



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

**Memoria del Trabajo de Fin de Grado**

# Efecto de los antioxidantes en la prevención del envejecimiento cerebral

Laura Ruiz Guerra

**Grado de Biología**

Año académico 2013-14

DNI del alumno: 43179491G

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, declive cognitivo, memoria, coordinación motora, Radial maze, Barnes maze, Reconocimiento de objetos, Rota-rod, estrés oxidativo, polifenol, (+)-catequin, extracto de té verde, poliphenon60



# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1. ENVEJECIMIENTO EN LA POBLACIÓN .....	5
2. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO: TEORÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO .....	6
3. ANTIOXIDANTES COMO TERAPIA .....	7
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	11
2. FÁRMACOS Y TRATAMIENTO .....	11
3. PRUEBAS COMPORTAMENTALES .....	12
3.1. Radial maze .....	12
3.2. Test de Barnes .....	13
3.3. Reconocimiento de objetos.....	14
3.4. Rota-rod.....	16
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	17
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
1. MEMORIA ESPACIAL.....	18
2. MEMORIA DE TRABAJO NO ESPACIAL.....	22
3. ACTIVIDAD Y COORDINACIÓN MOTORA .....	24
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>26</b>
1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON (+)-CATECHIN Y POLIPHENON60 EN LA MEMORIA ESPACIAL.....	26
2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON (+)-CATECHIN Y POLIPHENON60 EN LA MEMORIA DE TRABAJO NO ESPACIAL .....	27
3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON (+)-CATECHIN Y POLIPHENON60 EN LA ACTIVIDAD Y COORDINACIÓN MOTORA.....	27
4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS POLIFENOLES ESTUDIADOS.....	28
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>30</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>30</b>

# RESUMEN

---

Actualmente la esperanza de vida está aumentando a nivel mundial, por lo que mantener una buena calidad de vida y retrasar el declive, tanto cognitivo como motor, asociado al envejecimiento resulta de gran interés para la sociedad actual. La literatura científica proporciona evidencias a favor de los beneficios preventivos y terapéuticos de los polifenoles, al mismo tiempo que el interés público también se expande. Los cambios asociados con la edad en un individuo son complejos y se producen en múltiples niveles del organismo. Las investigaciones que se han llevado a cabo muestran la capacidad dinámica de los polifenoles para proteger contra los desórdenes asociados a la edad a través de una variedad importante de mecanismos. Numerosas evidencias sugieren que una dieta rica en polifenoles tiene la capacidad de mitigar el daño celular asociado a la edad inducido por la producción de radicales libres de oxígeno (ROS). Dado que la teoría del estrés oxidativo es actualmente la más aceptada para explicar el proceso del envejecimiento, estos resultados son muy importantes para centrar futuras investigaciones en el papel de los polifenoles como antioxidantes. En el presente trabajo se ha estudiado el efecto del tratamiento crónico con dos polifenoles ((+)-catechin y poliphenon60) sobre las capacidades cognitivas y motoras. Se ha observado que estos compuestos han mejorado las capacidades cognitivas y la coordinación motora de ratas viejas medidas a través de diversas pruebas comportamentales, frenando o retrasando los efectos negativos asociados a la edad. Estos resultados muestran una correlación con resultados de otros investigadores que han puesto de manifiesto que el extracto de té verde protege a la formación hipocámpal frente a la oxidación asociada a la edad, región cerebral implicada en los procesos de memoria y aprendizaje.

# SUMMARY

---

Currently life expectancy is increasing worldwide, so maintaining a good quality of life and slowing the motor and cognitive decline associated with aging is of great interest to society. The scientific literature provides evidence for preventive and therapeutic benefits of polyphenols, while the public interest also increase. Changes associated with age are complex and occur at multiple levels in the body. Investigations show the dynamic capacity of polyphenols to protect against age-related disorders through a variety of mechanisms. Evidences suggest that a diet rich in polyphenols have the ability to mitigate the cellular damage associated with age -induced production of oxygen free radicals (ROS). Since oxidative stress theory is the most widely accepted to explain the process of aging, these results are very important to focus future research on the role of polyphenols as antioxidants. In this work we have studied the effect of chronic treatment with two different polyphenols ((+)- catechin and poliphenon60) on cognitive and motor skills. It has been observed that these compounds have improved the cognitive abilities and motor coordination of aged rats measured by different behavioral tests, retarding or delaying the negative effects associated with aging. These results show a good correlation with results from other investigators who have shown that the green tea extract protects the hippocampal formation (a brain region involved in memory and learning processes) against age-related oxidation.

# INTRODUCCIÓN

## 1. ENVEJECIMIENTO EN LA POBLACIÓN

Durante el último siglo, el avance en los tratamientos contra las enfermedades ha ayudado a mejorar la calidad de vida y aumentar la longevidad significativamente. Por otro lado, el declive cognitivo se ha convertido en una de las principales amenazas contra la salud en edad avanzada (Bishop *et al.*, 2010). Se trata de una de las principales manifestaciones de los cambios producidos en las funciones neuronales con la edad, aun en ausencia de enfermedades neurodegenerativas (Devasagayam *et al.*, 2004). Actualmente, las personas con 85 años o más presentan una tasa de demencia (en la mayoría de casos en la forma de Alzheimer) cercana al 50% (Hebert *et al.*, 2003).

El envejecimiento de la población implica una importante presión sobre los sistemas de protección social y sanitaria, sobre todo si un porcentaje elevado de población mayor presenta algún tipo de dependencia porque realmente las personas dependientes generan un coste social y humano grande. En este sentido, en la actualidad uno de los temas sociales más relevantes es el futuro de las pensiones y el sostenimiento de nuestro sistema de bienestar. El previsible contexto demográfico de las próximas décadas implicará un profundo cambio en la orientación de las políticas públicas, tanto por razones de eficacia económica como de equidad social (Truchado *et al.*, 2012).

Las siguientes gráficas representan este aumento en la esperanza de vida, tanto en España como a nivel mundial.

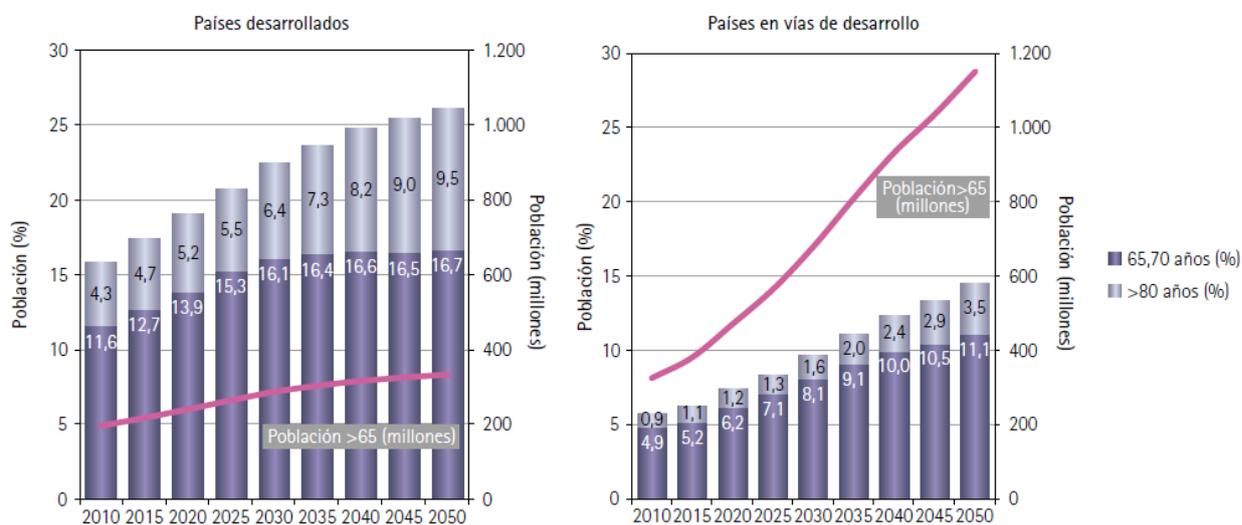


Figura 1. Población mayor de 65 años en países desarrollados y en vías de desarrollo, 2010-2050 (millones y porcentaje). Se trata de una proyección. Fuente: United Nations: World Population Prospects.

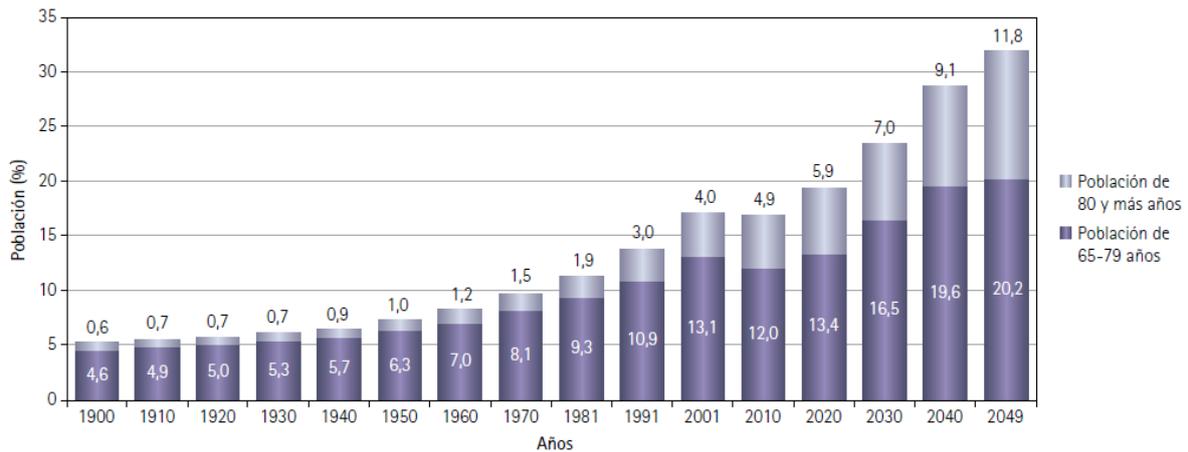


Figura 2. Evolución de la población mayor en España, 1900-2049. Hasta el año 2011 los datos son reales y el resto son proyecciones. Fuente: INEBASE. Cifras de población.

