



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estudi de l'efecte de l' α -tocoferol en el declivi de la neurotransmissió dopaminèrgica, noradrenèrgica i serotoninèrgica que ocorre durant l'envelliment

Maria Antònia Ribot Riera

Grau de biologia

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 41572516Q

Treball tutelat per David Moranta Mesquida
Departament de Biologia



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

Paraules clau del treball:

α -tocoferol, envelliment, estrès oxidatiu, activitat antioxidant, dopamina, noradrenalina, serotonina, memòria de treball, tirosina hidroxilasa, triptòfan hidroxilasa.

A sa padrineta Maria

ÍNDEX

1. Resum	4
2. Introducció	5
2.1. L'envelliment i els seus efectes sobre el cervell	5
2.1.1. Rellevància actual de l'envelliment	5
2.1.2. Descripció de l'envelliment a nivell cerebral.....	5
2.1.3. Efecte de l'envelliment sobre el sistema monoaminèrgic	5
2.2. Teories de l'envelliment	9
2.2.1. Teoria de l'estrès oxidatiu	10
2.3. Efecte protector dels antioxidants en les alteracions que ocorren durant l'envelliment	11
2.3.1. Antioxidants	11
2.3.2. Vitamina E	12
3. Hipòtesis y objectius	13
4. Material i mètodes	14
4.1. Animals d'experimentació	14
4.2. Fàrmac i productes utilitzats	14
4.3. Tractaments farmacològics	14
4.4. Determinació cromatogràfica de la l'activitat tirosina hidroxilasa i triptòfan hidroxilasa <i>in vivo</i>	14
4.4.1. Dissecció i preparació de mostres	14
4.4.2. Anàlisi cromatogràfic	16
4.5. Proves comportamentals	17
4.6. Anàlisi matemàtic	18
5. Resultats	19
5.1. Efecte de l'envelliment sobre el sistema monoaminèrgic de l'estriat i hipocamp	19
5.2. Efecte del tractament amb α -tocoferol sobre la memòria de treball espacial en rates velles (<i>Radial maze</i>)	19
5.3. Efecte del tractament amb α -tocoferol sobre el sistema monoaminèrgic de l'estriat de rates velles	20
5.4. Efecte del tractament de l' α -tocoferol sobre el sistema monoaminèrgic de l'hipocamp de rates velles	22
6. Discussió	24
6.1. Efecte de l'envelliment sobre el sistema monoaminèrgic de l'hipocamp i estriat	24
6.2. Efecte del tractament amb α -tocoferol sobre la memòria de treball espacial en rates velles (<i>Radial maze</i>)	24
6.3. Efecte del tractament amb α -tocoferol sobre el sistema dopaminèrgic i serotoninèrgic de l'estriat	24
6.4. Efecte del tractament amb α -tocoferol sobre el sistema noradrenèrgic i serotoninèrgic de l'hipocamp	25
6.5. Correlació entre els resultats cognitius i bioquímics de rates sotmeses al tractament amb α -tocoferol	27
7. Conclusions	28
8. Bibliografia	29

1. RESUM

Uns dels problemes principals avui en dia als països desenvolupats són aquells derivats de l'augment de l'esperança de vida, com per exemple l'aparició de malalties neurodegeneratives associades al deteriorament cognitiu característic de l'envelliment. S'ha observat que alguns antioxidants presenten un efecte favorable millorant les habilitats cognitives durant l'envelliment i inclús, retardant el mateix procés d'envelliment. Un d'aquests antioxidants és l' α -tocoferol, una de les 8 isoformes de la vitamina E, considerat un dels més potents de la naturalesa. De fet, molts d'estudis mostren efectes prometedors de l'administració de vitamina E en la prevenció de diverses malalties, moltes d'elles relacionades amb l'envelliment. Un dels efectes que provoca l'administració d'antioxidants és, en general, l'augment de la quantitat de monoamines cerebrals, fet que contribueix a prevenir el deteriorament monoaminèrgic causat per l'envelliment, millorant conseqüentment les funcions cognitives en rates.

Així, el present estudi té com a objectiu principal estudiar l'esmentat efecte protector de l'administració d' α -tocoferol en el declivi dels sistemes monoaminèrgics i disminució de les funcions cognitives, característics del procés de l'envelliment. Per aconseguir-lo s'analitza el metabolisme de la 5-HT, DA i NA en hipocamp i estriat, ja que representen les principals regions on arriben els axons de les neurones que els sintetitzen. S'estudien aquestes monoamines ja que són els neurotransmissors vinculats per excel·lència amb la memòria i aprenentatge. El procediment utilitzat es basa en la quantificació de les monoamines susdites, els seus precursors i metabòlits després de la inhibició de l'enzim L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa mitjançant la tècnica HPLC. Els resultats bioquímics es comparen amb els comportamentals derivats de la prova del *Radial Maze*, que permet avaluar la memòria espacial i donar una idea de l'activitat motora.

Els resultats obtinguts corroboren la disminució de la síntesi de 5-HT, DA i NA paral·lela a l'envelliment, però a més, han revelat que el tractament amb α -tocoferol pot contrarestar aquest declivi ja que suposa un augment de l'activitat de la tirosina hidroxilasa i, en menor grau, de la triptòfan hidroxilasa, suggerint una millora principalment del sistema dopaminèrgic i noradrenèrgic. Aquest efecte concorda amb les proves cognitives, les quals, a partir de la reducció del temps en completar la prova i del nombre d'errors realitzats, evidencien una millora de la memòria de treball.

Així, aquest estudi confirma l'efecte protector del tocoferol sobre la pèrdua neuronal deguda a l'edat i suggereix la possibilitat d'utilitzar aquest compost com a teràpia per a frenar el declivi cognitiu característic del procés de l'envelliment o vinculat a malalties neurodegeneratives.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. L'envelliment i els efectes sobre el cervell

2.1.1. Rellevància actual de l'envelliment

El desenvolupament científic i tecnològic ha donat pas a un augment de la qualitat i longevitat de la vida en els països desenvolupats. Avui en dia, el grup de persones majors de 65 anys representen un percentatge elevat de la població, concretament, un 7.6% de la població mundial total i un 15.9% de la població de països desenvolupats, i es preveu que aquests percentatges augmentin a un 16.2% i 26.6%, respectivament, en uns 40 anys (Truchado et al., 2010). Aquest increment es veu reflectit en un grup més nombrós de gent major i conseqüentment una major incidència de malalties neurodegeneratives. El canvi que suposa a nivell estructural l'augment de l'esperança de vida té repercussions a nivell econòmic, sanitari i social, ja que pot suscitar una major inversió de béns públics en sanitat i atenció a persones majors (Truchado et al., 2012).

Per poder conèixer mètodes i teràpies que permetin posar fre a aquesta tendència neurodegenerativa és necessari conèixer millor els processos de l'envelliment cerebral, així com els declivis cognitius i motors associats tant de forma natural com patològica a l'envelliment (Bishop et al., 2010).

2.1.2. Descripció de l'envelliment a nivell cerebral

L'envelliment és un procés universal, complex, de naturalesa intrínseca i caràcter progressiu, multifactorial i amb efectes perjudicials, que suposa una progressiva pèrdua de funcionalitat i augment del risc de mort (Mandavilli et al., 2002; Viña et al., 2007; Strehler et al., 1959). L'envelliment s'acompanya de canvis estructurals i fisiològics en el cervell (Joseph et al., 2000; Bishop et al., 2010) que es poden manifestar en alteracions motores o cognitives. Entre les motores destaca la pèrdua de força muscular i coordinació, mentre que de les cognitives destaca la pèrdua d'eficiència en la retenció de nova informació, velocitat de processament, memòria de treball o memòria a llarg termini (Park and Reuter-Lorenz, 2009). Els canvis estructurals desencadenats per l'envelliment engloben la disminució del tamany de les àrees cerebrals i la pèrdua d'integritat de la substància blanca, i es troben acompanyats d'una disminució de l'activitat neuronal d'aquestes zones (Bishop et al., 2010). Per altra banda, els canvis fisiològics es caracteritzen per l'acumulació d'errors a diverses vies metabòliques, entre les quals es pot destacar una disminució de la homeòstasis del calci (Landfield i Eldrige, 1994), una pèrdua de sensibilitat de diversos sistemes de receptors (Josep et al, 2000), així com canvis en els sistemes de neurotransmissió monoaminèrgica del cervell (Esteban et al., 2010).

