

La prueba se realiza en un campo abierto (78 cm de diámetro y 60 cm de altura de las paredes exteriores), construido con madera y metacrilato, en cuya base hay dibujadas dos marcas (a 23 cm del centro) que indican dónde se colocan los objetos (Ramis et al. 2013).

Los parámetros analizados mediante este test son: tiempo de exploración de cada objeto y el recorrido realizado. Este dispositivo nos permite medir la emocionalidad del animal a través de la observación de su comportamiento (defecaciones o micciones realizadas, levantarse, quedarse quietas, acicalarse, mantenerse cerca de la pared o explorar por el centro...) y de esta manera podemos comprobar que la rata se encuentra en un estado normal, de manera que los resultados obtenidos son los correctos.

El test se realiza en dos fases:

Fase de habituación: se introduce el animal en el dispositivo donde se realiza la prueba para que este se familiarice y lo explore libremente. Concretamente, 3 días antes al test se coloca a cada animal en el campo abierto durante 10 minutos. Es importante que durante esta fase los animales vean al experimentador y vayan percibiendo el ruido de los cronómetros para que el día de la prueba no se asusten y alteren los resultados.

Fase de Test: realizada a su vez en varias fases:

- Rehabituación: el día del test se colocan los animales en el campo abierto durante 1 minuto para que lo reconozcan.



Figura 4. Dispositivo de campo abierto. Fase de rehabilitación en la prueba de reconocimiento de objetos. Imagen obtenida de Ruiz 2014.

- Familiarización: se sitúan dos objetos iguales, del mismo tamaño y color (cubos de plástico de 6x6 cm) en las marcas correspondientes con ayuda de velcro. Se coloca la rata en el centro del dispositivo y se le deja explorar los dos objetos durante un total de 30 segundos (entre los dos objetos), o un tiempo máximo de 10 minutos (en el caso de que no llegue a 30 segundos de exploración de los objetos).



Figura 5. Dispositivo de campo abierto con dos objetos idénticos. Fase de familiarización en el test de reconocimiento de objetos. Imagen obtenida en el laboratorio de Fisiología.

- Retraso: se dejan pasar 10 minutos antes de realizar el test.
- Test: se sustituyen los objetos anteriores (de la familiarización) por uno exactamente igual (color y forma) y otro diferente, tanto en color como en forma (bolo de 8x5 cm). De nuevo se coloca a la rata en el centro del dispositivo y se le deja explorar hasta un máximo de 10 minutos, o hasta haber explorado los dos objetos durante 30 segundos.

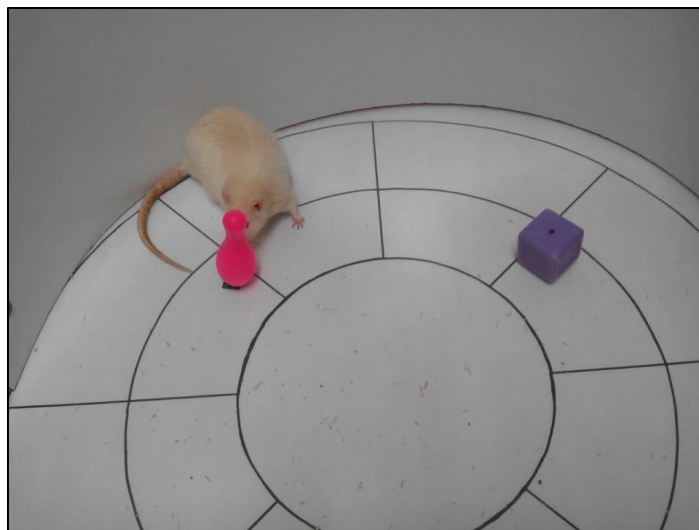


Figura 6. Dispositivo de campo abierto con dos objetos diferentes. Fase de test en la prueba de reconocimiento de objetos. Imagen obtenida en el laboratorio de Fisiología.

Para evitar el posible error por preferencia de un determinado color por parte de los animales y comprobar que el animal tiene capacidad exploratoria, durante la fase de familiarización no se utilizan siempre objetos del mismo color para todas las ratas, sino que se van cambiando de color de una a otra.

3.3 Rota-Rod

El test del Rota-Rod(Panlab, S.L., Barcelona, España) permite conocer la coordinación motora del animal. Se encuentra compuesto por una rueda de 8cm de diámetro colocada a una altura de 42cm (Ver figura 7). Su velocidad de giro se ve incrementada en el modo de aceleración de 4 a 40cm/s (Esteban et al. 2010 a, 2010 b).



Figura 7. Dispositivo de *Rota Rod*. Imagen obtenida en el laboratorio de Fisiología.

Para la obtención de buenos resultados, es preciso realizar la prueba en dos fases:

- Fase de entrenamiento: es preciso entrenar a los animales en la rueda antes de la realización del test definitivo. Durante este entrenamiento se utilizó el modo de mantenimiento teniendo al animal en la rueda a una velocidad constante de 4cm/s sin caer.
- Fase de test: se coloca al animal en la rueda en el modo de mantenimiento y se cambia al modo de aceleración. Cada animal repite la prueba 5 veces dejando un tiempo de margen para que este pueda recuperarse. En cada repetición, se anota la velocidad alcanzada por parte de cada animal así como el tiempo de permanencia en la rueda. El resultado es obtenido mediante una media aritmética de todos los valores.

4. Determinación cromatográfica de la actividad de la enzima tirosina triptófano hidroxilasa in vivo

Después de los tratamientos crónicos se inyectó NSD-1015 (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (100mg/kg, i.p.) a los animales, 30 minutos después fueron sacrificados por decapitación. La finalidad de la administración de NSD (clorhidrato de 3-hidroxibenzeno-hidrazina) es mantener la actividad de las enzimas tirosina hidroxilasa y triptófano

hidroxilasa, enzimas limitantes en las vías de síntesis de catecolaminas y serotonina, respectivamente. Concretamente, es un inhibidor de la enzima L-descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos centrales de manera que su acción bloquea la transformación de DOPA a DA y NA y de 5-HTP a 5-HT estudiando así la acumulación de estos precursores *in vivo* durante 30 minutos previos al sacrificio del animal. Los niveles obtenidos de DOPA y 5-HTP dan una aproximación de la actividad de las enzimas limitantes en la producción de las monoaminas NA, DA y 5-HT.