## 2. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO: TEORÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

No hay una definición universalmente aceptada para explicar el proceso de envejecimiento. Harman postuló que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de cambios en el cuerpo, que ocurre con el paso del tiempo y provoca un incremento en la probabilidad de sufrir una enfermedad y morir (Harman, 1956). En general, se define como un proceso universal, intrínseco, progresivo y deletéreo.

El envejecimiento disminuye la capacidad de mantener el medio interno frente a cambios externos. Además, provoca la disminución de una serie de capacidades: visión, audición, memoria, coordinación motora, y otras funciones neurológicas de importancia fisiológica (Viña *et al.*, 2007). Por lo tanto, está acompañado de cambios estructurales y neurofisiológicos en el cerebro, así como diferentes niveles de declive cognitivo. Entender la base de este declive resulta crítico para la sociedad actual y futura. Afortunadamente, en los últimos 15 años ha aumentado nuestro conocimiento sobre los mecanismos básicos moleculares de este proceso (Bishop *et al.*, 2010).

Se han postulado más de 300 teorías para intentar explicar este proceso y la teoría del estrés oxidativo es una de las más destacadas y mejor estudiadas (conocida también como teoría de los radicales libres). Esta teoría, propuesta por primera vez por Harman (1952), postula que los radicales libres producidos durante la respiración aeróbica son los responsables del daño oxidativo acumulado en proteínas, lípidos y ADN (Mandavilli *et al.*, 2002; Viña *et al.*, 2007).

Cada célula presenta mecanismos de protección frente a los efectos perjudiciales de los radicales libres (Devasagayam *et al.*, 2004). Sin embargo, con el envejecimiento, la eficiencia de los sistemas de defensa antioxidantes disminuye, así como la habilidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno y radicales libres (Lee *et al.*, 2004). Por lo tanto, el sistema antioxidante es incapaz de hacer frente a todos estos radicales (principalmente superóxido,  $O_2^-$ , y radical hidroxilo,  $OH\cdot$ ) que se generan continuamente durante la vida de la célula (Socci *et al.*, 1995).

El ADN probablemente sea la molécula diana del estrés oxidativo asociado a la edad y se ha comprobado que el ADN mitocondrial (ADNmt) se oxida mucho más con la edad que el ADN nuclear (Richter *et al*, 1988). El daño en el ADN mitocondrial, si no se repara, conduce a la alteración de la cadena de transporte de electrones y la consecuente producción de más ROS (Reactive Oxygen Species). Este ciclo vicioso de producción de ROS y daño del ADNmt, en última instancia, lleva a la pérdida de energía en la célula y apoptosis. Por lo tanto, se ha comprobado que el daño oxidativo del ADNm está implicado en varias enfermedades neurodegenerativas, cáncer y envejecimiento (Mandavilli *et al*, 2002).

El cerebro es un órgano particularmente vulnerable al estrés oxidativo (figura 3). Esto se debe a que presenta una elevada tasa de actividad (requiere aproximadamente el 20% del total de oxígeno usado en seres humanos) pero, en proporción, no tiene más antioxidantes que otros órganos. Además, contiene grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, que son altamente susceptibles a la peroxidación, y Fe y ascorbato, los cuales son importantes para la peroxidación lipídica (Floyd y Hensley, 2002; Mariani *et al.*, 2005).

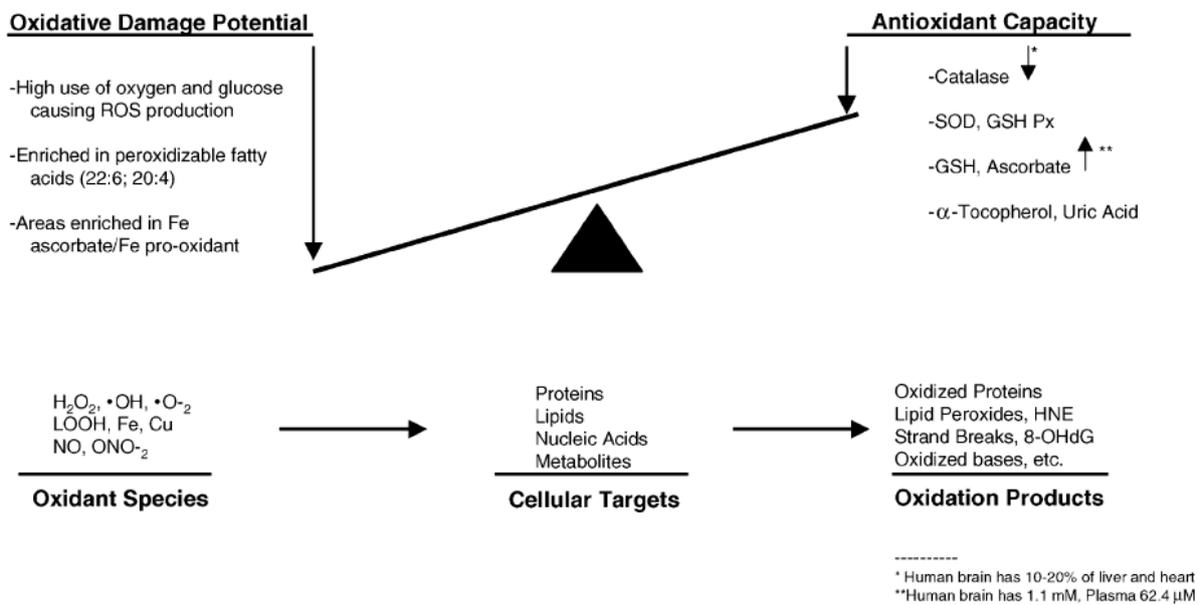


Figura 3. Riesgo de daño oxidativo en el cerebro. Fuente: Floyd y Hensley, 2002.

Esta teoría sugiere una intervención terapéutica: la administración de antioxidantes, los cuales podrían retrasar el daño asociado a la edad (Viña *et al.*, 2007). Si las especies reactivas de oxígeno son la principal causa de los procesos de envejecimiento, los antioxidantes pueden reducir sus niveles, ralentizando los procesos de envejecimiento y aumentando la calidad de vida (Lee *et al.*, 2004).

### 3. ANTIOXIDANTES COMO TERAPIA

Un antioxidante se define como “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana”. Los antioxidantes pueden ser moléculas complejas, como las

superóxido dismutasas, catalasas y peroxiredoxinas, o simples como el ácido úrico o el glutatión. Actúan en las reacciones de oxidación entre una molécula y un agente oxidante, removiendo los radicales libres antes de que puedan comenzar la cadena de reacciones que daña las células. Además, son capaces de inhibir otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. En cualquier caso, su actividad depende de su estructura y un punto crítico es la interacción entre varios antioxidantes en las células (Halliwell y Gutteridge, 2010).

Actualmente existen evidencias que correlacionan una elevada ingesta de alimentos con propiedades antioxidantes con una disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas o cáncer (Devasagayam *et al.*, 2004). En nuestra dieta los antioxidantes más abundantes son los polifenoles (ingesta diaria de aproximadamente 1 gramo), siendo sus principales fuentes las frutas y las bebidas derivadas de plantas (zumos de frutas, tés, cafés o vino rojo). Los vegetales, los cereales, el chocolate y las legumbres secas también contribuyen a la ingesta total de polifenoles (Scalbert *et al.*, 2005).

Recientemente se ha demostrado también el rol de los polifenoles como agentes anticancerígenos capaces de prevenir la formación de nueva vasculatura en los tejidos neoplásicos. Estos compuestos también presentan otras propiedades anticancerígenas, como acciones específicas de señalización celular que pueden estimular la actividad de la proteína reguladora SIRT1. Además, se ha demostrado que estos antioxidantes tienen efectos inhibitorios sobre la inflamación crónica vascular asociada a la aterosclerosis. (Queen *et al.*, 2010).

Dentro de los polifenoles o compuestos fenólicos, los flavonoides son el grupo con una mayor actividad antioxidante (Lee *et al.*, 2004). Se clasifican en función de sus características estructurales:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo –OH en posición 3 y además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

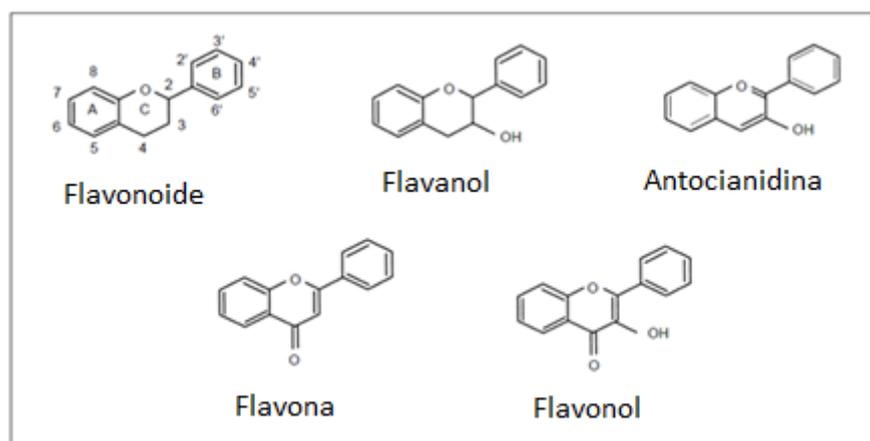


Figura 4. Estructura química básica de los flavonoides y los diferentes tipos. Fuente: Martínez-Florez *et al.*, 2002.