2.1.1 Efectes de l'envelliment sobre els sistemes monoaminèrgics

Durant l'envelliment es produeix el declivi d'un ventall de funcions fisiològiques humanes (Shock, 1957). Varis estudis han conclòs que durant l'envelliment de mamífers es donen alteracions en varis sistemes de neurotransmissió del cervell, associats a la reducció del nombre de neurones (Fearnly i Lees, 1991), així com de la síntesi i concentració de neurotransmissors (Meek et al., 1977; Sparks et al., 1985). No obstant això, existeixen controvèrsies de l'efecte de l'edat sobre els sistemes adrenèrgic, colinèrgic, dopaminèrgic i serotoninèrgic (Finch i Roth, 1999; Fisher et al., 1992; McEntee i Crook, 1991; Morgan i May, 1990; Pradham, 1980).

Les catecolamines són composts derivats del grup catecol (anell benzènic amb dos oxhidriils substituents), que presenten un grup amí a la cadena lateral i inclouen la DA, NA i adrenalina (Vera, 2005). La seva ruta de síntesi es pot observar a la figura 1 i es dona a partir de la hidroxilació de la tirosina (Malgor i Valsecia, 2000). Aquest aminoàcid s'obté directament de la dieta o també pot ser sintetitzat a partir de fenilalanina mitjançant una

hidroxilasa oxidasa, que introdueix un grup oxhidril en posició *para* de l'anell benzènic (Malgor et al., 2000). A partir de l'aminoàcid L-tirosina s'obté DOPA (hidroxifenilalanina) mitjançant l'acció de l'enzim tirosina-hidroxilasa, que introdueix un segon OH a l'anell benzènic de la tirosina (Malgor et al., 2000). Aquest és l'enzim limitant de totes les reaccions de síntesis de catecolamines (Nagatsu et al., 1964) i es localitza a la fracció citoplasmàtica soluble de la terminal axonal (Weiner et al., 1989). És inhibida pels seus productes finals: NA, DA i el metabòlit dihidroxifenilglicol (Malgor et al., 2000).

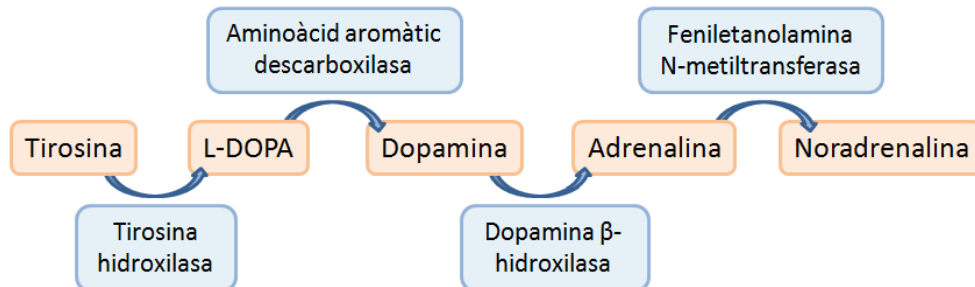


Fig 1. Representació esquemàtica dels principals components de la via de síntesis de la DA i NA

Dopamina

Es creia que la dopamina (DA) només era una intermediària de la síntesis d'adrenalina i NA, però als anys 60 es va identificar com a neurotransmissor (Molinoff et al, 1971) i el posterior descobriment de la intervenció d'aquest neurotransmissor en les malalties de Parkinson i esquizofrènia va suposar un ràpid augment en la seva investigació (Côte i Crutcher, 1991). La conversió de DOPA a DA es troba catalitzada per l'enzim DOPA-descarboxilasa, descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics levògirs poc específica. (Malgor et al., 2000).

S'han descrit tres sistemes dopaminèrgics principals en el cervell: el nigroestriat, que presenta els cossos cel·lulars localitzats en la substància negra mentre que els axons projecten cap al neostriat (nuclis caudat i putamen); el mesolímbic i mesocortical, que s'originen en l'àrea tegmental central del mesencèfal i envia els axons cap a estructures estriatals, límbiques i corticals; i el tuberoinfundibular (veure figura 2). També existeixen interneurons dopaminèrgiques al bulb olfatori, retina i hipotàlem. S'ha descrit que l'estriat conté un 80% de tota la DA cerebral (Weiner i Molinoff, 1989), per això es considera a la projecció mesoestriatal com la més important.

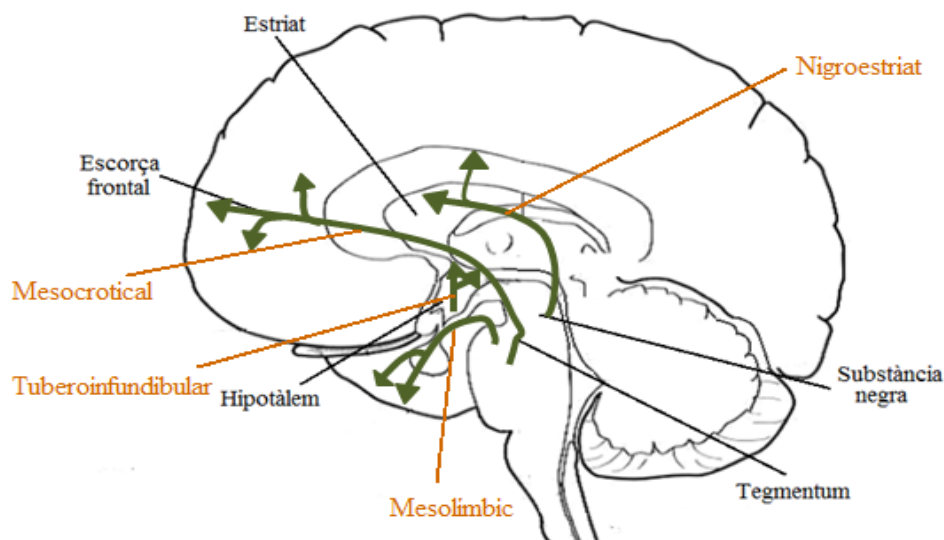


Fig 2. Principals sistemes dopaminèrgics en el cervell humà.

Un cop la DA ha estat alliberada a l'espai sinàptic, pot ser captada per dues famílies de receptors DA1 o DA2, (Malgor et al., 2000).

La degradació de les catecolamines és duta a terme mitjançant dos enzims: la monoaminoxidasa (MAO) i la catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Weiner i Molinoff, 1989). La MAO es troba principalment a la membrana externa dels mitocondris i dona lloc a metabòlits deaminats, ja que retira el grup amí de la NA, AD, DA, 5-HT mitjançant oxidació (Malgor et al., 2000). S'han descrit dues formes de MAO: MAO-A, que presenta major afinitat per la NA i 5-HT, i MAO-B, amb igual afinitat per la DA que la MAO-A. Per altra banda, el COMT és un enzim que es troba a nivell citoplasmàtic, preferentment a l'espai intersinàptic i la seva acció principal és la O-metilació de l'anell benzènic. La MAO, situada a l'interior de la terminal nerviosa, s'encarrega de convertir la DA recapturada en àcid dihidroxifenilacètic (DOPAC), el qual serà alliberat a l'exterior de la terminal per ser posteriorment transformat a àcid homovanílic (HVA) per COMT. La DA no recapturada per la terminal dopaminèrgica és metabolitzada a HVA per l'acció seqüencial dels enzims COMT i MAO (Feldman, 1997; Cooper, 1996; McGeer, 1987) (veure figura 3).

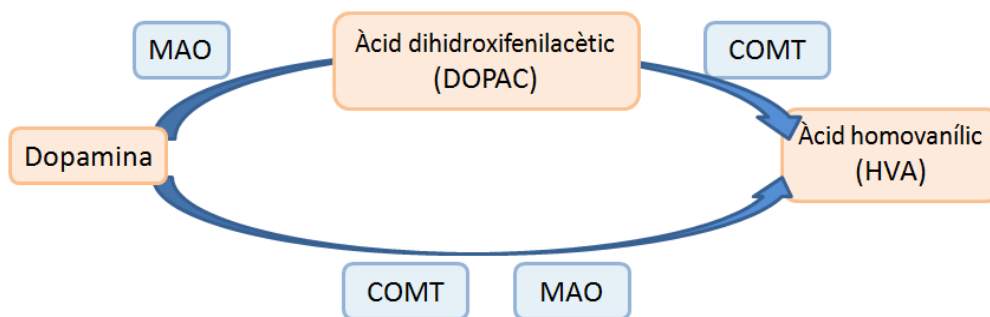


Fig 3. Representació dels principals components i enzims implicats en la degradació de la DA

La DA participa en una àmplia varietat de funcions, com activitat locomotora, afectivitat, regulació neuroendocrina i ingesta d'aigua i aliments (Fibiger, 1993; Jackson, 1994). També participa en funcions executives com la planificació, memòria temporal, atenció o flexibilitat mental (Cools et al., 2002).