Una vez sacrificados, se extraen los cerebros y se obtienen las regiones útiles para el estudio sobre una placa de aluminio a 4°C. Las regiones cerebrales extraídas fueron, por orden de extracción: glándula pineal, cerebelo, tronco, corteza frontal, hipotálamo, ganglios basal, hipocampo, estriado y corteza cerebral. Fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta la hora de los análisis correspondientes (Esteban et al. 2010a, 2010b).

A la hora del procesamiento de las muestras para su posterior análisis, las regiones fueron pesadas y colocadas individualmente en tubos frescos dispuestos con 1ml de tampón de homogeneización (HClO₄ 0,4M, K₂EDTA 0,01% y Na₂S₂O₅ 0, 1%). Se homogeneizó el contenido de cada tubo con un homogeneizador Ultraturrax (tipo Tp 18/10) a velocidad máxima durante 30 segundos. A continuación, se centrifugó las muestras a 40000g durante 20 minutos a 4°C (centrifuga refrigerada serie Biocat 22R, con rotor Orto ALRESA RT222Ns 140311/01) y el sobrenadante resultante fue filtrado con un filtro de jeringa de teflón de 0.45µm de diámetro de poros (Spartan-3, Sigma-Aldrich; Millex®-LH; Millipore; Billerica, Mass, USA). Se volvieron a congelar a -80°C los sobrenadantes filtrados hasta el momento de la cuantificación mediante HPLC con detección electroquímica (Sarubbo et al. 2015).

4.1. Análisis cromatográfico

La técnica utilizada para medir los niveles de monoaminas (DA, 5-HT, NA), de sus precursores (DOPA, 5-HTP) y metabolitos (DOPA, DOPAC, 5-HIAA, 5-HTP, HVA) fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Ver figura 8) en fase reversa y con detección electroquímica. Esta técnica pretende separar compuestos químicos en función de su diferente afinidad por una fase móvil y una estacionaria. La fase móvil circula con íntimo contacto con un sólido muy poroso de elevada capacidad absorbente u otro líquido inmiscible, fase estacionaria.



Figura 8. Dispositivo real utilizado para la ejecución del HPLC. Imagen obtenida en el laboratorio de Fisiología.

Cuando se introduce una mezcla de sustancias, la muestra en cuestión, en la fase móvil, cada uno de los compuestos avanza a lo largo del sistema con una velocidad diferente, dependiendo de la afinidad por cada una de las fases. Esto supone que cuando la muestra haya terminado de recorrer la columna, cada una de las sustancias previamente introducidas al sistema eluye con un tiempo diferente, por lo que se habrá conseguido separarlas. Así, el mecanismo para realizar la separación de los compuestos en disolución es la retención de cada compuesto en la fase estacionaria durante diferentes tiempos. Los más polares y con menor tamaño son los que presentan más dificultad para disolverse en la columna apolar, por tanto, son los primeros en salir de la columna; mientras que los que tardan más son los de menor polaridad y mayor tamaño.

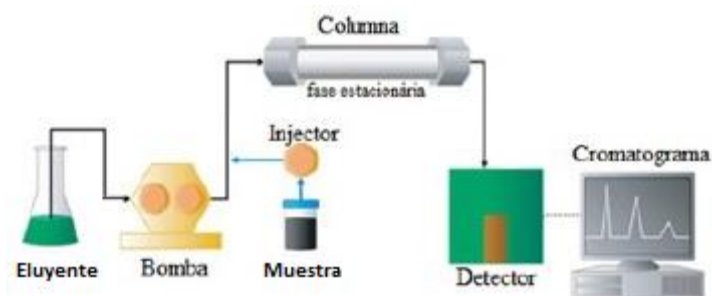


Figura 9. Esquema básico de las partes y los componentes que forman el sistema HPLC. Modificada de Ribot 2014

Se trata de un HPLC de fase reversa, esto significa que la fase estacionaria de la que dispone es polar. Se encuentra situada en una columna Spherisorb S3 ODS1 (5µm de tamaño de partícula, 4.6mm x 100mm; Waters), acoplada a una precolumna Tracer ODS2C18 (2-5µm de

tamaño de partícula) (Teknokroma). Por otra parte, la fase móvil o eluyente (KH_2PO_4 0,1 M; ácido octano sulfónico 2,1 M; K_2EDTA 0,1 M, metanol 10% (v / v) y 2mM NaCl; y pH ajustado al rango 2,72 -2,76 con H_3PO_4 85%) es impulsada a un flujo de 0.8ml / min mediante una bomba de doble pistón tipo Waters 600 controller para poder efectuar el recorrido y llegar a la columna que contiene la fase estacionaria.

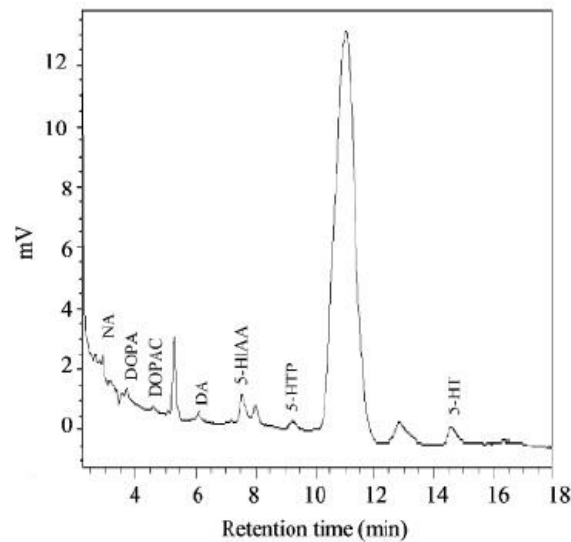


Figura 10. Análisis cromatográfico de una muestra de estriado donde se pueden observar los picos de los niveles de NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HIAA, 5-HTP y 5-HT. Ejemplo de cromatograma obtenido.