Con una taza de té verde ingerimos aproximadamente 400 mg de antioxidantes polifenólicos. Las hojas de este té son una fuente muy importante de polifenoles, especialmente de catequinas, un grupo decisivo para su actividad antioxidante. Las catequinas son derivados flavanos y dentro del grupo de los flavonoides se distinguen por presentar el grado de oxidación más alto (Gramza *et al.*, 2005). Las principales catequinas del té verde son:

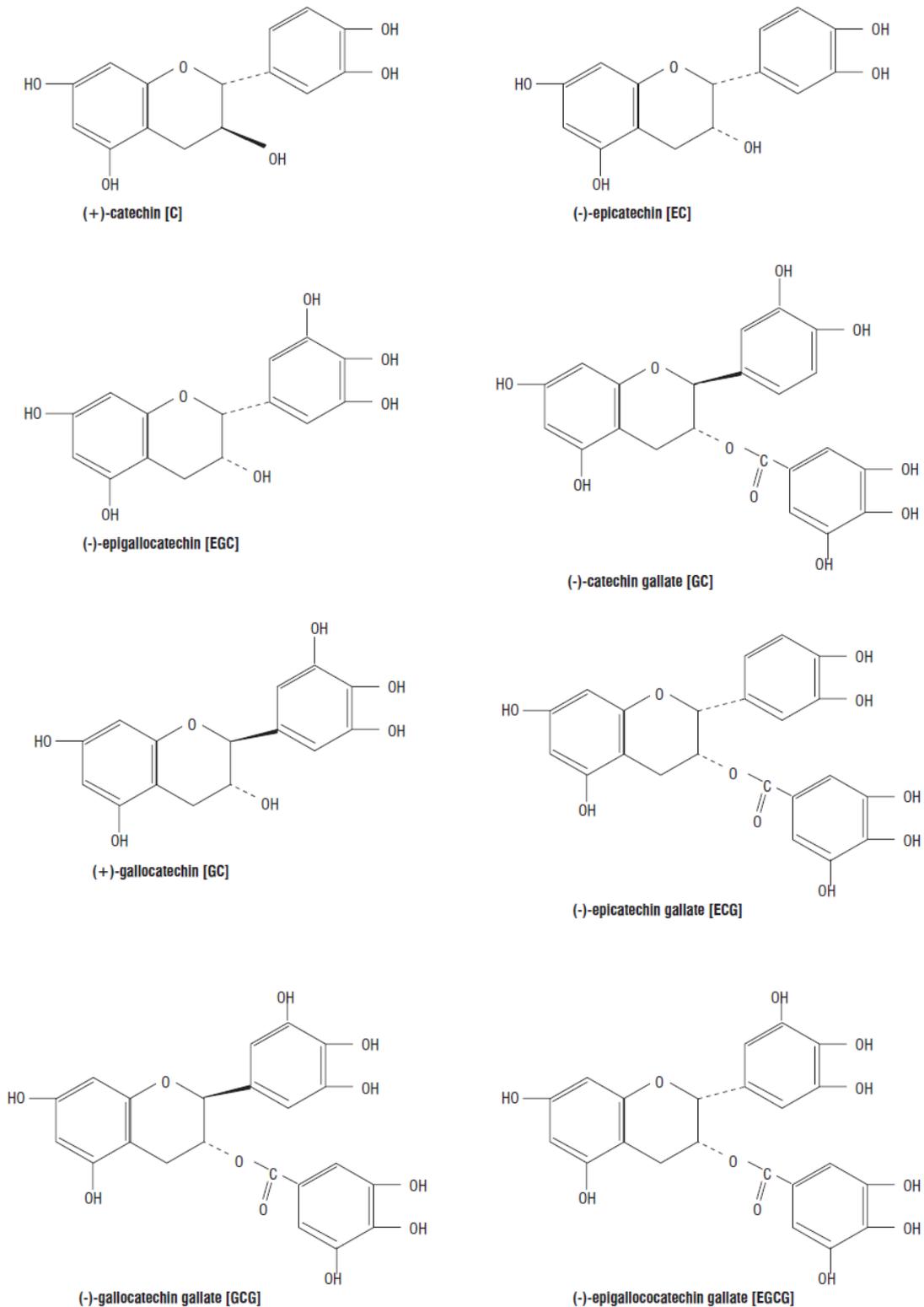


Figura 5. Estructura química de la catequina del té verde. Fuente: Gramza *et al.*, 2005.

Por esto, se han elegido el extracto de té verde (poliphenon60) y, en particular, la catequina ((+)- catequin) en el presente estudio para analizar su posible papel protector frente al envejecimiento cerebral.

Los mecanismos antioxidantes de los polifenoles se basan en la habilidad de donar hidrógeno y la quelación de iones metálicos, propiedad proporcionada por la presencia de un número variable de grupos hidroxilo fenólicos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

En los últimos años se ha avanzado en el estudio de las propiedades beneficiosas de los componentes del té verde. Kitani *et al.* (2004) observó que el té verde protegió contra el estrés oxidativo inducido por el etanol en ratas viejas. Además, previno el daño oxidativo producido por el etanol, el cual se ve aumentado por el envejecimiento en proteínas y lípidos. Unno *et al.* (2004) demostró que cuando se administraban catequinas del té verde en el agua para beber, éstas presentaban un efecto protector de la disfunción cognitiva y suprimían la atrofia cerebral en los animales estudiados. Además, el té verde también disminuye los niveles de 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxodG), un marcador del daño oxidativo del ADN, en el riñón, el hígado y el cerebro, sugiriendo que los polifenoles del té verde podrían tener un efecto beneficioso en el daño debido al proceso natural de envejecimiento. Dado que el té verde está ganando popularidad como un producto natural que mejora la salud, es importante estudiar sus mecanismos de acción en una forma dependiente de la dosis y el tipo de células (Zaveri, 2006).

Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende analizar si el tratamiento crónico con antioxidantes podría mejorar las capacidades cognitivas y motoras o retrasar el deterioro cognitivo que de forma natural se produce durante el envejecimiento.

## OBJETIVOS

---

1. Analizar los efectos del tratamiento crónico con extracto de té verde (poliphenon60) y catequina sobre las capacidades cognitivas y motoras de ratas viejas durante 28 días mediante tests comportamentales de memoria y aprendizaje.
2. Establecer una comparación entre los resultados obtenidos al aplicar los diferentes tratamientos, comparándolos con los controles.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

A lo largo de la investigación se han utilizado ratas macho Sprague Dawley (una línea de ratas de laboratorio, *R. norvegicus*) viejas (18 meses al inicio del tratamiento,  $640 \pm 5g$ ,  $n=19$ ), libres de patógenos específicos (SPF) (Charles River, Barcelona, España). Estos animales permanecieron en el estabulario de la *Universitat de les Illes Balears* (Tipo II, registro nº ES70400000540 en la *Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears*), adecuado para la experimentación con animales SPF, hasta conseguir la edad necesaria para realizar las diferentes pruebas del estudio.

Las ratas se han mantenido en jaulas de metacrilato (Panlab, Barcelona) con viruta de madera como materia de nidificación (Ultrasorb, Panlab) y libre acceso al agua y dieta estándar (Panlab A04). Han estado dispuestas en una cámara con unas condiciones ambientales determinadas y controladas: temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}C$ ), humedad (70%), y ciclo de luz-oscuridad 12/12 (con el cambio de luz a 8:00 - 20:00 h), utilizando lámparas fluorescentes de 250-300 lux de luz indirecta.

Los animales se han tratado en concordancia a la Convención Europea para la Protección de animales Vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos (Directiva 86/609/EEC), siendo los protocolos aprobados por el *Comitè d'ètica d'experimentació animal de la Universitat de les Illes Balears*.

## 2. FÁRMACOS Y TRATAMIENTO

Los tratamientos utilizados han sido: poliphenon60, (+)- catechin y aceite de maíz (como vehículo), todos ellos obtenidos en la casa comercial Sigma-Aldrich Corporation (USA).

El grupo control ( $n=6$ ) ha sido tratado con el vehículo aceite de maíz (1ml/kg/día) durante 28 días. La administración se ha realizado vía intraperitoneal, cuando se produce el cambio de luz para reducir el estrés.

Ambos tratamientos crónicos con los antioxidantes se han llevado a cabo a una dosis de 20 mg/kg/día ( $n=7$  para poliphenon y  $n=6$  para catechin) en una suspensión de 1 ml/kg en aceite de maíz. La administración se ha realizado siguiendo el mismo protocolo que para las ratas control. Para la administración de los fármacos los animales se han pesado diariamente.

En los periodos en que los animales se someten a pruebas comportamentales se les administra el fármaco después de realizarlas, de esta manera se evita que los resultados obtenidos puedan deberse a un efecto agudo del fármaco.

### 3. PRUEBAS COMPORMENTALES

Las pruebas comportamentales se han llevado a cabo de las 8:30 a las 13:00 horas. Los tests se deben realizar siempre aproximadamente a la misma hora, ya que a lo largo del día el nivel de actividad va variando y los resultados no serían comparables.

Después de cada fase se limpian todos los dispositivos utilizados con etanol 70%.

#### 3.1. Radial maze

El laberinto radial (Panlab, S.L. Barcelona, España) consta de una plataforma central octogonal (28 cm de diámetro) a partir de la cual surgen 8 brazos (70 x 11 cm) equidistantes. En los extremos de los brazos se sitúan 8 pocillos, en los cuales se coloca una pequeña cantidad de comida.

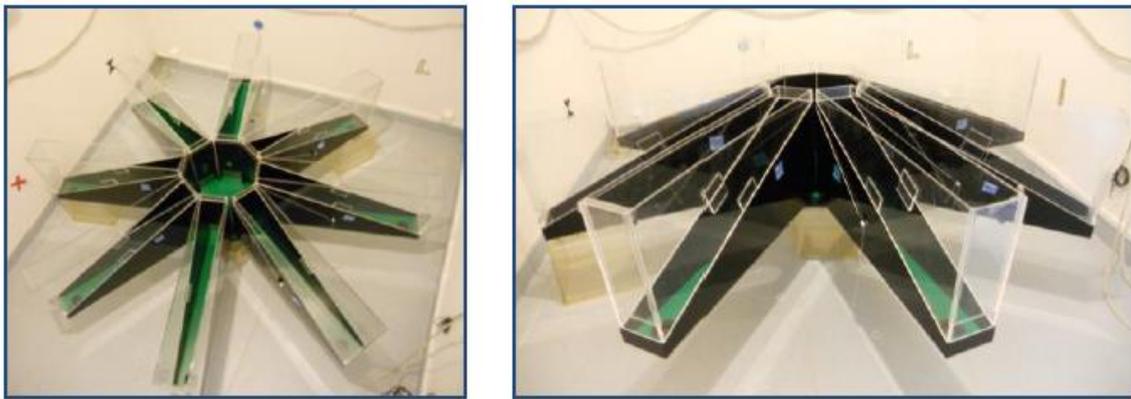


Figura 5. Dispositivo del *Radial maze*.

Antes de realizar el test las ratas se someten a 48 horas de ayuno (con libre acceso al agua) como refuerzo positivo que las motive a entrar en los brazos para buscar la comida.