Els resultats obtinguts quant a l'efecte de l'envelliment sobre la DA són contradictoris. Estudis centrats en aquesta temàtica han presentat una disminució de la concentració d'aquest neurotransmissor en putamen, nucli caudat, amígdala, hipocamp i hipotàlem (Joseph et al., 1988; Ponzio et al., 1982; Giorgi et al., 1987; Stoessl et al., 1989; Marshall i Rosenstein, 1990). No obstant, altres no han obtingut tal efecte (Ponzio et al., 1978; Rose et al., 1986; Godefroy et al., 1989). Recolzant la disminució de DA, s'ha detectat una disminució de l'activitat de la tirosina hidroxilasa en estriat de rates velles (Ponzio et al., 1982) i també la inhibició d'aquest enzim per oxidació (Borges et al., 2002). A més, estudis *postmortem* en humans també han revelat una disminució del nivell de síntesi de DA a l'estriat (Kish et al., 1992). Per altra part, alguns estudis defensen el declivi dels metabòlits de la DA en la regió nigroestriatal, mesocortical i hipocampal (Goudsmit et al., 1990). De fet, en micos d'avançada edat s'ha observat una disminució d'HVA en caudat i putamen, tot i que no s'han detectat diferències entre els diferents grups d'edat per a la relació HVA/DA (Collier et al., 2007).

S'ha suggerit que les alteracions de la neurotransmissió dopaminèrgica poden estar implicades en les alteracions motores i cognitives que s'observen en individus vells (Murray i Waddington, 1991). De fet, la tríada correlativa de Bäckman proposa que el dèficit de moltes funcions cognitives es troba associat amb el declivi de DA que ocorre durant l'envelliment (Bäckman et al., 2006).

Noradrenalina

La DA pot ser transformada a noradrenalina (NA) dins vesícules sinàptiques de determinades neurones mitjançant l'enzim DA- β -hidroxilasa (Malgor et al., 2000). Aquest neurotransmissor és sintetitzat en nuclis molt específics localitzats en el tronc cerebral, dels quals el *locus coeruleus* n'és el principal, ja que conté més del 50% de les neurones noradrenèrgiques del cervell (Vera, 2005). Els axons d'aquestes neurones es dirigeixen cap al cerebel, la medul·la espinal, l'hipocamp, el tàlem i escorça cerebral (Vera, 2005). Es troben altres nuclis noradrenèrgics al tronc cerebral, que dirigeixen les projeccions cap a la medul·la espinal, tot i que són menys extenses que les del *locus coeruleus* (Nestler et al., 2001; Kuhar et al., 1999) (veure figura 4).

Els receptors adrenèrgics es classifiquen en alfa (α_1 , α_2) i beta (β_1 , β_2 , β_3).

La NA pot donar lloc a l'adrenalina (AD) en la medul·la suprarenal, mitjançant una reacció catalitzada per la fenil-etanol-amina-N-metiltransferasa (Malgor et al., 2000).

La NA té l'acció principal sobre el sistema vascular, augmentant la resistència perifèrica (Brandan, 2010). També es troba involucrada en la regulació de la secreció hormonal, cycle son-vigília, memòria, aprenentatge, motivació i activitat i regulació homeostàtica (Finch, 1978; Pradhan, 1980).

Els resultats obtinguts de l'efecte de l'envelliment sobre el contingut de NA són contradictoris. Per una part, s'ha demostrat una reducció dels nivells de NA a la medul·la espinal, tronc cerebral i àrees límbiques (Leslie et al., 1985; Miguez et al., 1999; Ponzio et al., 1982; Sirvio et al., 1994). No obstant, altres estudis afirmen un augment a l'hipotàlem, estriat i escorça cerebral (Harik i Mc Cracken, 1986; Machado et al., 1986; Moretti et al., 1987; Koprowska et al., 2004).

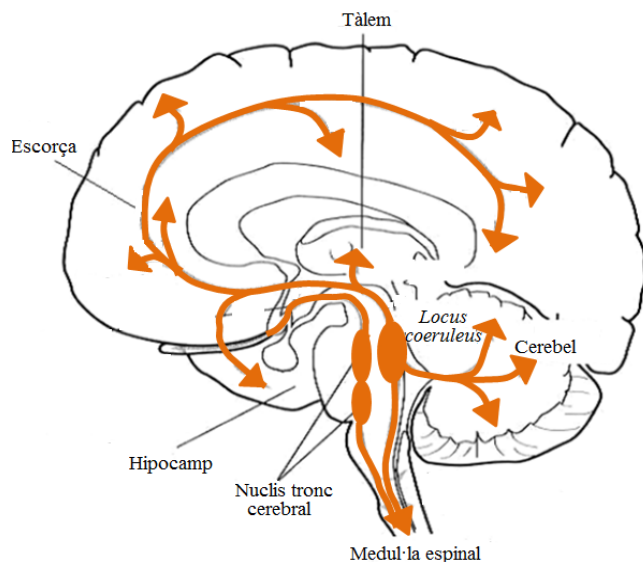


Fig 4. Principals nuclis noradrenèrgics i les seves projeccions en el cervell humà.

Serotonina

La síntesi de serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) depèn del triptòfan provinent de la dieta, que mitjançant la hidroxilació (addició d'un grup OH) efectuada pel triptòfan hidroxilasa, dóna lloc a 5-hidroxitriptòfan (5-HTP) (Vera, 2005). La 5-HT s'obté finalment per la descarboxilació del 5-HTP, reacció catalitzada per la DOPA-descarboxilasa, comuna amb la síntesi de DA (Vera, 2005).

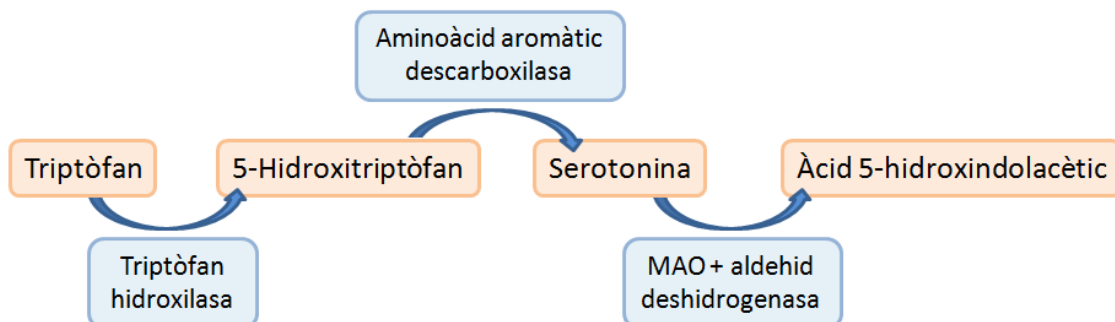


Fig 5. Representació esquemàtica dels principals components involucrats en la síntesi i degradació de la 5-HT

La 5-HT també s'emmagatzema en vesícules mitjançant un VMAT i la seva alliberació, a l'igual que la DA o NA, es dona per l'entrada de Ca^{2+} a la terminal presinàptica (Vera, 2005). A l'espai sinàptic, la 5-HT és recaptada per un transportador presinàptic específic de la 5-HT (SERT). El seu metabolisme es basa en l'acció del monoaminoxidasa (MAO) i el producte detectable d'aquest catabolisme és l'àcid 5-hidroxi-indolacètic (5-HIAA) (Vera, 2005).