Los compuestos se detectaron electroquímicamente manteniendo un potencial aplicado de + 0.75V frente al electrodo de referencia in situ (Ag / AgCl) mediante un detector electroquímico (Waters 2465 Electrochemical Detector). La corriente producida por la oxidación de cada compuesto fue captada por un ordenador gracias al software Empower Pro Waters®, a través de una interfase tipo WAT Buss / IN Module (Waters). Se realizó una curva estándar para cada compuesto a estudiar a partir de patrones externos estándares. Posteriormente, se analizaron las muestras y, mediante el software se obtuvieron unas curvas que permitieron interpolar el pico de la muestra en la curva estándar, permitieron obtener las concentraciones de NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HTP, 5-HIAA, HVA, 5-HT (Ver figura 10).

Análisis estadístico

Para la realización de análisis estadísticos se ha utilizado el software *GraphPad Prism 5* t-Student test así como las gráficas correspondientes. Se ha considerado estadísticamente significativo un nivel mínimo de probabilidad inferior a 0,05 ($p \leq 0,05$) y los resultados han sido expresados como media \pm error estándar.

Resultados

Peso

Para estudiar la influencia que tiene la restricción calórica sobre el peso del animal, se modificaron las cantidades de comida durante 40 días. Los primeros 25 días, representados de 5 en 5 (Ver figura 9), se redujo la cantidad de comida un 80%, haciendo que estas bajasen del 100% del peso al 75%, mientras que los 15 días restantes se les redujo un 40% como medida de mantenimiento.

Una bajada brusca en los controles es debido al ayuno de 48 h previo a la prueba del Radial Maze. Las controles siempre tenían comida ad libitum (aproximadamente 20g/día).

Algo similar sucede con la temperatura corporal. En el caso de los animales control, este fue de $37,2 \pm 0,02$ °C. Por otro lado, en el caso de los animales sometidos a Restricción calórica (RC) los valores de temperatura corporal presentan una bajada significativa obteniendo valores de mesor iguales a $36,6 \pm 0,03$ °C.

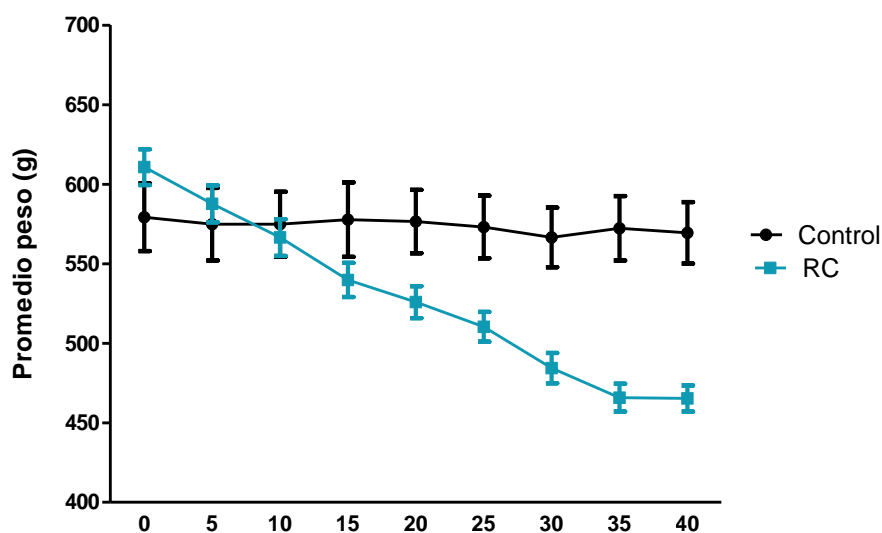


Figura 9. Variación del peso en los animales control, ad libitum, y animales tratados, con variaciones de la cantidad de comida, durante 40 días.

1. Memoria espacial

Para el estudio de la memoria espacial, los animales fueron sometidos a un test de *Radial Maze*. En dicho test se evalúan tres aspectos: el tiempo necesario para completar el laberinto (con un tiempo máximo establecido de 20 minutos desde el inicio de la prueba), el número de errores cometidos durante el test (repetición de entradas en el mismo brazo y brazos que quedan sin visitar) y distancia recorrida por el animal para completar el test (Ver figura 10).

Si analizamos el tiempo requerido para completar el test, el número de errores cometidos durante el test y la distancia recorrida mediante un análisis estadístico con t-student, se observan diferencias significativas tanto en el caso de los animales tratados con respecto a ellos mismos antes y después del tratamiento, como en el caso de estos mismos con respecto al grupo control a final de tratamiento.

Al realizar el análisis estadístico mediante una t-student se aprecian diferencias significativas entre el grupo sometido a restricción calórica con respecto al grupo control y, a su vez, el grupo tratado con respecto a el mismo tras finalizar el tratamiento.

El tiempo necesario para completar el test queda representado en la figura 10A, pudiendo observar como los animales sometidos a restricción calórica mejoran su tiempo disminuyéndolo con respecto al inicio de tratamiento. Sin embargo, en el caso de los animales control, estos han aumentado su tiempo de permanencia aunque de forma no significativa.

Además, si comparamos los animales tratados con respecto a los control, los de RC tardan un 35% menos en completar el test a final de tratamiento que no los tratados.

En el caso de los errores, representados en la figura 10B, los animales tratados disminuyen un 55% el número de estos para completar la prueba comparado con los controles. Con respecto a ellos mismos al inicio han disminuido el número de errores un 45% mientras que el grupo control no cambió significativamente.

En el caso de la distancia recorrida, representada en la figura 10C, esta se ve disminuida en los animales de RC respecto a los controles un 37%. Con respecto a ellos mismos al inicio han disminuido un 28%.