La prueba se inicia colocando al animal en el centro del laberinto radial y a lo largo del test se van anotando los brazos visitados, el tiempo transcurrido, el recorrido del animal y en cuántos brazos ha comido. La prueba finaliza cuando la rata ha entrado en todos los brazos hasta el final o han transcurrido un máximo de 20 minutos.

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.

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.

### 3.2. Test de Barnes

El laberinto de Barnes consiste en una tabla de madera circular (130 cm de diámetro) apoyada en un soporte metálico a 75 cm del suelo. La tabla contiene 18 agujeros de 10 cm de diámetro situados a 3 cm del extremo y con una distancia entre ellos de 10 cm. Uno de los agujeros conecta a una caja de plástico (20 x 10 cm) y éste se considera el agujero objetivo o *target*, mientras que el resto son agujeros falsos (caída al suelo). En la sala donde se encuentra el laberinto hay señales en las paredes que facilitan la orientación del animal durante la prueba, incluyendo al mismo experimentador, que siempre debe colocarse en el mismo sitio.

El objetivo es que el animal entre en el *target* para refugiarse del exceso de luz al que se le somete (estímulo negativo, prueba de escape). Esta prueba permite valorar la memoria y el proceso de aprendizaje visuo-espacial.



Figura 6. Dispositivo del test de Barnes. A la izquierda se pueden ver las señales dispuestas en la pared para facilitar la orientación del animal en la prueba.

Consta de dos fases: familiarización y test.

1. Familiarización: consiste en habituar al animal al laberinto. Se realiza el día anterior al test, de manera que se coloca al animal en el laberinto para que explore libremente hasta que entre en el *target* o, en su defecto, un máximo de 3 minutos. A continuación, se deja al animal 1 minuto en oscuridad dentro del *target* (en caso de que no lo haya localizado se le dirige).
2. Test: se divide en los entrenamientos y la prueba final.
  - a. Se realizan 3 entrenamientos previos, dejando 10 minutos entre cada uno. Las ratas se mantienen en oscuridad (con la jaula tapada) y para iniciar la prueba se coloca al animal en un cilindro de cartón en el centro del laberinto con la luz apagada durante 10 segundos. Transcurridos los 10 segundos, se enciende la luz, se quita el cilindro de cartón y la rata explora el laberinto hasta encontrar el *target* o hasta un máximo de 180 segundos. Finalmente, se mantiene al animal durante 60 segundos dentro del *target* con la luz apagada.
  - b. Para realizar el test se sigue el mismo protocolo que en los entrenamientos, pero con un tiempo máximo de 90 segundos.

Al final de la prueba se anota el tiempo que ha tardado la rata en llegar al *target* (latencia total), el recorrido seguido (agujeros que ha explorado), la estrategia de búsqueda del *target* y el número de errores (agujeros visitados que no sean el *target*). También se anota el tiempo en el que encuentra el *target* por primera vez (latencia primaria), ya que a veces no entran al encontrarlo.

La estrategia puede ser de tres tipos:

- Directa: el animal se dirige directamente al *target* o a cualquiera de los dos agujeros contiguos.
- Seriada: la rata va hacia un agujero, seguidamente al contiguo y así sucesivamente hasta llegar al *target*.
- Aleatoria o mixta: no sigue ningún patrón definido.

### 3.3. Reconocimiento de objetos

Para analizar la memoria de trabajo de tipo no espacial de las ratas viejas se ha utilizado el test de reconocimiento de un objeto nuevo. Se trata de un test basado en la capacidad exploratoria espontánea de los animales. Este test analiza la capacidad de integrar información nueva y recuperar la información adquirida, ya que requiere que el animal recuerde el objeto a corto plazo (10 minutos).

La prueba se ha realizado en el dispositivo del 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. En esta prueba los parámetros que se analizan son: el tiempo de exploración de cada objeto y el recorrido realizado. Este dispositivo también 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.

Se lleva a cabo en dos fases: habituación y prueba.

1. Habituación: consiste en acostumbrar al animal al lugar donde se realizará la prueba, dejando que se familiarice y explore libremente. Para ello en los 3 días previos al test se coloca cada animal en el campo abierto, sin los objetos a utilizar en la siguiente fase, durante 10 minutos. Es importante que en esta fase vean al experimentador para que después en el test no se asusten por su presencia; al igual que al ruido de los cronómetros, que se van pulsando aleatoriamente.
2. Prueba: esta fase se realiza en varios pasos.
  - a. Rehabituación: el día del test se colocan los animales en el campo abierto durante 1 minuto para que lo reconozcan.



Figura 7. Dispositivo del campo abierto. Fase de habituación en el reconocimiento de objetos.

- b. 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).

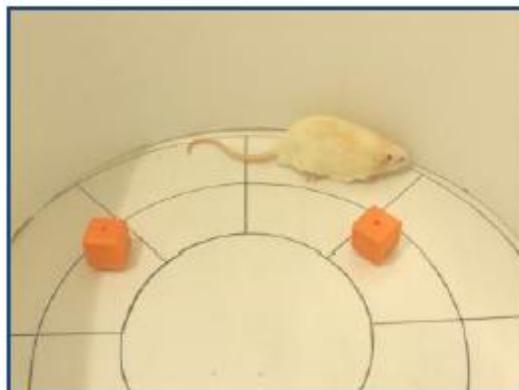


Figura 8. Dispositivo del campo abierto con dos objetos idénticos. Fase de familiarización en el reconocimiento de objetos.

- c. Retraso: se dejan pasar 10 minutos antes de realizar el test.
- d. 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.

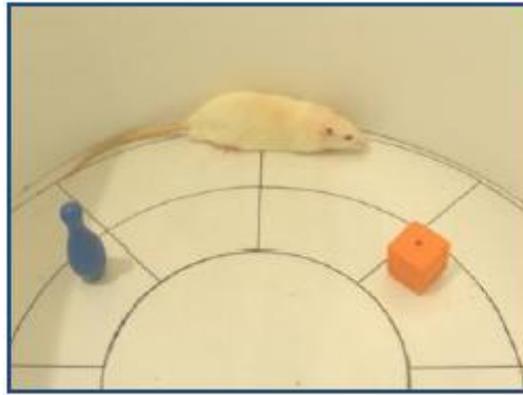


Figura 9. Dispositivo del campo abierto con dos objetos diferentes. Fase de test en el reconocimiento de objetos.

Para 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. De esta manera se evita el posible error por preferencia de un determinado color por parte de los animales y se comprueba que el animal tiene capacidad exploratoria.

### 3.4. Rota-rod

El *Rota-rod* (Panlab, S.L., Barcelona, España) consiste en una rueda (8 cm de diámetro) colocada a una altura de 42 cm y su velocidad de giro se va incrementando de 4 a 40 cm/seg en un minuto en el modo de aceleración. Este test nos permite evaluar la coordinación motora de los animales.



Figura 10. Dispositivo del *Rota-rod*.

El rota-rod se lleva a cabo en dos fases: entrenamiento y test.

1. Entrenamiento: antes de realizar el test se debe entrenar a los animales hasta que se mantengan un cierto tiempo sin caerse de la rueda. Esto se lleva a cabo con el modo de mantenimiento, en el cual la rueda tiene una velocidad constante de 4 cm/seg.
2. Test: se sitúa al animal en la rueda con la velocidad de mantenimiento y cuando se estabiliza se cambia al modo de aceleración. Cada rata repite la prueba 5 veces, dejando varios

minutos entre cada test para que puedan recuperarse. En cada repetición se anota el tiempo en que se mantienen en la rueda, así como la velocidad que alcanzan. El resultado final se obtiene realizando la media aritmética de todos los datos.

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha utilizado el software *GraphPad Prism 5* para realizar los análisis estadísticos one-way análisis de la varianza (ANOVA) y medidas repetidas ANOVA, así como las gráficas correspondientes. Se ha considerado estadísticamente significativo un nivel mínimo de probabilidad inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) y los resultados se han expresado como media  $\pm$  error estándar.

# RESULTADOS

## 1. MEMORIA ESPACIAL

Para analizar la memoria espacial se han utilizado dos test diferentes: *Radial maze* y *Barnes maze*.

En el laberinto radial se tienen en cuenta dos parámetros para analizar los resultados: el tiempo necesario para completar el laberinto (máximo 20 minutos) y los errores realizados (brazos sin visitar o reentradas a brazos ya visitados).

El tiempo total se representa en la figura 11, en la cual se observa como el grupo control aumenta progresivamente el tiempo necesario para finalizar el test, un 14,57% más a los 28 días respecto al inicio del tratamiento. En cambio, en las ratas tratadas con antioxidantes no se observa este empeoramiento, sino que el tiempo total va disminuyendo a lo largo del estudio, un 15,69% menos en el caso de la (+)-catechin y un 10,61% menos en los animales tratados con poliphenon60. Sin embargo, estas tendencias no son significativas al aplicar un ANOVA de medidas repetidas (Control:  $F_{(2,15)} = 1,16$ ;  $p = 0,3537$ . (+)-catechin:  $F_{(2,15)} = 1,50$ ;  $p = 0,2703$ . Poliphenon60:  $F_{(2,18)} = 3,55$ ;  $p = 0,0617$ ).

Por otro lado, comparando los animales tratados con los controles al final del tratamiento mediante un ANOVA, los tratados con (+)-catechin tardan un 29,61% menos y los tratados con poliphenon60 un 18,55% menos. Sin embargo, estas diferencias no son significativas ( $F_{(2,16)} = 1,89$ ;  $p = 0,1839$ ).

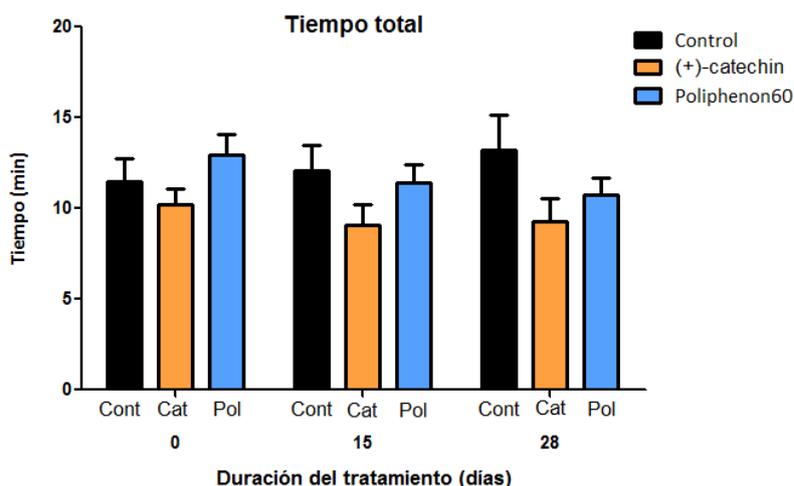


Figura 11. Tiempo total necesario para completar la prueba del *Radial maze* de los animales tratados con antioxidantes ((+)-catechin y poliphenon60) respecto a los animales control a los 0, 15 y 28 días.