Existeixen 7 subtipus de receptors de la 5-HT, que es poden agrupar en 3 grups, segons si s'acoplen a proteïnes $G_{0/1}$, $G_{q/11}$ o G_s . (Vera, 2005)

S'ha observat que les cèl·lules serotoninèrgiques es troben concentrades a la part mitjana del tronc cerebral, agrupades en set nuclis principals, coneguts com a complex nuclear del rafe (veure figura 6). A partir d'aquests nuclis neixen les fibres que arribaran a pràcticament tot el sistema nerviós: ganglis basals, hipotàlem, tàlem, hipocamp, sistema límbic, escorça cerebral, medul·la espinal i cerebel (Nestler et al, 2001). Mitjançant aquestes prolongacions, la 5-HT participa en el control del cicle son-vigília i en l'activació de l'escorça cerebral durant la vigília (Vera, 2005). ànim, emocions, temperatura, dieta, conducta sexual, alguns tipus de depressió, conducta suïcida i certs estats al·lucinatoris induïts per drogues.

La majoria de les investigacions que han obtingut resultats de l'efecte de l'envelliment sobre els nivells de 5-HT han coincidit amb una disminució en àrees límbiques, estriat, tronc cerebral, escorça frontal, amígdala i hipocamp de rates velles respecte madures (Machado et al., 1986; Miguez et al., 1999;

Strong et al., 1984; Venero et al., 1991; Koprowska et al., 2004).

També s'ha demostrat una disminució de l'afinitat de la del triptofan hidroxilasa, enzim limitant de la síntesi de 5-HT, pel seu substrat en rates velles respecte de madures (Azher et al., 2000). A més, altres estudis han demostrat un augment del metabolisme de 5-HT en hipotàlem, hipocamp i escorça frontal de rates (Moretti et al. 1987; Timiras et al., 1982), així com un augment de la taxa 5-HIAA/5-HT a l'hipocamp, estriat i escorça cerebral, fet que suggereix una taxa de recanvi accelerada de la 5-HT en rates d'avançada edat, és a dir, una major activitat serotoninèrgica (Koprowska et al., 2004).

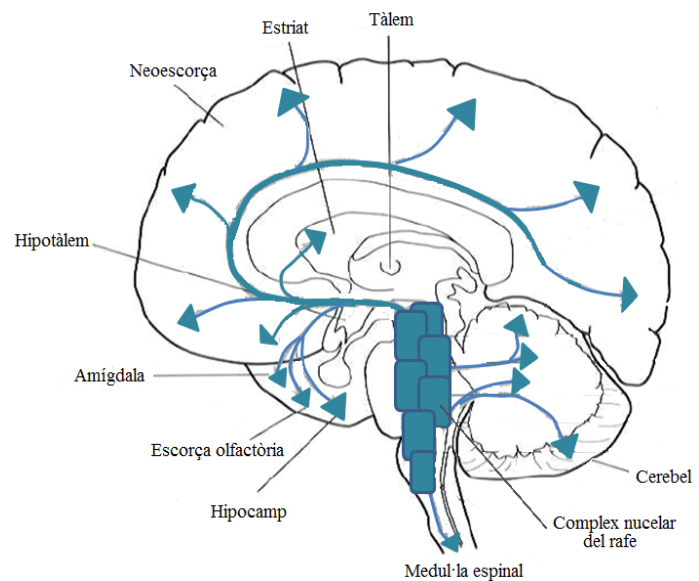


Fig 6. Nuclis serotoninèrgics i les seves principals projeccions al SNC. Modificat de Nestler et al., *Molecular Neuropharmacology*. 2001.

2.2. TEORIES DE L'ENVELLIMENT

Al llarg de la bibliografia científica es poden trobar multitud de teories, més de 300 segons una revisió de 1990 (Medvedev, 1990), postulades amb la intenció d'explicar les causes i efectes de l'envelliment. Entre aquestes destaquen la teoria de Pearl, que associa el procés de l'envelliment al desgast resultat del metabolisme (Pearl, 1928); la de Minot, que considera que és el preu que han de pagar els metazous per a la diferenciació cel·lular (Minot, 1907); la de l'error catastròfic en la síntesi de proteïnes proposada per Orgel (Orgel, 1963) o la del límit mitòtic de Hayflick (Hayflick, 1985). Actualment s'accepta la teoria de l'estrès oxidatiu causat per radicals lliures i altres espècies reactives de l'oxigen (ERO), amb concordança amb els plantejaments de Harman (Harman, 1956) i Gerschman (Gerschman, 1962), així com també la de l'estrès oxidatiu/lesió mitocondrial, proposada per Miquel, on defensa el paper clau del genoma dels mitocondris com a diana de les ERO (Miquel, 2005).

2.2.1. Teoria de l'estrès oxidatiu

L'oxigen és essencial per obtenir energia a partir del metabolisme aeròbic, però, alhora és la principal font generadora de radicals lliures. Els radicals lliures són espècies químiques que presenten un nombre imparell d'electrons, de manera que algun està desaparellat (Kumar et al, 2012). El concepte de *radicals lliures* aplicat a sistemes biològics fa referència principalment a les espècies reactives de l'oxigen (ERO), un grup de composts derivats de la reducció incompleta de l'oxigen molecular. Inclouen, tot i que no limiten, l'anió superòxid (O_2^-), radical mare que es forma quan l' O_2 guanya un electró al darrer orbital; el peròxid d'hidrogen (HO_2^-), oxidant de lípids; el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), origen d'altres radicals; i el radical hidroxil (OH^\cdot), que danya principalment l'ADN (Gey et al, 1991; Epe, 1996) (veure figura 7). A més de les ERO, entre els radicals lliures també destaquen les espècies reactives del nitrogen (ERN).

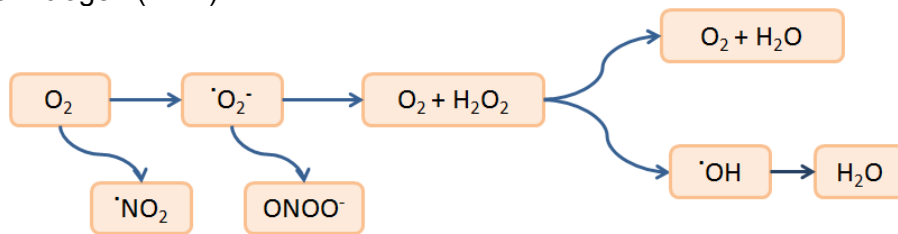


Fig 7. Via de formació d'alguns dels composts que integren el grup dels radicals lliures

Tot i que existeix varietat de mecanismes de formació d'aquestes molècules, la font fisiològica per excel·lència és la respiració cel·lular (Merksamer, 2013). Aquest procés normalment inclou el pas d'electrons a través de quatre complexos proteics situats a la membrana interna, però en algunes rares ocasions es produeix la sortida prematura dels electrons, suposant la reducció incompleta de l'oxigen molecular i generant l'anió superòxid (Murphy, 2009).

Els radicals lliures presenten funcions en diversos processos, com en el metabolisme de la glucosa, creixement cel·lular, proliferació (Rhee, 1999) o activació de factors de transcripció (Kaul et al., 2000). No obstant això, les ERO també provoquen l'alteració de proteïnes, lípids i ADN per oxidació podent desencadenar mutacions gèniques, dany o pèrdua d'activitat enzimàtica o alteració de la permeabilitat de la membrana cel·lular (Valiko et al., 2006; Finkel, 2003).

La teoria de l'estrès oxidatiu defensa que es produeix un canvi dependent de l'edat en el balanç antioxidant/pro-oxidant, el qual condueix a una major generació de radicals lliures, augment de l'estrès oxidatiu i desregulació de la funció cel·lular (Harman, 1972; Liochev, 2013). Així, segons aquesta, l'envelliment és el resultat de la generació i acumulació de radicals lliures amb l'edat, provocant com a conseqüència dany oxidatiu en molècules biològiques com ADN, proteïnes i lípids (Harman, 1956), que condicionen l'homeòstasi i integritat cel·lular (Vina et al., 2013).

Diversitat d'estudis han recolzat el pilar fonamental de la teoria de l'estrès oxidatiu: la intensitat de generació de radicals lliures en els teixits in vivo ha de ser menor en les espècies longeves que en aquelles que presenten major velocitat d'envelliment (Barja, 2005). A més, tot i només observar-se un lleuger augment de la longevitat màxima en animals amb elevades concentracions d'antioxidants tissulars, es va obtenir una forta tendència a l'increment de l'esperança de vida mitjana (Kohn, 1971; Clapp et al., 1979; Enesco et al., 1980; Ledvina et al., 1980; Porta et al., 1980).