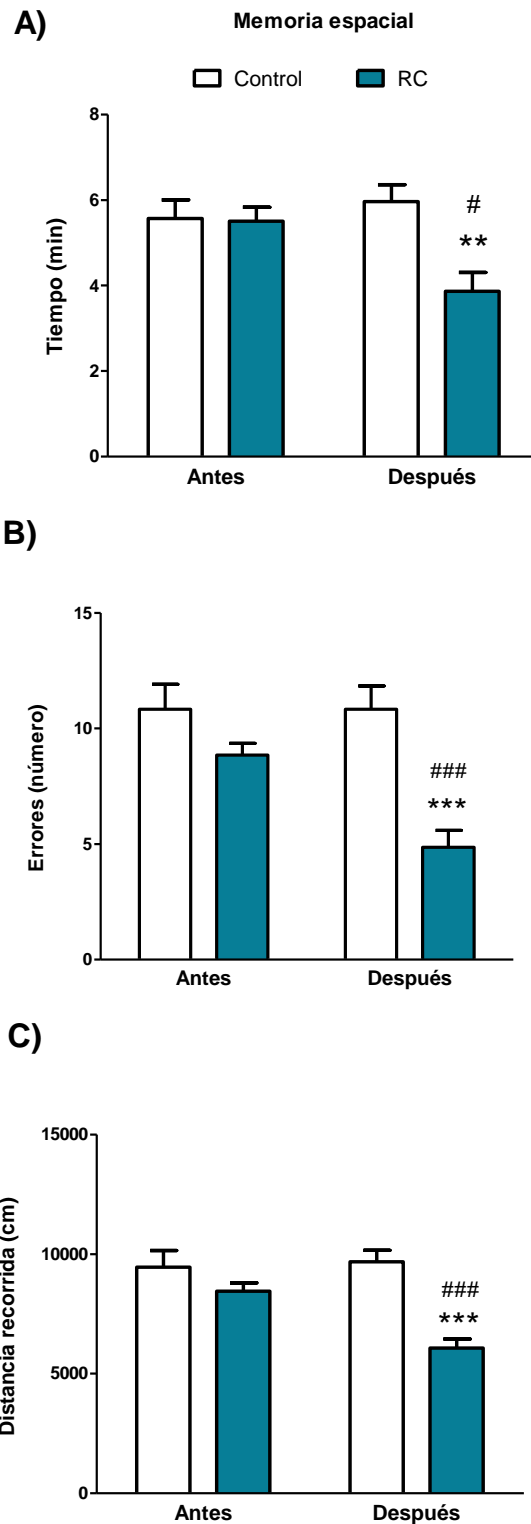


Figura 10. Efectos de la restricción calórica en el test *Radial Maze* comparando con su respectivo grupo control. Las barras muestran la media \pm ES del tiempo necesario para completar el test (A), del número de errores realizados durante el test (B) así como la distancia recorrida (C). El Student's t-test detecta diferencias significativas tras el tratamiento: (***) $p \leq 0,001$, (**) $p \leq 0,01$ comparando el grupo sometido a restricción calórica respecto al grupo control; (#) $p \leq 0,05$, (###) $p \leq 0,001$ comparando el grupo sometido a restricción calórica respecto a el mismo antes de ser tratado.

2. Memoria de trabajo no espacial

Para analizar la memoria de trabajo no espacial en relación a la restricción calórica se sometió a los animales a un test de reconocimiento de objetos en el cual se analiza el tiempo de exploración de dos objetos distintos en un campo abierto, de manera que uno de ellos le resultará familiar y el otro nuevo, anotando si aparecen diferencias de tiempo de exploración entre los animales control y los tratados.

Tanto antes como después de tratamiento, se observa un mayor tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al familiar, como corresponde con la capacidad exploratoria innata de la rata (figura 11).

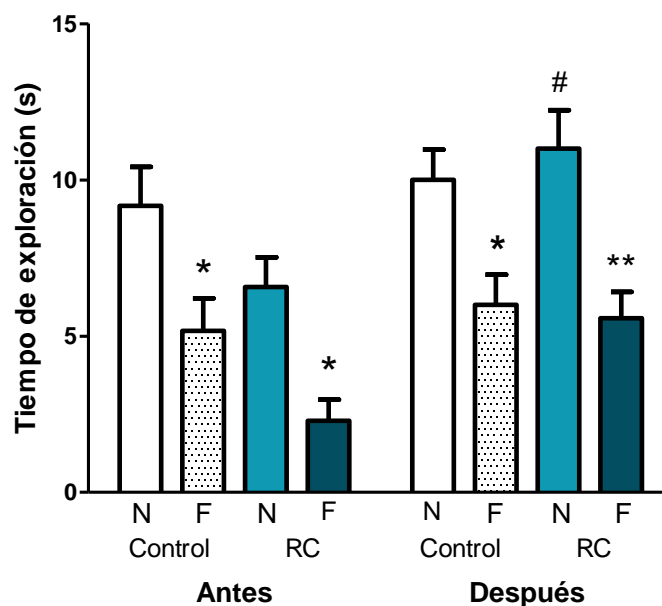


Figura 11. Tiempo de exploración en el test de Reconocimiento de objetos por parte de los animales en referencia al objeto nuevo y al objeto familiar. Las barras muestran la media \pm ES para completar el test. El Student's t-test detecta diferencias significativas tras el tratamiento: (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$ comparando el grupo sometido a restricción calórica respecto al grupo control; (#) $p \leq 0,05$ comparando el grupo sometido a restricción calórica respecto a el mismo antes de ser tratado.

Se observa un aumento significativo del tiempo de exploración, capacidad exploratoria, del objeto nuevo por parte de los animales sometidos a restricción calórica respecto al inicio del tratamiento. Por el contrario, no se observaron diferencias en el grupo control.

3. Coordinación motora

Para estudiar el efecto de la restricción calórica sobre la coordinación motora se realizó el test de *Rota-Rod*, los resultados obtenidos se presentan en la figura 12. El test consiste en anotar el tiempo de permanencia del animal sobre la rueda sin caerse. El test estadístico aplicado para el tratamiento de datos es una t de student pudiendo observar la presencia de diferencias significativas en los animales tratados respecto a su control y diferencias estadísticas con respecto a ellos mismos transcurridos 15 días desde el inicio del estudio. Por

el contrario, no se aparecen diferencias significativas en cuanto a los animales control a lo largo del estudio.