Teniendo en cuenta el número de errores (figura 12), se observa como los errores cometidos por el grupo control no varían significativamente a lo largo del estudio ( $F_{(2,15)} = 0,114$ ;  $p = 0,8934$ ). Sin embargo, al realizar un ANOVA de medidas repetidas se observan diferencias significativas en los

animales tratados con antioxidantes respecto a ellos mismos al inicio del estudio. El grupo tratado con (+)-catechin presenta un 22,24% menos de errores totales en el test a los 28 días ( $F_{(2,15)} = 5,25$ ;  $p = 0,0276$ ), mientras que en el grupo poliphenon60 se observa una disminución significativa de un 22,22% ( $F_{(2,18)} = 11,5$ ;  $p = 0,0016$ ). Al aplicar un ANOVA seguido del test de Bonferroni, se observa ya una disminución en el número de errores a los 15 días en el grupo poliphenon60 ( $p < 0,01$ ).

Por otro lado, al aplicar un ANOVA de una vía, a los 15 días ya se observa una disminución de los errores de un 23,88% con (+)-catechin y 22,51% con poliphenon60 respecto al grupo control, siendo esta diferencia significativa ( $F_{(2,16)} = 3,75$ ;  $p = 0,0461$ ). A los 28 días esta diferencia respecto al grupo control se acentúa porque éste empeora; de manera que al final del estudio las ratas con (+)-catechin realizan un 24,65% menos de errores respecto a las controles y las ratas con poliphenon60 realizan un 22,62% menos de errores respecto a las controles ( $F_{(2,16)} = 7,61$ ;  $p = 0,0052$ ).

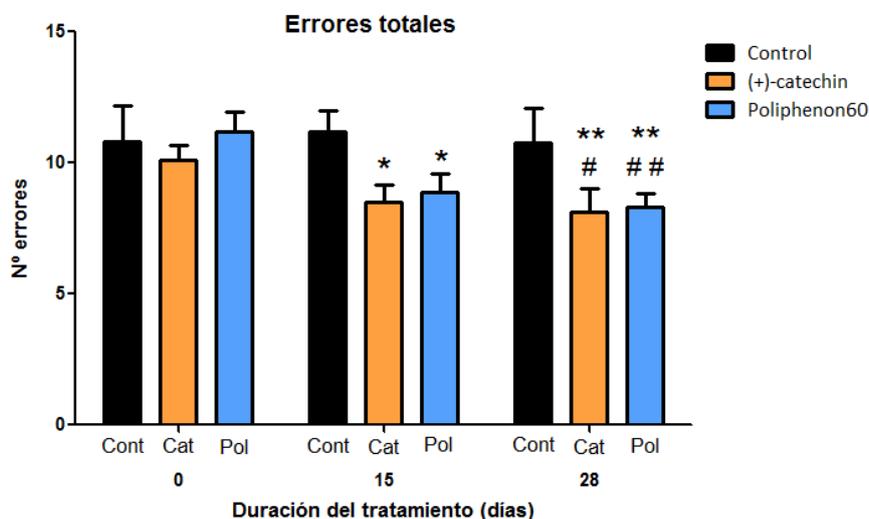


Figura 12. Errores totales cometidos durante la prueba del *Radial maze* de los animales tratados con antioxidantes ((+)-catechin y poliphenon60) respecto a los animales control a los 0, 15 y 28 días. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  comparado con su respectivo control mediante ANOVA de 1 vía. #  $p < 0,05$  y ##  $p < 0,01$  comparado consigo mismo al inicio del tratamiento (0 días) por Bonferroni.

El *Barnes maze*, además de analizar la memoria de trabajo espacial, sirve para estudiar la capacidad de aprendizaje del animal a través de los entrenamientos previos a la prueba. Se tienen en cuenta dos parámetros para analizar los resultados: el tiempo que tarda el animal en llegar al *target* o agujero de escape (latencia total) y el número de errores cometidos antes de encontrar el *target*.

En la figura 13 se presentan los resultados de la latencia total. Todos los grupos de animales mejoran a lo largo de los entrenamientos disminuyendo el tiempo que tardan en encontrar el *target* (el grupo control disminuye en un 57,14%, un 62,65% con (+)-catechin y un 48,82% con poliphenon60). Sin embargo, ya en el primer entrenamiento se observa que los grupos tratados con antioxidantes tardan menos en encontrar el *target* respecto al control y, aplicando un ANOVA de una vía, se obtienen diferencias significativas ( $F_{(2,16)} = 16,3$ ;  $p = 0,0001$ ). Los animales tratados con (+)-catechin tardan un 71,82% menos en encontrar el *target* ( $p < 0,001$ ) y los animales tratados con poliphenon60 un 50,77% menos ( $p < 0,01$ ) en la fase test respecto al control.

Por otro lado, con un ANOVA de dos vías para la latencia mostrada en esta prueba se detectan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ( $F_{(2,x)} = 21,8$ ;  $p < 0,0001$ ) y entre las repeticiones (3 entrenos y test) ( $F = 4,87$ ;  $p = 0,0045$ ); pero no para la interacción entre el tratamiento y las repeticiones ( $F = 0,87$ ;  $p = 0,5226$ ). Esto parece indicar que la disminución del tiempo de latencia depende del tratamiento y del aprendizaje. Si bien en todos los casos los animales disminuyen la latencia con las repeticiones, los animales tratados con antioxidantes ya desde el primer entrenamiento tardan menos en encontrar el *target*.

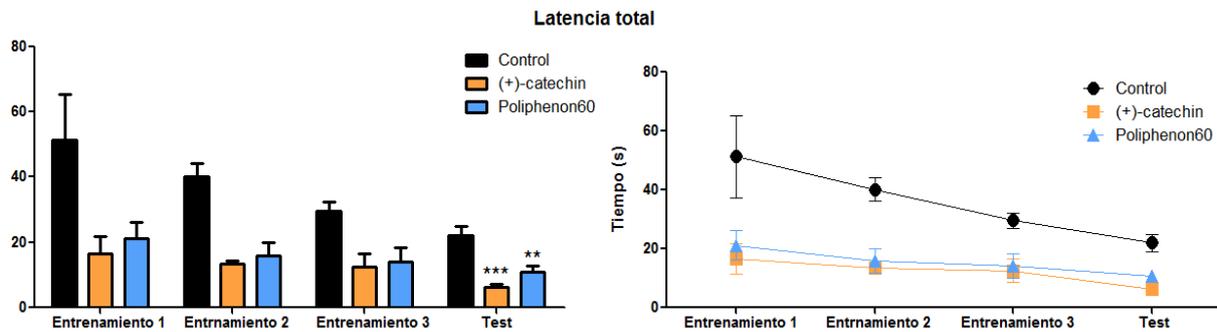


Figura 13. Tiempo necesario para llegar al *target* (latencia total) en el test del *Barnes maze* de los animales tratados con antioxidantes ((+)-catechin y poliphenon60) respecto a los animales control a los 28 días. \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,0001$  respecto a su control analizado mediante ANOVA de una vía.

Los errores cometidos por los animales estudiados en el *Barnes maze* (figura 14) no presentan una disminución progresiva como en el caso de la latencia total. Sin embargo, comparando el primer entrenamiento con la fase test sí se observa una disminución de un 80% en el número de errores en el caso de los animales tratados con (+)-catechin y un 50% en los animales tratados con poliphenon60; mientras que en el grupo control la diferencia es solo del 15,79%. Al aplicar un ANOVA de una vía, al igual que con la latencia total, ya en el primer entrenamiento los animales tratados con antioxidantes cometen significativamente menos errores en comparación con los controles ( $F_{(2,16)} = 10,6$ ;  $p = 0,0012$ ). Los animales tratados con (+)-catechin cometen un 92,51% menos de errores ( $p < 0,01$ ) y los animales tratados con poliphenon60 un 68,91% menos ( $p < 0,05$ ) en la fase test respecto a los controles.

Por otro lado, un ANOVA de dos vías para los errores cometidos antes de encontrar el *target* en esta prueba muestra diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ( $F = 18,9$ ;  $p < 0,0001$ ); pero no entre las repeticiones ( $F = 2,35$ ;  $p = 0,082$ ) ni para la interacción entre el tratamiento y las repeticiones ( $F = 0,245$ ;  $p = 0,9592$ ). Esto parece indicar que la disminución en el número de errores depende del tratamiento y no del aprendizaje, ya que los grupos tratados con antioxidantes parecen aprender de manera más rápida (con menos entrenamientos).

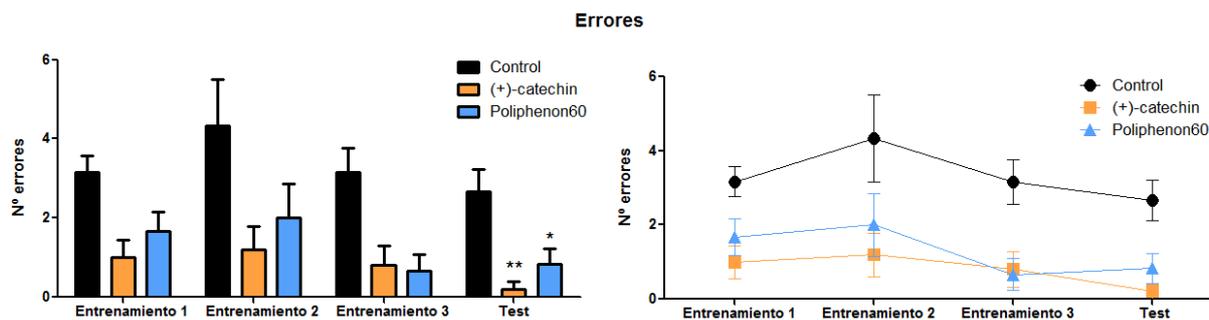


Figura 14. Errores cometidos para encontrar el *target* en el test del *Barnes maze* de los animales tratados con antioxidantes ((+)-catechin y poliphenon60) respecto a los animales control a los 28 días. \*  $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respecto a su control analizado mediante un ANOVA de una vía.