2.3. EFECTE PROTECTOR DELS ANTIOXIDANTS EN LES ALTERACIONS QUE OCORREN DURANT L'ENVELLIMENT

2.3.1. Antioxidants

Un antioxidant és qualsevol substància capaç de retardar, prevenir o eliminar el dany oxidatiu d'una molècula diana (Halliwell i Gutteridge, 2010). En general i tal i com indica el seu nom, el seu mecanisme d'acció es basa en la pròpia oxidació per tal d'eliminar els radicals lliures generats abans de que aquests puguin començar la cadena de reaccions que danyen les cèl·lules.

Les cèl·lules disposen d'un sistema per mantenir un correcte balanç entre els nivells de radicals lliures i antioxidants amb la finalitat d'assegurar la integritat dels components cel·lulars (Villanueva i Kross, 2012). Les defenses antioxidants enzimàtiques inclouen el superòxid dismutasa, la catalasa, la glutatió peroxidasa, glutatió reductasa, dehidroascorbat reductatasa, tioredoxina reductatasa, antioxidants hidrofílics (ascorbat, urats i glutatió) i antioxidants lipofílics (tocoferols, flavonoides, carotenoides i ubiquinol). (Harman, 1993; Zorov, 1996) (veure figura 8). El radical superòxid d'hidrogen ($O_2^{\cdot-}$), mitjançant dismutació, pot donar lloc espontàniament a peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i oxigen, però aquesta conversió es veu accelerada per l'enzim superòxid dismutasa (SOD) (Turrens, 2003). El H_2O_2 es utilitza per cèl·lules com leucòcits i macròfags per eliminar bacteris que han ingressat a l'organisme (Lu i Finkel, 2008). El peròxid d'hidrogen també pot ser transformat per la catalasa a radical hidroxil. De fet, un 2% de l'oxigen que arriba a les neurones es transforma en aquest producte, que suposa la via final de formació de les ROS (Crespo-Santiago, 2012). Finalment, l'enzim glutatió peroxidasa comparteix substrat amb la catalasa, però a més pot reaccionar de manera efectiva amb lípids i altres hidroperòxids orgànics, catalitzant-ne la seva reducció i contribuint així a la protecció de les cèl·lules de mamífers (Sohal i Orr, 2011). La glutatió reductasa és capaç de regenerar, tornar reduir, el glutatió ja oxidat.

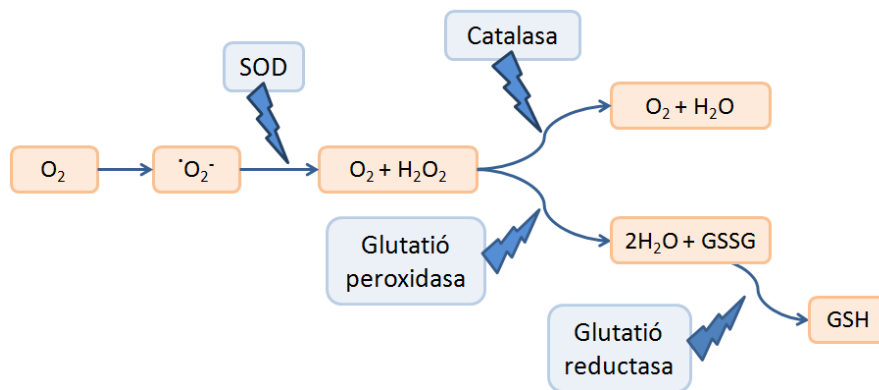


Fig 8. Representació esquemàtica dels substrats que presenten alguns dels enzims antioxidants

Així, la disminució dels micronutrients antioxidants o del sistema enzimàtic protector conduiria a una menor protecció mitocondrial contra els radicals lliures, presentant com a conseqüència l'envelliment mitocondrial i cel·lular accelerats (Battilana). És per això que els hàbits alimentaris són molt importants per a la preservació de la integritat mitocondrial i vida cel·lular (Gey, et al., 1991; Schmidt A, et al., 1994). És més, la dieta és un dels factors clau per a la prevenció i tractament de malalties cròniques associades a l'envelliment (Deny, 2008). Es postula que el consum de menjars rics en antioxidants pot d'ajudar a preservar els processos cognitius (Valls-Pedret et al., 2012). De fet, alguns estudis epidemiològics han suggerit que fruites, verdures, peix, vi i nutrients com àcids grassos poliinsaturats, vitamina E i B i antioxidants poden ajudar a protegir del declivi cognitiu que ocorre durant l'envelliment com, per exemple, en la malaltia d'Alzheimer (Mangialasche et al., 2010).

2.3.2. Vitamina E

La vitamina E és considerada un dels antioxidants liposolubles més potents per retardar l'envelliment i prevenir algunes malalties degeneratives vinculades amb l'edat (Meydani, 1995; Niki i Traber, 2012). La vitamina E és una família constituïda per 8 molècules liposolubles que engloben quatre tocoferols i quatre tocotrienols. És un dels antioxidants més freqüents en la dieta i s'obté principalment de fonts vegetals, com llavors de gira-sol, oli d'oliva o ametlles. Comparteixen una estructura bàsica formada per un anell cromanol i una cadena lateral de 16 carbonis. L'anell cromanol pot trobar-se metilat en diferents posicions (5, 7 i 8) determinant el tipus de tocoferol o tocotrienol que sigui (α , β , γ o δ). Les 8 molècules presenten activitat antioxidant no enzimàtica, però l' α -tocoferol és l'isòmer més abundant i actiu, tan química com biològicament (Sung et al., 2003; Schneider, 2005).

El mecanisme bàsic d'aquest compost és inhibir la cadena de propagació dels radicals en els dominis lipídics mitjançant la pròpia conversió a un producte oxidat bastant estable, el radical lliure α -tocoferoxil (Burton et al., 1986). L' α -tocoferol reacciona amb els radicals peroxils de lípids molt més ràpid del que ho fa la reacció de propagació dels mateixos radicals peroxils (Dutta i Dutta, 2003), de manera que no permet que aquests radicals puguin realitzar altres unions. A més, la forma original pot ser regenerada mitjançant la reducció de l'ascorbat (vitamina C) o ubiquinol-10 (Schneider, 2005). La vitamina E no sols presenta propietats antioxidants, sinó que també pot millorar la resposta immune (Pae et al., 2012) i modular els sistemes de reparació de l'ADN (Claycombe i Meydani, 2001) i vies de transducció de senyals (Azzi et al., 2004).

La interacció entre gens i vitamina E és crucial en la neurodegeneració ja que aquesta pot interactuar amb receptors cel·lulars i factors de transcripció i, així, guiar l'expressió gènica, modulant els nivells de proteïnes i canvis en l'activitat d'enzims (Mocchegiani et al., 2014). Els gens amb els que interactua la vitamina E es troben relacionats amb l'estrès oxidatiu, proliferació, inflamació i apoptosi, així com també adhesió cel·lular, cicle cel·lular i matriu extracel·lular (Rimbach et al., 2010). Alguns d'ells són SOD, NO sintasa, ciclooxigenasa-2, NADPH oxidasa, NF-Kb, fosfolipasa A2, proteïna fosfatasa 2A, 5-lipooxigenasa, activador proteïna-1, citocrom P450, BCL-2 tipus 1 (Munteanu et al., 2004; Lirangi et al., 2012; Kaga et al., 2013; Zingg et al., 2013)

La suplementació amb vitamina E ha resultat en un augment de l'esperança de vida en varis animals, com *Caneorhabditis elegans* (Harrington i Harley, 1988) i ratolins vells (Navarro et al., 2005).

A nivell cel·lular, els processos que desencadenen la mort neuronal i els esdeveniments neurodegeneratius són causats o resulten en un augment de la formació d'oxigen reactiu i espècies del nitrogen, degut a la potenciació de la peroxidació lipídica provocada per la inflamació crònica i també augment de la producció de peroxinitrit amb la conseqüent activació immune anormal (Lin i Beal, 2006).

Estudis epidemiològics indiquen que dietes riques de vitamina E contribueixen a la prevenció de desordres neurodegeneratius associats a l'edat (Engelhart et al., 2002; Morris et al., 2005).