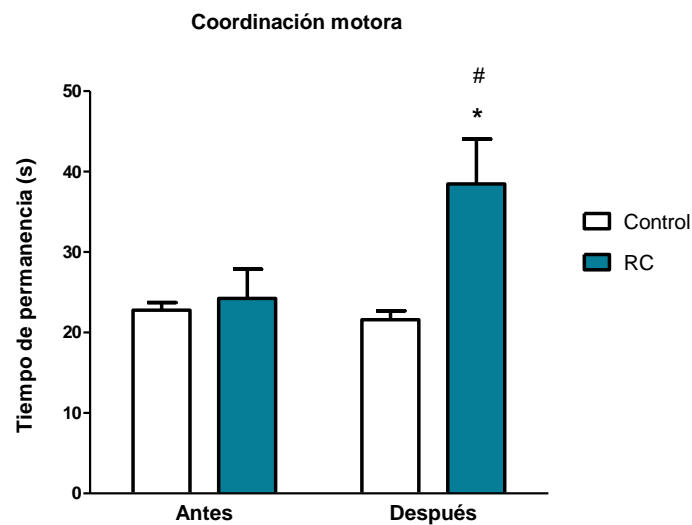


Figura 12. Efectos de la restricción calórica en el test *Rota-Rod* en comparación con su control. Las barras representan la media \pm ES del tiempo necesario para completar el test. El Student's t-test detecta diferencias significativas tras el tratamiento: (*) $p \leq 0,05$ comparando el grupo sometido a restricción calórica con respecto al control, (#) $p \leq 0,05$ respecto al mismo grupo al inicio del tratamiento.

4. Efecto de la restricción calórica en el sistema monoaminérgico en estriado y en hipocampo de ratas adultas

El estriado es una región donde hay abundantes neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas. Por ello, se determinaron los niveles de DOPA, DA, DOPAC, HVA, 5HIAA, 5-HT y 5HTP, en estriado de ratas adultas.

En la figura 13 se muestra la cantidad ($\mu\text{g} / \text{mg}$ tejido húmedo) de DOPA (precursor de DA), DA, DOPAC y HVA, principales metabolitos de la DA en el estriado. Se puede observar un aumento significativo de DOPA al someter a los animales a restricción calórica con respecto al control. Lo mismo ocurre en cuanto a la DA, DOPAC y HVA.

Estriado

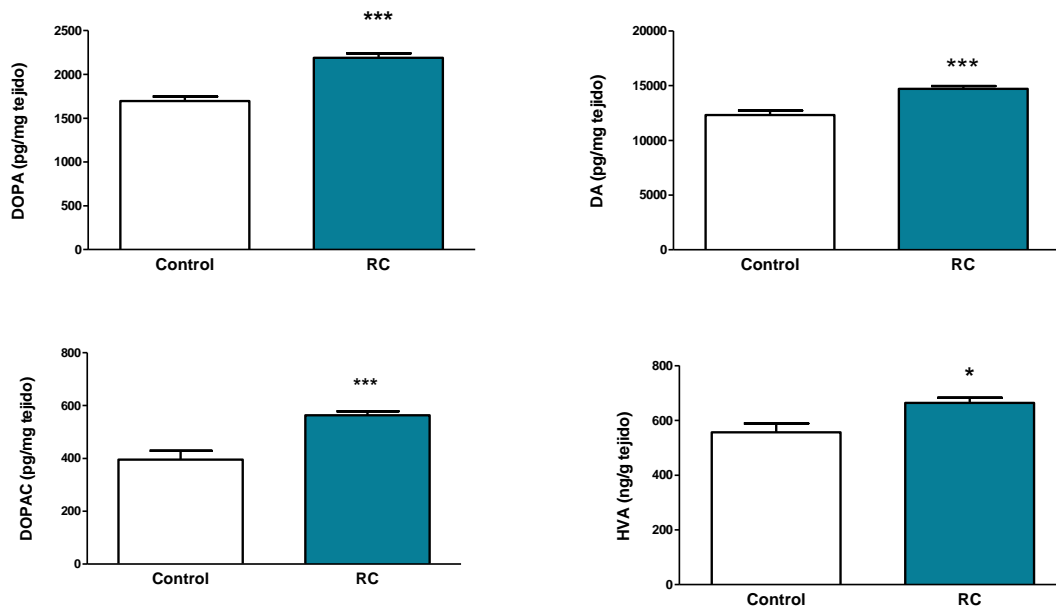


Figura 13. Efecto de la RC sobre la acumulación de DOPA, DA, DOPAC y HVA después de la inhibición de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa mediante NSD-015 (100mg / kg, intraperitoneal). Los grupos de ratas control (n = 9) fueron tratados con vehículo salino (1mg / kg / día). Las columnas representan la media \pm error estándar de la media, ambos obtenidos del análisis de los n animales por grupo. La estadística se basa en el análisis del test T-Student detectando diferencias significativas tras el tratamiento: (*) $p \leq 0,05$, (***) $p \leq 0,001$, comparando el grupo sometido a restricción calórica con respecto al grupo control.

El hipocampo es una región que presenta un gran número de neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas. En el caso de las neuronas noradrenérgicas, el HPLC nos sirve para identificar los niveles de DOPA y NA en el hipocampo.

La figura 14, muestra la cantidad (pg / mg tejido húmedo) de DOPA y NA en el hipocampo de animales control y sometidos a RC. Se puede observar un aumento significativo tanto en la cantidad de DOPA como en la cantidad de NA en el hipocampo respecto del control.

Hipocampo

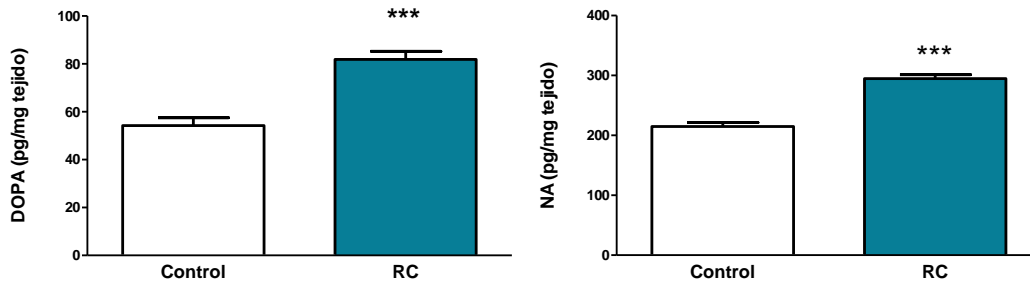


Figura 14. Efecto de la RC sobre la acumulación de DOPA y NA después de la inhibición de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa mediante NSD-015 (100mg / kg, intraperitoneal). Los grupos de ratas control fueron tratados con vehículo salino (1mg / kg / día). Las columnas representan la media \pm error estándar de la media, ambos obtenidos del análisis de los n animales por grupo. La estadística se basa en el análisis del test T-Student detectando diferencias significativas tras el tratamiento: (***) $p < 0,001$, comparando el grupo sometido a restricción calórica con respecto al grupo control.