Finalmente, un último parámetro cualitativo a analizar de los resultados del *Barnes maze* es la estrategia utilizada para completar la prueba (figura 15). En el grupo control la estrategia dominante es la mixta y la seriada aparece como minoritaria durante los entrenamientos. En la fase de test domina la estrategia seriada (66,67%) frente a la mixta y no aparece la estrategia directa.

En cambio, con los grupos tratados con antioxidantes aparece la estrategia directa ya en los entrenamientos, de manera que los animales parecen aprender de manera más eficiente la localización del *target*. En los animales tratados con (+)-catechin la estrategia mixta desaparece progresivamente en los entrenamientos hasta que finalmente no la utilizan en la fase test; en la cual predomina la directa (80%). En el grupo poliphenon60 se observa que en el último entrenamiento desaparece la estrategia mixta y predomina la directa (66,67%). En la fase test vuelve a aparecer la estrategia mixta (16,66%) y disminuye la directa (50%), posiblemente debido a la habituación de las ratas al dispositivo del Barnes.

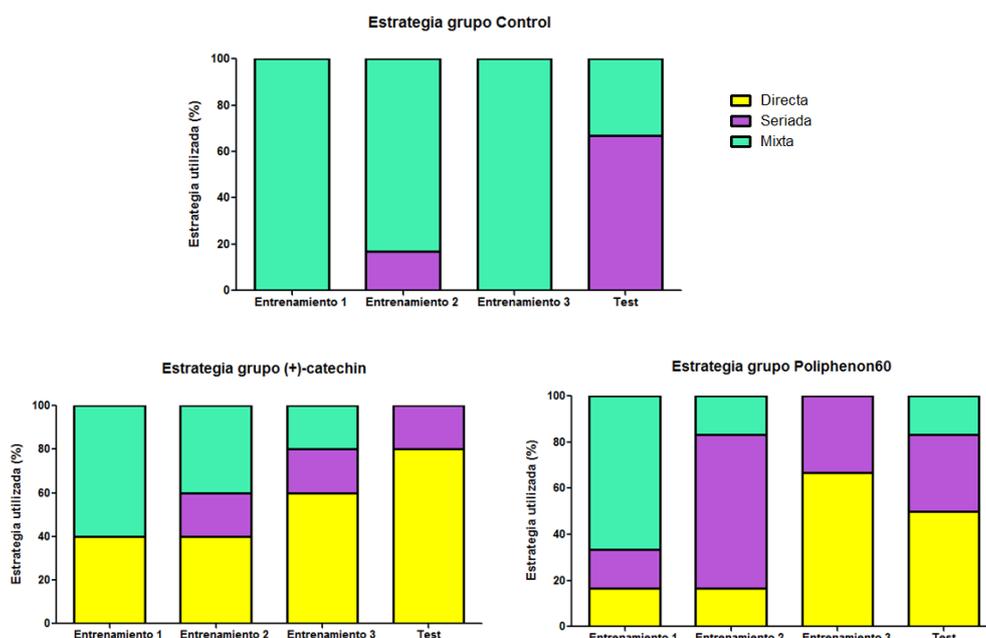


Figura 15. Estrategia utilizada (en %) en los grupos tratados con antioxidantes ((+)-catechin y poliphenon60) [abajo] y en el grupo control [arriba] para la realización del *Barnes maze* a los 28 días del inicio del tratamiento.

## 2. MEMORIA DE TRABAJO NO ESPACIAL

Para analizar los efectos del tratamiento con antioxidantes en la memoria de trabajo no espacial se ha utilizado el test del reconocimiento de objetos. El parámetro analizado para nuestro estudio es el tiempo de exploración de cada objeto presente en el campo abierto (nuevo y familiar) para poder conocer si existen diferencias en los patrones de exploración entre el grupo control y los grupos tratados con (+)-catechin y poliphenon60.

En todos los casos (tiempo y tratamiento) se observa claramente un mayor tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al objeto familiar (figura 16). Al inicio del tratamiento esta diferencia es prácticamente igual en los animales controles y los animales tratados con antioxidantes. Con el transcurso del estudio se va acentuando la diferencia de tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al familiar en los grupos con antioxidantes ((+)-catechin: 81,25% más a los 0 días y 91,30% más a los 28 días; poliphenon60: 89,47% más a los 0 días y 95,65% más a los 28 días). Sin embargo, en el grupo control este parámetro disminuye (94,64% más a los 0 días y 52,29% más a los 28 días).

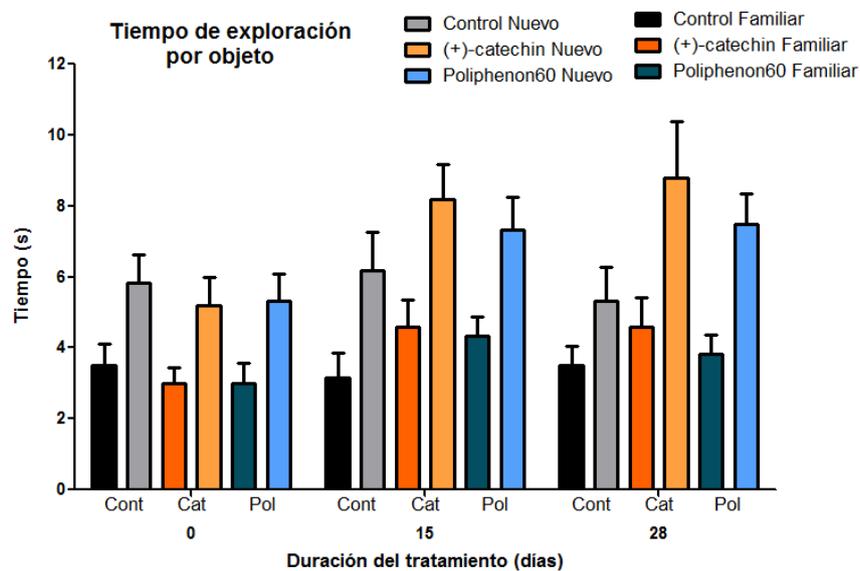


Figura 16. Tiempo de exploración dedicado al objeto nuevo (color más claro) y al objeto familiar (color más oscuro) en la prueba del Reconocimiento de objetos.

En la figura 17 se representan los resultados correspondientes al tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al objeto familiar, es decir, el tiempo neto que los animales han explorado de más el objeto nuevo respecto al familiar. En los animales control este parámetro aumenta ligeramente a los 15 días (28,57%) respecto al inicio, pero a los 28 días se observa una disminución del 21,32% respecto a los 0 días. Sin embargo, estas diferencias no son significativas ( $F_{(2,15)} = 1,07$ ;  $p = 0,3794$ ). Al aplicar un ANOVA de medidas repetidas se observa un aumento significativo del tiempo de exploración del objeto nuevo en los animales tratados con antioxidantes a lo largo del estudio ( $F_{(2,15)} = 6,27$ ;  $p = 0,0172$  para (+)-catechin y  $F_{(2,18)} = 4,22$ ;  $p = 0,0410$  para poliphenon60). En concreto, al aplicar un ANOVA seguido del test de Bonferroni, se observa que a los 28 días respecto a sí mismos al inicio (0 días) los animales con (+)-catechin han mejorado en un 93,85% y los animales tratados con

polipheon60 en un 50,98%; siendo estas diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). En la figura 18 se pueden observar más claramente estas variaciones analizadas mediante el ANOVA de medidas repetidas, ya que se representa la evolución a lo largo del estudio (de 0 a 28 días) de este parámetro en cada tratamiento individualmente.

Por otro lado, aplicando un ANOVA de una vía se observan diferencias significativas entre los grupos tratados con antioxidantes y el grupo control a los 28 días ( $F_{(2,16)} = 4,53$ ;  $p = 0,0276$ ). Los animales con (+)-catechin mejoran su tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al grupo control significativamente en un 129,09% y los animales con poliphenon60 en un 100%.

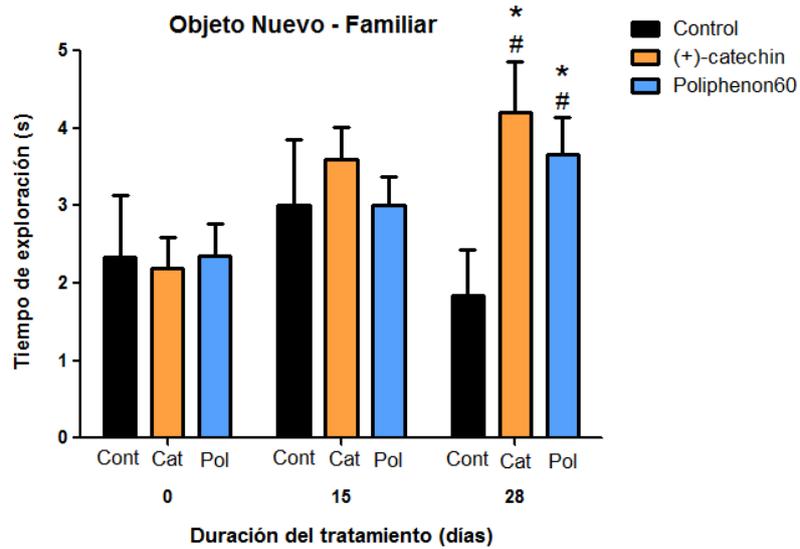


Figura 17. Parámetro objeto nuevo menos objeto familiar en el Reconocimiento de objetos. \*  $p < 0,05$  comparado con el control en el mismo momento mediante ANOVA de 1 vía. #  $p < 0,05$  comparado consigo mismo al inicio del tratamiento (0 días) por Bonferroni.