Un estudi ha demostrat que un mescla d' α -, β -, γ -trienols i α -tocoferol durant tres setmanes atenua la reducció de glutatió i catalasa, així com també disminueix les concentracions de nitrit en els cervells de rates amb estrès oxidatiu desencadenat per estreptozocotina (Tiwari et al., 2009). L' α -tocoferol i α -tocotrienol presenten un paper contra el dany oxidatiu en cultius de cèl·lules hipocampals desencadenat per l'acumulació de β -amiloide (Goodman i Mattson, 1994). També s'ha observat que la suplementació dietària amb vitamina E redueix l'acumulació de lipofuscina en el cervell de rates de mitjana edat (Monji et al., 1994) i protegeix de la peroxidació lipídica (Meydani et al., 1988).

A més, la família de vitamina E presenta un paper protector en la lesió cerebral i en la neurodegeneració mitjançant un mecanisme que inclou la inhibició de la peroxidació lipídica a través de l'acció de varis enzims (pp60^{c-Src} kinasa, ERK1 i ERK2 kinases, fosfolipasa A2, 12-lipooxigenasa), així com la inhibició de la senyalització del factor de transcripció NF-kB (Frank et al., 2012).

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Estudis actuals del grup de Neurofisiologia demostren un efecte favorable de l'administració d'alguns antioxidants en el retràs de l'envelliment cerebral. Aquest benefici es pot associar a l'augment de la quantitat de monoamines que desencadena el tractament amb antioxidants, mitjançant la prevenció del deteriorament monoaminèrgic característic de l'envelliment i millorant-ne consegüentment les funcions cognitives en rates. Un dels antioxidants més potents de la naturalesa és l' α -tocoferol, que en molts d'estudis ha presentat efectes prometedors en la prevenció de diverses malalties, principalment relacionades amb l'envelliment, com ara, la malaltia de l'Alzheimer. Les principals monoamines vinculades amb la memòria i aprenentatge són la 5-HT i la DA, localitzades principalment en l'estriat i hipocamp. (Esteban et al., 2010).

OBJECTIUS

1. Estudiar l'efecte beneficiós de dos tractaments amb α -tocoferol (20mg/kg/dia i 40+60mg/kg/dia) a llarg termini sobre el deteriorament de la memòria de treball que ocorre generalment durant l'envelliment.
2. Estudiar l'efecte que presenta el tractament amb α -tocoferol sobre el sistema dopaminèrgic de l'estriat de rata.
3. Analitzar l'efecte dels dos tractaments crònics amb α -tocoferol sobre el declivi noradrenèrgic de l'hipocamp de rates que normalment es dona associat a l'envelliment.
4. Avaluar l'efecte del tractament crònic amb α -tocoferol sobre el sistema serotoninèrgic de l'estriat i hipocamp
5. Comparar els resultats obtinguts a nivell cognitiu amb els resultats bioquímics..

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1. Animals d'experimentació

S'han utilitzat rates mascle Sprague-Dawley joves, aproximadament 3 mesos (220-240g) i velles d'uns 20 mesos (500-550g), criades a l'estabulari de la Facultat de Ciències de la Universitat de les Illes Balears (Tipus II, registre nºES704000000540 a la *Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears*). Els animals varen ser mantinguts en caixes de polipropilè translúcides individuals, amb cicles de 12h de llum/obscuritat, sota condicions controlades de temperatura (20-22°C) i humitat (50-65%). Varen rebre aigua i una dieta estàndard tipus A04 (Panlab®) *ad limitum*. Els procediments experimentals varen ser duts a terme obeint la guia ètica estàndard (European Communities Council Directive 86/609/EEC), sent els protocols aprovats pel Comité Local Bioètic de la Universitat de les Illes Balears (UIB), Espanya.

4.2. Fàrmac i productes utilitzats

El fàrmac utilitzats en aquest treball han estat: α -tocoferol (3,4- Dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2- (4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-benzopyran-6-yl-acetate), oli de blat de moro i NSD-1015 (3-Hydroxybenzylhydrazine dihydrochloride), tots tres procedents de la casa comercial Sigma (Sigma-Aldrich., Madrid, Espanya).

Tots els productes requerits pel processament de les mostres i execució de l'HPLC han estat obtinguts de Sigma (Sigma-Aldrich., Madrid, Espanya).

4.3. Tractaments farmacològics

Es varen realitzar dos tractaments de diferents dosis amb l'antioxidant α -tocoferol, per tal de determinar si l'efecte és proporcional a la dosi. El primer es va iniciar amb una dosi de 20mg/kg/dia (n=6), utilitzant com a vehicle de dilució l'oli de blat de moro (1ml/kg/dia). El tractament durà 28 dies, durant els quals es preparava diàriament la dilució del fàrmac i s'ajustava atenent al pes de l'animal. Posteriorment, s'administrava via intraperitoneal entre les 8:00 i les 9:00am, ja que és quan es produeix el canvi de llum per tal d'evitar exposar als animals a un major estrès que pogués interferir en els resultats. Paral·lelament a aquest tractament, es mantingueren els animals control (n=6) en les mateixes condicions que els tractats amb tocoferol però se'ls sotmeté a l'administració d'oli de blat de moro (1ml/kg/dia). El segon tractament inclou dues dosis d' α -tocoferol, administrades en dos períodes consecutius de l'estudi. El primer període tingué una durada de 28 dies i en ell els animals eren tractats diàriament amb una dosi de 40mg/kg (n=6), utilitzant també com a vehicle de dilució l'oli de blat de moro (1ml/kg/dia) Durant el segon període s'administrà una dosi de 60mg/kg/dia (n=6) i va ser efectuat seguint el mateix protocol i sobre les mateix rates de α -tocoferol 40mg/kg/dia. Durant aquests 56dies (28+28) va continuar l'administració d'oli de blat de moro (1ml/kg/dia) en els animals control (n=6).

4.4. Determinació cromatogràfica de l'activitat tirosina i triptòfan hidroxilasa *in vivo*

4.4.1. Dissecció i preparació de mostres

Després dels tractaments crònics, les rates reberen NSD-1015 (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya) (100mg/kg, i.p.) i varen ser posteriorment sacrificades, passats 30 minuts d'aquesta administració, mitjançant decapitació. S'utilitzà NSD (clorhidrat de 3-hidroxibenzilhidrazina) per tal de poder determinar l'activitat de la tirosina hidroxilasa i de la triptòfan hidroxilasa, enzims limitants de les vies metabòliques de síntesi de catecolamines i 5-HT respectivament. NSD és un inhibidor de l'enzim L-descarboxilasa dels aminoàcids aromàtics centrals, de manera que la seva acció permet bloquejar la transformació de DOPA a DA i NA

i de 5-HTP a 5-HT, i estudiar l'acumulació de 5-HTP i DOPA *in vivo* durant els 30 minuts previs al sacrifici (veure figura 9). Aquests nivells representen un indicador de la producció de les monoamines 5-HT, NA i DA.

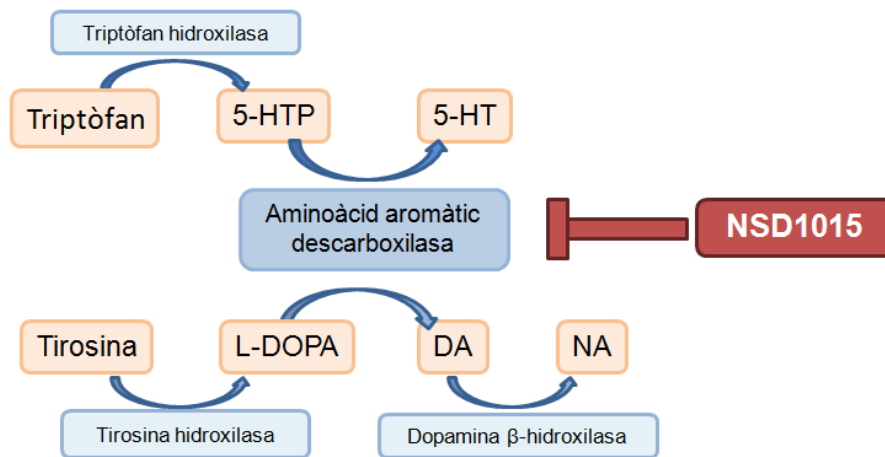


Fig 9. Representació esquemàtica de l'efecte inhibitori de NSD1015 sobre la descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics, comuna a la via dopaminèrgica, noradrenèrgica i serotoninèrgica

Després del sacrifici, se n'obtingueren els cervells i es van disseccionar ràpidament les diferents regions cerebrals a analitzar sobre una placa d'alumini a 4°C. Les regions cerebrals varen ser, per ordre d'extracció: glàndula pineal, cerebel, tronc, escorça frontal, hipotàlem, ganglis basal, hipocamp, estriat i escorça cerebral (veure figura 10). Es van congelar immediatament en nitrogen líquid, i s'emmagatzemaren a -80°C fins a l'hora dels corresponents anàlisis (Esteban et al., 2010).