En cuanto a las neuronas serotoninérgicas, además de ser abundantes en el estriado, se encuentran también en el hipocampo.

La figura 15, muestra la cantidad (pg / mg tejido húmedo) de 5-HT, de su precursor (5-HTP) y su principal metabolito (5-HIAA), en el estriado y en el hipocampo después de la RC. Se aprecian diferencias significativas en los niveles de 5-HTP y 5-HT de ambas regiones mientras que en el caso del 5-HIAA no hay diferencias significativas en ninguna región. En los animales sometidos a RC los niveles de 5-HTP y 5-HT fueron menores a los del grupo control.

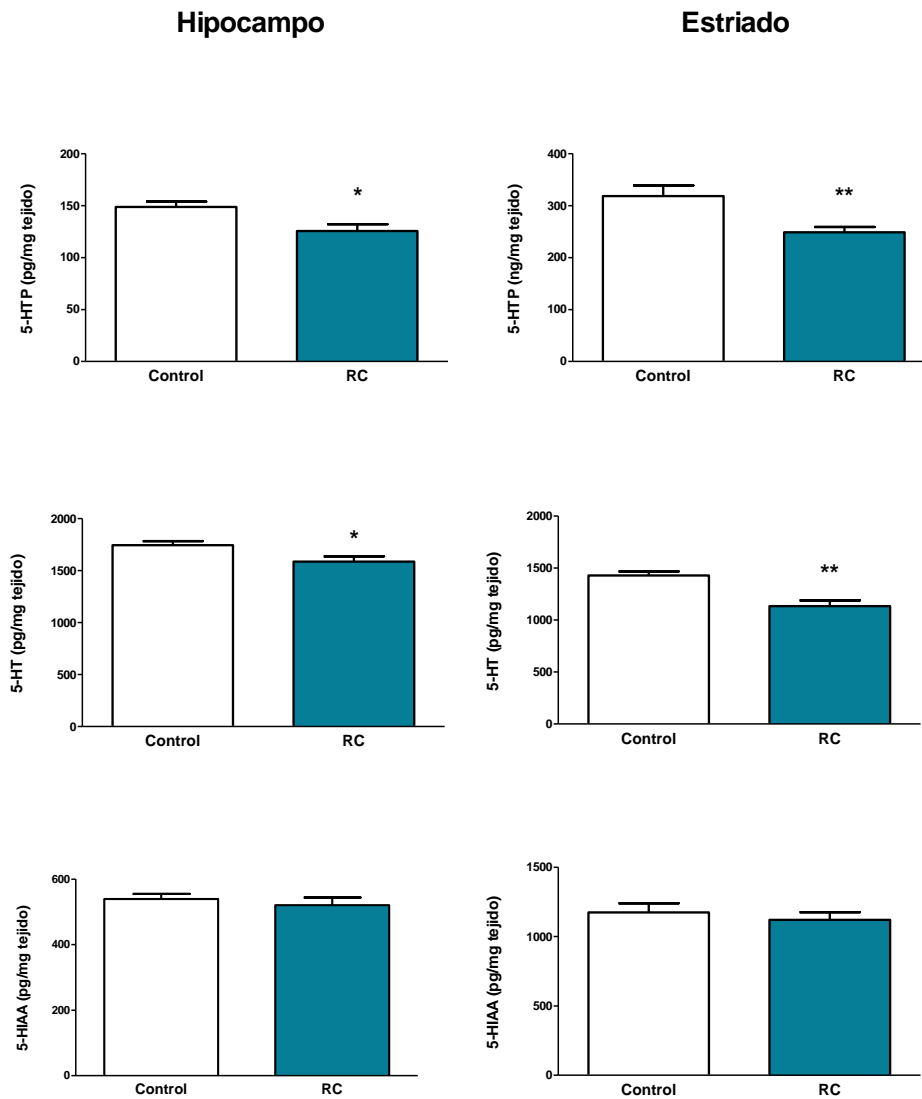


Figura 15. Efecto de la RC sobre la acumulación de 5-HTP, 5-HT y 5-HIAA después de la inhibición de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa mediante NSD-015 (100mg / kg, intraperitoneal). Los grupos de ratas control (n = 9) fueron tratados con vehículo salino (1mg / kg / día). Las columnas representan la media \pm error estándar de la media, ambos obtenidos del análisis de los n animales por grupo. La estadística se basa en el análisis del test T-Student detectando diferencias significativas tras el tratamiento: (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$, comparando el grupo sometido a restricción calórica con respecto al grupo control.

Discusión

Los resultados obtenidos después de examinar las tareas de memoria y la capacidad motora fueron consistentes con los datos neuroquímicos obtenidos respecto al sistema dopaminérgico y noradrenérgico, en hipocampo y estriado dos regiones cerebrales muy implicadas en la regulación de los procesos cognitivos (Bannerman et al. 2004; Gonzalez-Burgos & Feria-Velasco 2008).

Se observó una mejoría en los diversos test de memoria espacial y no espacial y en la coordinación motora en las ratas sometidas a restricción calórica, así como en los niveles de los neurotransmisores DA y NA. Ya que los procesos de aprendizaje y memoria están parcialmente reguladas por la actividad de estos neurotransmisores que se ven reducidos de forma considerable a lo largo de la edad (Esteban et al. 2010 a, 2010 b, Sarubbo et al. 2015), se podría considerar que la RC ha resultado un método eficaz para compensar los déficits que se producen en estos con el envejecimiento.