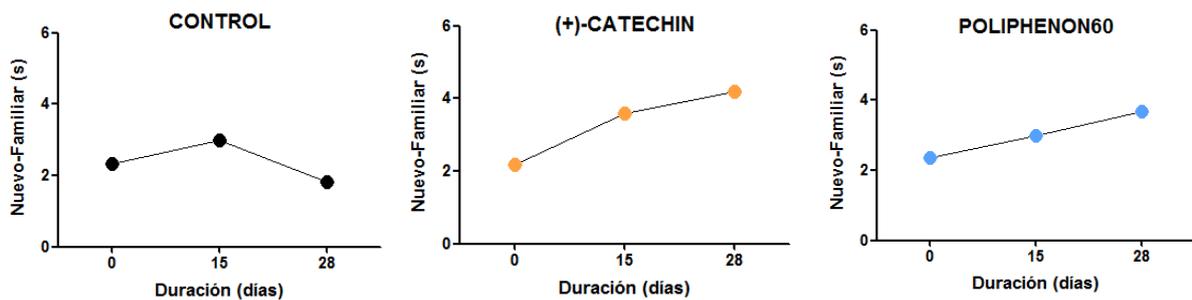


Figura 18. Evolución del parámetro objeto nuevo menos objeto familiar en el Reconocimiento de objetos de cada tratamiento por separado (control, (+)-catechin y poliphenon60). Se abarca todo el estudio, desde los 0 días a los 28 días.

### 3. ACTIVIDAD Y COORDINACIÓN MOTORA

Para analizar la actividad motora (figura 19) se ha utilizado el test del *Radial maze*, de manera que se considera la distancia recorrida en el dispositivo respecto al tiempo total (cm/s). En todos los casos se observa una disminución de la actividad motora de los diferentes grupos estudiados a los 28 días respecto a sí mismos al inicio, a los 0 días (16% grupo control, 8,40% grupo (+)-catechin y 22,30% grupo poliphenon60). Sin embargo, aplicando un ANOVA de medidas repetidas estas diferencias no son significativas.

Por otro lado, mediante un ANOVA de una vía no se han observado diferencias significativas entre los animales tratados con antioxidantes y los controles a lo largo del estudio ( $F_{(2,16)} = 0,674$ ;  $p = 0,5232$ ).

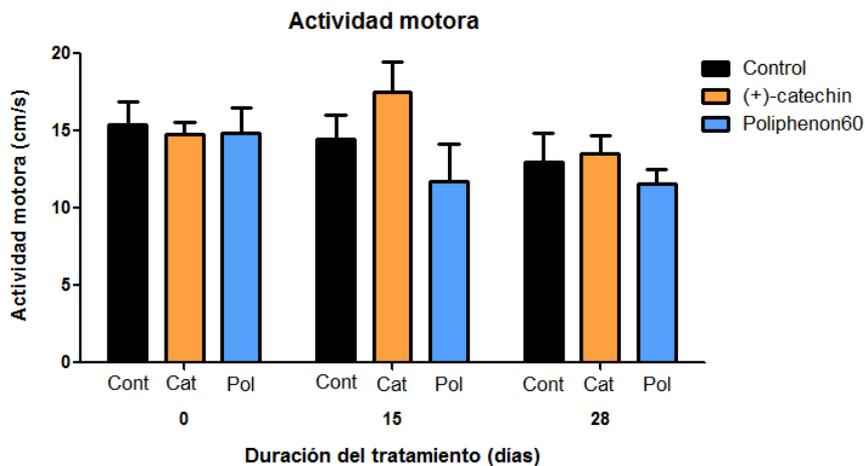


Figura 19. Actividad motora mostrada durante la prueba del *Radial maze* de los animales tratados con antioxidantes ((+)-catechin y poliphenon60) respecto a los animales control a los 0, 15 y 28 días.

Para estudiar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la coordinación motora se ha realizado el test del *Rota-Rod*, cuyos resultados se presentan en la gráfica 20. Se analiza el tiempo que los animales permanecen encima de la rueda sin caerse. Al aplicar un ANOVA de medidas repetidas no se detectan cambios significativos en el tiempo de permanencia de los animales control a lo largo del estudio ( $F_{(2,15)} = 1,02$ ;  $p = 0,3947$ ). Sin embargo, en los animales tratados con (+)-catechin ( $F_{(2,15)} = 6,53$ ;  $p = 0,0153$ ) y poliphenon60 ( $F_{(2,18)} = 6,20$ ;  $p = 0,0142$ ) sí se observan diferencias significativas respecto al inicio del tratamiento. En concreto, al aplicar una ANOVA seguida del test de Bonferroni, se observa un aumento del tiempo de permanencia en el dispositivo en los animales tratados con antioxidantes (con (+)-catechin 17,29% más y con poliphenon60 26,29% más) a los 28 días respecto al inicio ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, el grupo tratado con (+)-catechin permanece un 4,76% de tiempo más en el aparato que los animales controles al final del tratamiento (28 días), y el grupo tratado con poliphenon60 un 8,16% más que el grupo control. Mediante un ANOVA de una vía estas diferencias no son significativas ( $F_{(2,16)} = 0,170$ ;  $p = 0,8453$ ).

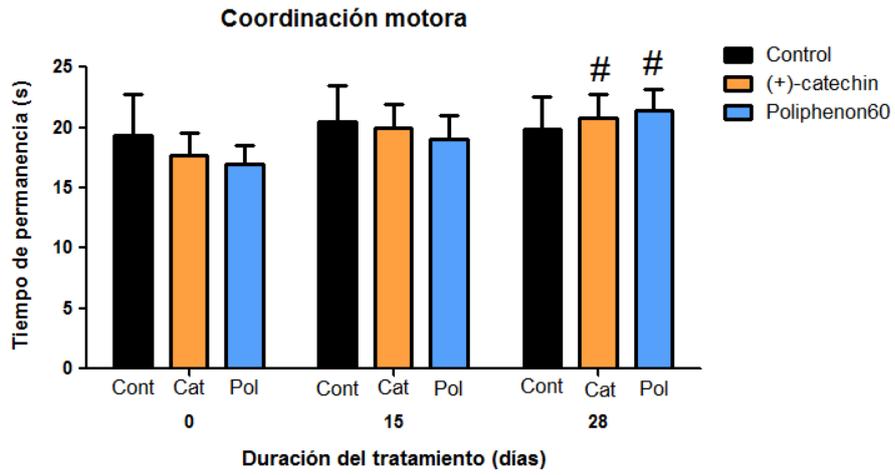


Figura 20. Tiempo de permanencia en la ejecución del test del *Rota-Rod* de los animales tratados con antioxidantes ((+)-catechin y poliphenon60) respecto a los animales control a los 0, 15 y 28 días. #  $p < 0,05$  comparado consigo mismo al inicio del tratamiento (0 días) por Bonferroni.

# DISCUSIÓN

---

## 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON (+)-CATECHIN Y POLIPHENON60 EN LA MEMORIA ESPACIAL

Para estudiar la memoria de trabajo espacial se ha utilizado el test del *Radial maze*, en el cual se tiene en cuenta el tiempo que tarda el animal en finalizar el laberinto (con un máximo de 20 minutos) y los errores cometidos (brazos sin visitar o reentradas en brazos ya visitados).

A pesar de no haber obtenido resultados significativos respecto al tiempo que han tardado los animales en finalizar la prueba, se observa una cierta tendencia de los grupos tratados con antioxidantes en la disminución del mismo. Por otro lado, el grupo control tiende a aumentar el tiempo necesario a lo largo del estudio (tarda un 14,57% más a los 28 días). Con estos datos podemos comprobar el deterioro natural debido al envejecimiento en ratas adultas, como demuestra Gage *et al.* (1984) en su estudio analizando el comportamiento de ratas jóvenes y adultas con diversos tests comportamentales, como el *Morris water maze*.

Por otro lado, sí se ha observado una clara diferencia en el número de errores cometidos comparando los diferentes grupos estudiados a lo largo de la experimentación (ANOVA de una vía). A los 28 días los grupos tratados con antioxidantes muestran un número menor de errores respecto al grupo control (23,88% con (+)-catechin y 22,51% con poliphenon60), el cual no varía significativamente a lo largo del estudio. Estos resultados coinciden con los de Haque *et al.* (2006) en el *Radial maze* con ratas jóvenes. En este estudio muestran que el tratamiento prolongado con catequinas del té verde mejora la memoria de trabajo espacial y disminuye la concentración de oxidantes en plasma, así como ROS en el hipocampo. Estos datos sugieren que la mejora en la memoria de trabajo espacial se debe a la actividad antioxidante de las catequinas del té verde.

Para respaldar los resultados de la memoria espacial y estudiar la capacidad de aprendizaje a base de entrenamiento se ha utilizado el test del *Barnes maze* al final del tratamiento (28 días), teniendo en cuenta la latencia total (el tiempo que tarda el animal en encontrar el *target* o agujero de escape) y los errores cometidos antes de encontrar el *target*.

Todos los grupos comparten la misma tendencia: disminuir la latencia total y los errores con los entrenamientos. Sin embargo, los animales tratados con antioxidantes ya desde el primer entrenamiento muestran unos mejores resultados que el grupo control y en la fase test se acentúa esta diferencia ((+)-catechin: 71,82% menos de latencia total y 80% menos de errores; poliphenon60: 50,77% menos de latencia total y 68,91% menos de errores) (ANOVA de una vía).

Si bien en todos los casos los animales disminuyen la latencia y los errores con las repeticiones, los animales tratados con antioxidantes ya desde el primer entrenamiento tardan menos en encontrar el *target* y cometen menos errores. Esto indica una mejora en las capacidades cognitivas de estos animales, tal y como se esperaba con el tratamiento con (+)-catechin y poliphenon60. En concreto, los grupos tratados con antioxidantes parecen recordar mejor que los controles la localización del *target* ya desde el primer entrenamiento, que se realizó un día después de la fase de familiarización.

En esta prueba también se ha tenido en cuenta un parámetro cualitativo: la estrategia elegida para encontrar el *target* (mixta, seriada o directa). En el grupo control la estrategia predominante ha sido la seriada en la fase test (66,67%) y la directa no ha aparecido en ningún momento. En cambio, los grupos tratados con antioxidantes muestran una mejora en la elección de la estrategia con los entrenamientos, desapareciendo la estrategia mixta en la fase test de (+)-catechin (80% estrategia directa) y en el tercer entrenamiento de poliphenon60 (66,67% estrategia directa). Esto indica que el tratamiento crónico ha provocado una mejora en la capacidad de aprendizaje de estos animales, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Unno *et al.* (2008) con ratones adultos. Con este estudio se observa un incremento significativo en la capacidad de aprendizaje en los ratones que han ingerido catequinas del té verde desde los 6 a los 12 meses, comparándolo con ratones control de la misma edad que no han ingerido estos compuestos.