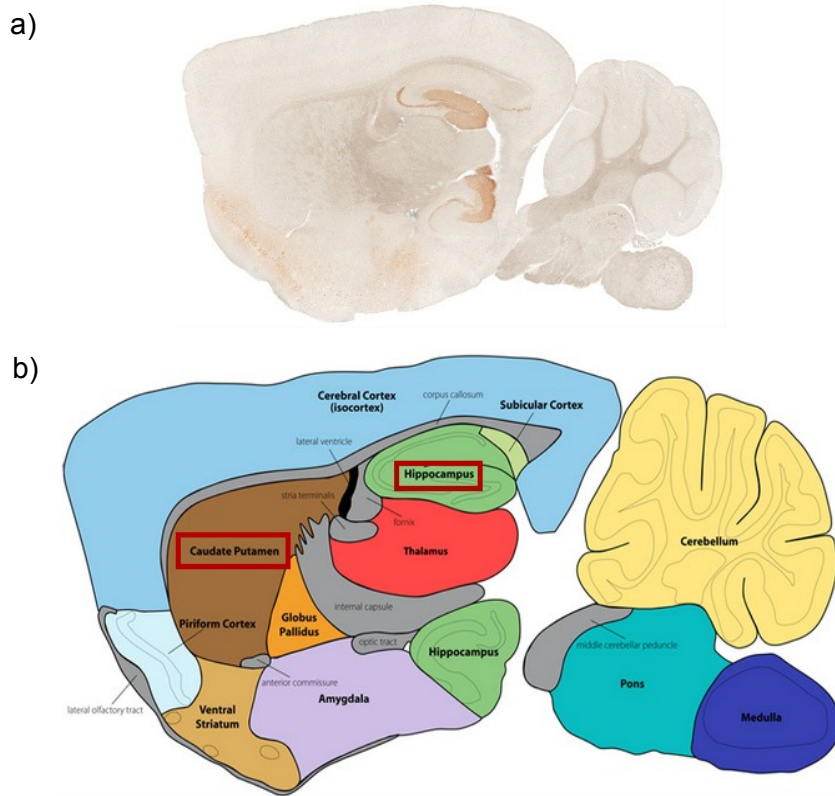
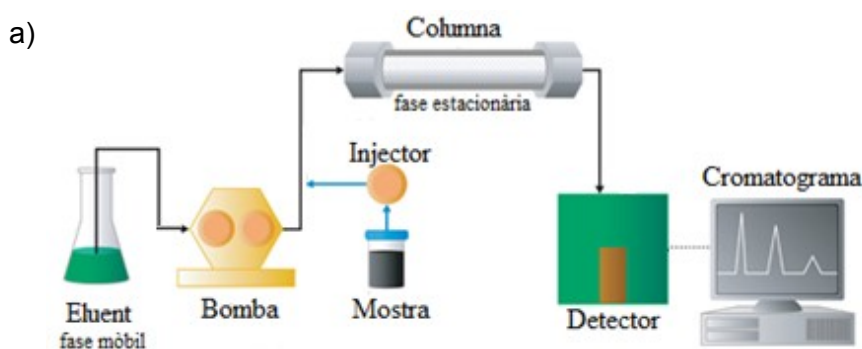


Fig 10. Tall longitudinal del cervell de rata (a); Representació de les principals regions del cervell de rata, on s'hi pot observar remarcants l'hipocamp i l'estriat (b)

A l'hora del processament de les mostres pel seu posterior anàlisi, les regions van ser pesades i col·locada individualment en tubs frescs disposats amb 1ml de tampó d'homogeneització (HClO_4 0,4M, K_2EDTA 0,01% i $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0,1%). S'homogeneitzà el contingut de cada tub amb un homogeneitzador Ultraturraz (tipus Tp 18/10) a velocitat màxima durant 30 segons. A continuació, es centrifugaren les mostres a 40000g durant 20 minuts a 4°C (centrífuga refrigerada sèrie Biocen 22R, amb rotor Orto alresa RT222Ns 140311/01) i el sobrenedant resultant va ser filtrat amb un filtre de xeringa de tefló de 0.45µm de diàmetre de porus (Spartan-3, Sigma-Aldrich; Millex®-LH; Millipodre; Billerica, Mass, USA). Es tornaren a congelar a -80°C els sobrenedants filtrats fins al moment de la quantificació mitjançant HPLC amb detecció electroquímica.

4.4.2. Anàlisi cromatogràfic

La tècnica utilitzada en aquest treball per a mesurar els nivells de monoamines (DA, 5-HT, NA), dels seus precursors i metabòlits (DOPA, DOPAC, 5-HIAA, 5-HTP, HVA) va ser la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase revertida i amb detecció electroquímica. Aquesta tècnica pretén separar composts químics en funció de la seva diferent afinitat per una fase mòbil i una estacionària (veure figura 11). La fase (mòbil) circula amb íntim contacte amb un sòlid molt porós d'elevada capacitat absorbent o un altre líquid immiscible (fase estacionària). Quan s'introdueix una mescla de substàncies (la mostra en qüestió) en la fase mòbil, cada un dels composts avança al llarg del sistema amb una velocitat diferent, depenent de l'afinitat per cada una de les fases. Això suposa que quan la mostra hagi acabat de recórrer la columna, cada una de les substàncies prèviament introduïdes al sistema eluirà amb un temps diferent, de manera que s'haurà aconseguit separar-les. Així, el mecanisme per realitzar la separació dels composts en dissolució és la retenció de cada compost en la fase estacionària durant diferents temps. Els més polars i amb menor tamany són els que presenten més dificultat per dissoldre's en la columna apolar, per tant, són els primers en sortir de la columna; mentre que els que tarden més són els de menor polaritat i major tamany.



b)



Fig 11. Esquema bàsic del funcionament i de les parts que integren el mecanisme de la tècnica HPLC (a); Aparell real utilitzat per a l'execució de l'HPLC (b)

En aquest cas es tracta d'una HPLC de fase inversa, això significa que la fase estacionària de la que disposa és polar. Es troba situada en una columna Spherisorb S3 ODS1 (5µm de mida de partícula, 4.6mm x 100mm; Waters), acoplada a una precolumna Tracer ODS2C18 (2-5µm de mida de partícula) (Teknokroma). Per altra banda, la fase mòbil o eluent (KH₂PO₄ 0,1 M; àcid octà sulfònic 2,1 M; K₂EDTA 0,1 M, metanol 10% (v/v) i 2mM NaCl ; i pH ajustat al rang 2,72-2,76 amb H₃PO₄ 85%) és impulsada a un flux de 0.8ml/min mitjançant una bomba de doble pistó tipus Waters 600 controller per tal de poder d'efectuar el recorregut i arribar a la columna que conté la fase estacionària.

Els composts es detectaren electroquímicament mantenint un potencial aplicat de +0.75V front a l'elèctrode de referència *in situ* (Ag/AgCl) mitjançant un detector electroquímic (Waters 2465 Electrochemical Detector). La corrent produïda va ser captada per un ordinador PC gràcies al software Empower Pro de Waters®, a través d'una interfase tipus WAT busSAT/IN Module (Waters). Es realitzà una corba estàndard per a cada compost a estudiar a partir de patrons externs (estàndards). Posteriorment, s'analitzaren les mostres i, mitjançant el software s'obtingueren unes corbes que interpolades al pic de la corba estàndard a la mostra, permeteren obtenir les concentracions de NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HTP, 5-HIAA, HVA, 5-HT (veure figura 12)