Efectos de la restricción calórica en el sistema dopaminérgico

El sistema dopaminérgico ha aumentado su actividad tras someter a los animales a restricción calórica. La tirosina hidroxilasa (TH) enzima limitante en la síntesis de dopamina (DA) ha aumentado su actividad tras la restricción calórica como puede observarse en los niveles de DOPA en estriado que son significativamente más altos que en los animales control. Como consecuencia se ven aumentados los niveles del neurotransmisor DA y de los metabolitos DOPAC y HVA. Esta mayor actividad del sistema dopaminérgico en estriado de los animales sometidos a restricción calórica podría explicar la mejora observada en los animales en el test del Rota-Rod ya que el sistema dopaminérgico en el estriado está muy implicado en la coordinación motora (Esteban et al., 2010 a, 2010 b). Sin embargo, no hay que olvidar que el menor peso de los animales ha podido contribuir a mejorar su rendimiento en el test del Rota-Rod.

Por otra parte, el sistema dopaminérgico también está implicado en los procesos de memoria y aprendizaje (Gonzalez-Burgos & Feria-Velasco 2008), y una disminución de DA cerebral se asocia con un empeoramiento de la memoria de trabajo (Brozoski et al. 1979), por lo que la mejora en el sistema dopaminérgico observada tras la restricción calórica podría explicar, al menos en parte, los mejores resultados que presentan las ratas sometidas a restricción calórica en algunos de los tests comportamentales realizados como es el caso de la memoria de trabajo espacial en el *Radial Maze*. No hay que obviar que los animales sometidos a restricción calórica perdieron peso a lo largo del estudio, lo que puede contribuir a mantener un mayor estímulo para el desarrollo de algunas pruebas comportamentales que tienen refuerzo de alimento como es el *Radial Maze*.

Efectos de la restricción calórica en el sistema noradrenérgico

El sistema noradrenérgico ha aumentado su actividad tras someter a los animales a restricción calórica. La tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de noradrenalina (NA), ha aumentado su actividad tras la restricción calórica como puede observarse en los niveles de DOPA en hipocampo que son significativamente más altos que en los animales control. Como consecuencia se ven aumentados los niveles del neurotransmisor NA. Esta mayor actividad del sistema noradrenérgico en hipocampo de los animales sometidos a restricción calórica podría explicar la mejora observada en los animales en el test del *Radial Maze* y Reconocimiento de objetos ya que el sistema noradrenérgico está implicado en los procesos cognitivos y en la capacidad de exploración de las ratas (Amemiya et al., 2014; Collier et al., 2004).

Efectos de la restricción calórica sobre el sistema serotoninérgico

La serotonina (5-HT) es una monoamina que surge a partir del triptófano la cantidad de la cual va a depender de su suministro dietético. Este aminoácido esencial, precisa de dos reacciones para dar lugar a la serotonina en sí: una primera reacción de hidroxilación del triptófano, que da lugar a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), y una segunda reacción de descarboxilación, donde el 5-HTP da lugar a la serotonina (5-HT). El paso limitante de la velocidad de síntesis de 5-HT es la primera reacción, la hidroxilación de triptófano, llevada a cabo por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH).

El sistema serotoninérgico disminuyó su actividad al someter a los animales a restricción calórica. Disminuyó la actividad de la TPH y en consecuencia los niveles de 5-HT y el metabolito 5-HIAA. La disminución de la actividad de la TPH puede ser muy probablemente debido a la escasez de triptófano ya que la TPH no está saturada por el sustrato (Esteban et al. 2004), al contrario de lo que ocurre con la TH. Resultados similares fueron observados en otros estudios de restricción calórica (Anderson et al. 1990; Cowen et al. 1996; Goodwin et al. 1987; Walsh et al, 1995).

Nuestros datos implican que el sistema serotoninérgico no ha estado implicado en la mejora de memoria que se observa en los animales sometidos a restricción calórica. Sería muy interesante realizar estos estudios con animales sometidos a RC con aporte externo de triptófano ya que la 5-HT está implicada en los procesos de memoria (Gonzalez-Burgos & Feria-Velasco 2008) y porque se podría evitar la depresión frecuentemente ligada a los procesos de restricción calórica (Chandler-Laney et al. 2007; Jahng et al. 2007).

Conclusiones

1. La restricción calórica ha mejorado las capacidades cognitivas y la coordinación motora de ratas de mediana edad medidas a través de diversas pruebas comportamentales.
2. La restricción calórica ha aumentado significativamente la síntesis de DA en el estriado, en base a un aumento en la acumulación de DOPA, lo que refleja un aumento en la actividad de la enzima TH limitante en la síntesis de DA.
3. La restricción calórica ha aumentado significativamente la síntesis de NA en el hipocampo, en base a un aumento en la acumulación de DOPA, lo que refleja un aumento en la actividad de la enzima TH limitante en la síntesis de NA.
4. La restricción calórica ha disminuido significativamente la síntesis de 5-HT en el hipocampo y estriado, en base a una disminución en la acumulación de 5-HTP, lo que refleja una disminución en la actividad de la enzima TPH limitante en la síntesis de 5-HT.
5. Los resultados obtenidos a nivel cognitivo y bioquímico sugieren la existencia de una correlación positiva entre el efecto beneficioso que ejerce la restricción calórica sobre los niveles de monoaminas (DA y NA) y sobre la capacidad cognitiva y motora de las ratas.

En resumen, los resultados del estudio realizado sugieren que la restricción calórica podría ser utilizado como mecanismo de prevención para contrarrestar el descenso en la neurotransmisión de NA y DA así como el deterioro de las capacidades cognitivas y la coordinación motora que se producen con la edad.

Agradecimientos

El trabajo ha sido posible gracias al soporte técnico y material del Laboratorio de Fisiología.

Así como, agradecerle a Margarita Ramis su apoyo a lo largo del trabajo.

Bibliografía

Amemiya S, Noji T, Kubota N, Nishijima T, Kita I. (2014) Noradrenergic modulation of vicarious trial-and-error behavior during a spatial decision-making task in rats. *Neuroscience* **265**:291-301

Anderson IM, Parry-Billings M, Newsholme EA, Fairburn CG, Cowen PJ. (1990) Dieting reduces plasma tryptophan and alters brain 5-HT function in women. *Psychol Med* **20**:785–791.

Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J. (2004) Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* **28**:273–283.

Borella E, Carretti B, De Beni R (2008) Working memory and inhibition across the adult life-span. *Acta Psychol (Amst)* **128**:33–44

Bouchard J, Villeda S.A. (2015) Aging and brain rejuvenation as systemic events. *Journal of neurochemistry* **132**: 5-19

Brozoski TJ, Brown RM, Rosvold HE, Goldman PS. (1979) Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* **205**:929–932.