## 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON (+)-CATECHIN Y POLIPHENON60 EN LA MEMORIA DE TRABAJO NO ESPACIAL

Para analizar los efectos del tratamiento con antioxidantes en la memoria de trabajo no espacial se ha utilizado el test del Reconocimiento de objetos. Se ha analizado el tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al objeto familiar en el campo abierto.

A pesar de que al principio del estudio (0 días) todos los grupos exploran más el objeto nuevo, la tendencia general muestra de forma significativa una diferencia entre grupos en la exploración del objeto nuevo provocado por el tratamiento; de manera que los grupos tratados con (+)-catechin y poliphenon60 exploran significativamente durante más tiempo el objeto nuevo (ANOVA de una vía). Por otro lado, en el grupo control se observa un cierto empeoramiento en el tiempo de exploración del objeto nuevo respecto al familiar al final del estudio (28 días) comparándolo consigo mismo al inicio (0 días), a pesar de no ser significativo.

Por lo tanto, el tratamiento crónico ha mejorado la capacidad exploratoria y cognitiva de las ratas tratadas. Es importante destacar que la exploración de los objetos nuevos constituye un modelo de estudio de la memoria episódica en humanos.

## 3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON (+)-CATECHIN Y POLIPHENON60 EN LA ACTIVIDAD Y COORDINACIÓN MOTORA

Además de la memoria de trabajo espacial, el test del *Radial* maze nos permite analizar la actividad motora de los animales. Para ello se ha tenido en cuenta la distancia recorrida respecto al tiempo total (cm/s).

Hay una cierta tendencia a la disminución en la actividad motora en todos los grupos a medida que pasa el tiempo, reflejando así el declive normal de las funciones motoras asociado a la edad (Kluger *et al.*, 1997). A pesar de esta tendencia, no se han detectado diferencias significativas a lo largo del estudio entre los grupos tratados con antioxidantes y el grupo control. Esto indica que el tratamiento con antioxidantes no ha creado hiperactividad en los animales y los resultados obtenidos

en los test comentados anteriormente se deben claramente a una mejora en la memoria y la capacidad de aprendizaje.

Por otro lado, con el test del Rota-rod hemos medido la coordinación motora, la cual se consigue con un proceso de aprendizaje. Se analiza el tiempo que los animales permanecen en la rueda con el modo de aceleración.

Ha habido cierta mejoría significativa en los grupos tratados con antioxidantes respecto a ellos mismos al inicio del estudio (ANOVA de medidas repetidas). Los animales tratados con (+)-catechin permanecen un 17,29% más de tiempo en la rueda y los tratados con poliphenon60 un 26,29% más.

Es importante destacar que el hecho de permanecer más tiempo en la rueda también implica soportar una velocidad superior, puesto que el aparato está en modo de aceleración, por lo que los resultados son aún más concluyentes. Por lo tanto, se podría decir que el tratamiento crónico con antioxidantes ha provocado un retraso en el declive de la coordinación motora asociado al proceso normal de envejecimiento, de acuerdo con otros estudios en este campo como el de Pitozzi *et al.* (2012). Esta reciente investigación ha analizado el efecto de los polifenoles del aceite de oliva virgen extra en la coordinación motora y se ha comprobado que su ingesta previene la disfunción en la coordinación motora relacionada con la edad. Se ha visto que este efecto motor está relacionado con la reducción de la peroxidación lipídica en el cerebelo.

#### 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS POLIFENOLES ESTUDIADOS

Dado que los polifenoles presentan numerosas propiedades, analizando únicamente el comportamiento no podemos afirmar que los fármacos utilizados estén activando directamente vías antioxidativas. Sin embargo, estos resultados se correlacionan con otros estudios ya realizados con marcadores de estrés oxidativo. Por ejemplo, se ha observado una disminución en los niveles de 8-oxodeoxyguanosina (8-oxodG), un marcador del daño oxidativo en el ADN, con el consumo de catequinas del té verde a largo plazo. En concreto, se ha visto un efecto preventivo en el ADN oxidado en el rinencéfalo, un área particularmente susceptible a la atrofia (Unno *et al.*, 2004). Otro ejemplo para reforzar esta teoría puede ser el estudio de Rodrigues *et al.* (2013), en el cual concluyen que el extracto de té verde contribuye a mejorar el estado redox (protege las proteínas y lípidos contra la oxidación) en regiones como la formación hipocampal, y previene el daño estructural asociado a la edad observado en animales viejos, con repercusiones en el comportamiento analizado a través del *Morris water maze*.

El efecto beneficioso de los polifenoles sobre el daño en el hipocampo es importante porque esta región es una de las que se ven más afectadas con el envejecimiento. Con la edad, el hipocampo pierde la capacidad de generar neuronas (neurogénesis) y esta situación viene acompañada del característico declive cognitivo asociado a la edad (Casadesus *et al.*, 2004). Por ello, en el presente trabajo de investigación con polifenoles se han utilizado ratas de 18 meses ya que a esta edad se inicia el deterioro de regiones cerebrales implicadas en los procesos de memoria, como es el caso del hipocampo (Azcoitia *et al.*, 2005).

# CONCLUSIONES

---

Los estudios con humanos realizados en el envejecimiento cerebral son escasos y es difícil extraer conclusiones debido a la gran cantidad de factores que intervienen; como la edad, el sexo, la raza, la educación, la dieta o el estatus genético. Sin embargo, el presente trabajo se ha realizado con animales y nos permite tener controlados todos estos factores. De manera que, con los resultados obtenidos administrando (+)-catechin y poliphenon60 crónicamente vía intraperitoneal a ratas viejas, podemos concluir que:

1. Estos compuestos mejoran las capacidades cognitivas y la coordinación motora de ratas viejas medidas a través de diversas pruebas comportamentales, frenando o retrasando los efectos negativos asociados a la edad.
2. Dado que en las pruebas cognitivas realizadas interviene fundamentalmente el hipocampo, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una correlación con resultados de otros investigadores que han puesto de manifiesto que el extracto de té verde protege a la formación hipocampal frente a la oxidación asociada a la edad.

Finalmente, el reciente incremento en el conocimiento acerca del funcionamiento de los polifenoles ha empezado a proporcionar una base para considerar su uso en el desarrollo de nuevas terapias para ciertas enfermedades humanas, en particular se podría reducir la incidencia de algunos efectos neurodegenerativos asociados al envejecimiento. Y mientras todavía no se entienden completamente los mecanismos por los cuales se dan estos efectos, es evidente que continuar estas líneas de investigación podría dar lugar a un futuro uso de los polifenoles como suplemento farmacológico frente a enfermedades asociadas a la edad.

# AGRADECIMIENTOS

---

A la Dra. Susana Esteban Valdés por su ayuda siempre que la he necesitado. A Margarita Ramis y Fiorella Sarubbo por su gran colaboración durante todo el proceso del trabajo.

## REFERENCIAS

---

Azcoitia I, Pérez-Martín M, Salazar V, Castillo C, *et al.* (2005). Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus. *Neurobiology of Aging*. **26**: 697-703.

Bishop NA, Lu T, Yankner BA (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. **464**, 529 – 535.

Casadesus G, Shukitt-Hale B, Stellwagen HM (2004). Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats. *Nutricional Neuroscience*. **7**: 309-316.

Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, *et al.* (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*. **52**, 794-804.

Floyd RA, Hensley K (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapies of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*. **23**: 795-807.

Gage FH, Dunnett SB, Björklund A (1984). Spatial learning and motor deficits in aged rats. *Neurobiology of Aging*. **5**: 43-48.

Gramza A, Korczak J, Amarowicz R (2005). Tea polyphenols – their antioxidant properties and biological activity. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. **14**, 219-235.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2010). Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **393**, 561 – 564.

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

Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, *et al.* (2006). Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *American Society for Nutrition*. **136**: 1043-1047.

Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA (2003). Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of Neurology*. **60**, 1119–1122.

Kitani K, Yokozawa T, Osawa T (2004). Interventions in aging and age-associated pathologies by means of nutritional approaches. *Annals of the New York Academy Sciences*. **1019**, 424-426.

- Kluger A, Gianutsos JG, Golomb J, Ferris SH, *et al.* (1997). Patterns of motor impairment in normal aging, mild cognitive decline, and early Alzheimer' disease. *The Journals of Gerontology B*. **52**: 28-39.
- Lee J, Koo N, Min DB (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **3**, 21-33.
- Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research*. **509**, 127 – 151.
- Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography B*. **827**: 65-75.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. **17**, 271-278.
- Pitozzi V, Jacomelli M, Catelan D, Servili M, *et al.* (2012). Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: role of oxidative stress. *Rejuvenation Research*. **15**, 601-612.
- Queen BL, Tollefsbol TO (2010). Polyphenols and aging. *Current Aging Science*. **3**: 34-42
- Richter C, Park JW, Ames B (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **85**, 6465 – 6467.
- Rodrigues J, Assunção M, Lukoyanov N, Cardoso A, *et al.* (2013). Protective effects of a catechin-rich extract on the hippocampal formation and spatial memory in aging rats. *Behavioural Brain Research*. **246**: 94-102.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **81**, 215-217.
- Socci DJ, Crandall BM, Arendash GW (1995). Chronic antioxidant treatment improves the cognitive performance of aged rats. *Brain Research*. **693**, 88 – 94.
- Truchado E, Abellán A, Díaz R (2012). Las personas mayores en España; Datos estadísticos estatales y por Comunidades Autónomas. *Informe 2010*, Tomo I.
- Unno K, Ishikawa Y, Takabayashi F, Sasaki T, Takamori N, Iguchi K, Hoshino M (2008). Daily ingestión of green tea catechins from adulthood suppressed brain dysfunction in aged mice. *Biofactors*. **34**: 263-271.
- Unno K, Takabayashi F, Kishido T, Oku N (2004). Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). *Experimental Gerontology*. **39**, 1027-1034.
- Viña J, Borrás C, Miquel J (2007). Theories of ageing. *Life*. **59**, 249 – 254.
- Zaveri NT (2006). Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences*. **78**, 2073-2080.