Cao SX, Dhahbi JM, Mote PL, Spindler SR. (2001). Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *PNAS* **98**: 10630–10635

Chandler-Laney PC, Castaneda E, Pritchett CE, Smith ML, Giddings M, Artiga AI, Boggiano MM. (2007) A history of caloric restriction induces neurochemical and behavioral changes in rats consistent with models of depression. *Pharmacol Biochem Behav* **87**(1):104-114.

Collier TJ, Greene JG, Felten DL, Stevens SY, Collier KS. (2004) Reduced cortical noradrenergic neurotransmission is associated with increased neophobia and impaired spatial memory in aged rats. *Neurobiol Aging* **25**:209–221.

Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H.A., Kemnitz, J.W., Weindruch, R., (2009). Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* **325** (5937), 201–204

Cowen PJ, Clifford EM, Walsh AE, Williams C, Fairburn CG. (1996) Moderate dieting causes 5-HT_{2C} receptor supersensitivity. *Psychol Med* **26**:1155–1159.

Dhurandhar Emily J, et al. (2013). Hunger in the Absence of Caloric Restriction Improves Cognition and Attenuates Alzheimer’s Disease Pathology in a Mouse Model. *Plos one* **8**

Esteban *et al.* (2004). 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** : 170–177

Esteban S, Garau C, Aparicio S, Moranta D, Barceló P, Ramis M, Tresguerres JA, Rial R. (2010 a) Improving effects of long-term growth hormone treatment on monoaminergic neurotransmission and related behavioral tests in aged rats. *Rejuvenation Res* **13**(6):707-716

Esteban S, Garau C, Aparicio S, Moranta D, Barceló P, Fiol MA, Rial R. (2010 b) Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *J Pineal Res*. **48**(2):170-177

Gonzalez-Burgos I, Feria-Velasco A. (2008) Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res*; **172**:603–623.

Goodwin GM, Fairburn CG, Cowen PJ. (1987) Dieting changes serotonergic function in women, not men: implications for the aetiology of anorexia nervosa? *Psychol Med* **17**:839–842.

Ingram, D.K., Zhu, M., Mamczarz, J., Zou, S., Lane, M.A., Roth, G.S., deCabo, R., (2006). Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Ageing Cell* **5** (2): 97–108.

Ingram, D.K., Roth, G.S., (2015). Calorie restriction mimetics: can you have your cake and eat it, too? *Ageing Res. Rev.* **20C**: 46–62.

Jahng JW1, Kim JG, Kim HJ, Kim BT, Kang DW, Lee JH. (2007) Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain Res*. **1150**:100-107

Kennedy, B.K., Steffen, K.K., Kaeberlein, M., (2007). Ruminations on dietary restriction and aging. *Cell. Mol. Life Sci.* **64** (11): 1323–1328.

Koprowska M, Krotewicz M, Romaniuk A, Strzelczuk M (2004) Age-related changes in fear behavior and regional brain monoamines distribution in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **64**:131–142

Lemon N, Manahan-Vaughan D (2006) Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* **26**:7723–7729

Luine V, Bowling D, Hearn M. (1990) Spatial memory deficits in aged rats: Contributions of monoaminergic systems. *Brain Res* **537**:271–278.

Malgor L.A., Valsecia M.E. (2000). Farmacología médica.

Masoro, E.J.,(2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.***126** (9), 913–922.

Mattson & Magnus (2016). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature* **7**:278-294

McCay, C.M., Crowell, M.F., Maynard, L.A., 1935. The effect of retarded growth upon the length of life and upon ultimate size. *J. Nutr.* **10**: 63–79.

Meneses A (1999) 5-HT system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* **23**:1111–1125

Míguez JM, Aldegunde M, Paz-Valiñas L, Recio J, Sánchez-Barceló E (1999) Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *J Neural Transm* **106**:1089–1098

Morrison AB, Chein JM (2011) Does working memory training work? The promise and challenges of enhancing cognition by training working memory. *Psychon Bull Rev* **18**:46–60

Murchison CF, Zhang XY, Zhang WP, Ouyang M, Lee A, Thomas SA (2004) A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* **117**:131–143

Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S., (1964). Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **239**:2910-2917

Park DC, Lautenschlager G, Hedden T, Davidson NS, Smith AD, Smith PK (2002) Models of visuospatial and verbal memory across the adult life span. *Psychol Aging* **17**:299–320

Ramis M, Sarubbo F, Sola J, Aparicio S, Garau C, Miralles A, Esteban S. (2013) Cognitive improvement by acute growth hormone is mediated by NMDA and AMPA receptors and MEK pathway. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **45**:11-20

Ramis MR, Esteban S, Miralles A, Tan DX, Reiter RJ, (2015). Caloric restriction, resveratrol and melatonin: Role of SIRT1 and implications for aging and related-diseases. *Mech of Ageing Dev* **146**: 28-41.

Ribot (2014). Estudio del efecto del α -tocoferol en el declive de la neurotransmisión dopaminérgica, noradrenérgica y serotoninérgica que ocurre durante el envejecimiento.

Ruiz (2014). Efecto de los antioxidantes en la prevención del envejecimiento cerebral.

Sarubbo F., et. al. (2015). Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats. *Age* **37**:37

Shipstead Z, Redick TS, Engle RW (2010) Does working memory training generalize? *Psychol Belg* **50**:245–276

Takeuchi H, Taki Y, Kawashima R (2010) Effects of working memory training on cognitive functions and neural systems. *Rev Neurosci* **21**:427–449.

Venero JL, Machado A, Cano J (1991) Turnover of dopamine and serotonin and their metabolites in the striatum of aged rats. *J Neurochem* **56**:1940–1948

Vera K.S. (2005). Neurobiología de la depresión mayor y de su tratamiento farmacológico. Facultad de Medicina. Maestría en Ciencias Fisiológicas

Walsh AE, Oldman AD, Franklin M, Fairburn CG, Cowen PJ. (1995) Dieting decreases plasma tryptophan and increases the prolactin response to d-fenfluramine in women but not men. *J Affect Disord* **33**:89–97.

Weindruch, R., (1996). The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates. *Toxicol. Pathol.* **24** (6), 742–745.