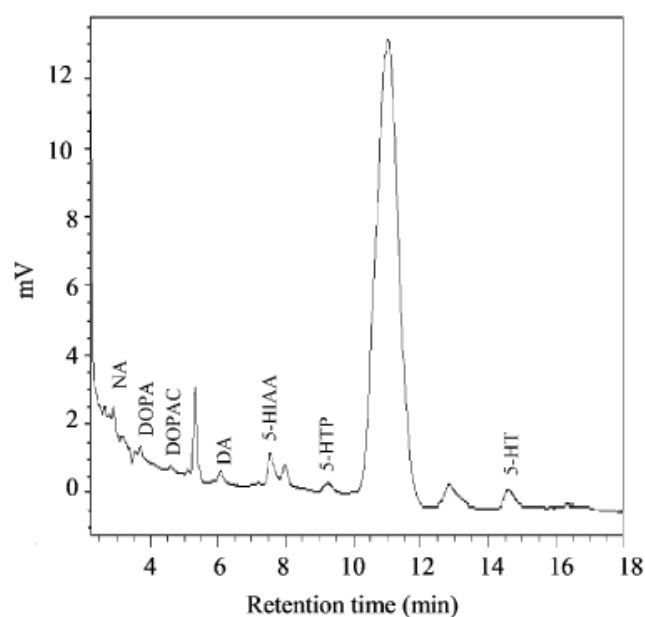


Fig 12. Anàlisi cromatogràfic representatiu d'una mostra d'estriat. S'hi identifiquen els següents composts per ordre de separació: NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HIAA, 5-HTP, HVA, 5-HT. El pic entre 5-HTP i 5-HT correspon a NSD1015

4.5. Proves comportamentals

El *Radial maze* és una prova utilitzada per a la valoració de la memòria de treball espacial. Com es pot veure a la figura 13, consisteix en un laberint (Panlab, S.L. Barcelona, Espanya) format per 8 braços (70x11cm) equidistants que s'estenen a partir d'una plataforma central octogonal (28cm de diàmetre). A l'extrem de cada braç s'hi situa un pouet amb una petita porció de menjar. El fet de que els animals hagin estat sotmesos a dejú durant les 48 hores prèvies a l'inici del test, amb lliure accés a l'aigua, actua com a reforç motivacional per tal de que els animals entrin als braços per a trobar-hi menjar.

En la versió estàndard de *Radial Maze*, el primer contacte dels animals amb el laberint s'anomena habituació i consisteix en facilitar al subjecte l'exploració de la infraestructura durant 3 dies, 15 minuts cadascun (Tarragon et al., 2012). Per començar el test, cal situar els animals al centre de la plataforma. Durant el transcurs de la prova, s'anoten els braços que ha visitat i el temps transcorregut. Es dona per acabada quan ja han estat visitat tots els

braços o bé quan s'ha arribat al temps màxim de 20 minuts. Cal que el laberint sigui netejat amb etanol al 95% entre cada test per tal d'eliminar possibles olors d'animals anteriors. Els resultats s'analitzen mitjançant un programa específic per a *Radial Maze*: Smart v2.5 (Panlab, S.L., Barcelona, Espanya).

Cal considerar dos paràmetres: el temps necessari per a completar el laberint (amb un temps màxim de 20 minuts) i els errors comesos durant el procés, ja sigui per braços revisitats o sense visitar.

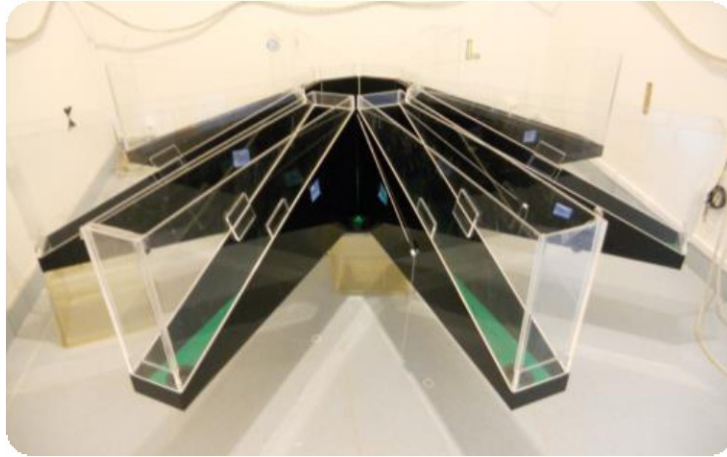


Fig 13. Aparell utilitzat per a la valoració de la memòria de treball, el Radial

4.6. Anàlisi matemàtic

Els resultats s'expressaren com a valors mitjans \pm error estàndard de la mitjana.

L'anàlisi estadístic dels resultats es realitzà mitjançant anàlisi de la variança (ANOVA) seguit dels test *post hoc* de Bonferroni, quan es comparaven més de dos grups experimentals (control, 20mg i 40+60mg), mentre que el test t de Student s'utilitzà quan es comparaven estadísticament dos grups d'animals (un dels tractaments amb α -tocoferol i el control). Per a realitzar l'anàlisi estadístic s'utilitzà el software GraphPat Prism 5. Es considerà estadísticament significatiu un nivell mínim de probabilitat (p) igual o inferior a 0.05.

5. RESULTATS

5.1. Efecte de l'envelliment sobre el sistema monoaminèrgic de l'estriat i hipocamp

La taula 1 indica la mitjana \pm SEM del contingut de DOPA, DA, DOPAC, 5-HIA, 5-HTP, HVA i 5-HT en estriat de rates joves i velles. Aquesta taula permet veure el declivi d'aquests neurotransmissors, precursors i metabòlits en l'envelliment.

Estriat	DOPA	DA	DOPAC	5-HIA	5-HTP	HVA	5-HT
Control joves	1809 \pm 53	15549 \pm 691	311 \pm 17	2000 \pm 261	320 \pm 29	665 \pm 21	1500 \pm 66
Control velles	931 \pm 507	8120 \pm 4289	164 \pm 85	1131 \pm 502	175 \pm 84	343 \pm 186	783 \pm 414

Taula 1. Contingut de DOPA, DA, DOPAC, 5-HIA, 5-HTP, HVA i 5-HT en l'estriat de rates joves i velles, respectivament. S'expressa en forma de mitjana \pm SEM (pg/mg teixit humit). Aquestes dades han estat sotmeses a l'anàlisi estadístic mitjançant el test t-Student. Les diferències entre control joves i control velles són significatives ja que s'ha obtingut un p-valor < 0.05.

La taula 2 mostra la mitjana \pm SEM (error estàndard de la mitjana) dels nivells de NA, DOPA, 5-HIA, 5-HTP i 5-HT quantificats a les mostres d'hipocamp pertanyents a rates joves i velles. Es pot observar una disminució dels 5 composts amb l'edat.

Hipocamp	NA	DOPA	5-HIA	5-HTP	5-HT
Control joves	1243 \pm 89	98 \pm 16	797 \pm 46	195 \pm 13	472 \pm 44
Control velles	431,4 \pm 65.1	43,9 \pm 9.0	349,1 \pm 79.9	112,2 \pm 15.6	277,8 \pm 40.1

Taula 2. Contingut de NA, DOPA, 5-HIA, 5-HTP, 5-HT en l'hipocamp de rates joves i velles, respectivament. S'expressa en forma de mitjana \pm SEM (pg/mg teixit humit). Aquestes dades han estat sotmeses a l'anàlisi estadístic mitjançant el test t-Student. Les diferències entre control joves i control velles són significatives ja que s'ha obtingut un p-valor < 0.05.

5.2. Efecte del tractament amb α -tocoferol sobre la memòria de treball espacial en rates velles mitjançant el *Radial-maze*.

En el present estudi s'ha avaluat l'efecte del tractament amb α -tocoferol 20mg i α -tocoferol 40+60mg sobre la memòria de treball en rates velles mitjançant la prova del laberint radial de 8 braços (*Radial Maze*) (taula 3). El tractament amb vehicle en el grup control no ha provocat canvis en la memòria de treball al llarg de tractament. En canvi, aquells grups tractats amb α -tocoferol 20mg i α -tocoferol 40+60mg han presentat millores cognitives: s'ha observat un decreixement gradual d'ambdós grups i després dels 28 dies de tractament quant al temps requerit per a completar la prova (33.3% i 36.7%, respectivament) i en el nombre d'errors (5.7 i 52.2%, respectivament). L'anàlisi estadístic ha demostrat diferències significatives entre el temps requerit per a completar la prova del grup control respecte tant del tractament tocoferol 20 com tocoferol 40+60. Quant al nombre d'errors, s'han presentat diferències significatives al comparar el grup tractat amb α -tocoferol 40+60 amb el grup control i també quan s'ha comparat els tractats amb α -tocoferol 40+60 amb els α -tocoferol 20.

Els resultats deixen evidència de l'eficàcia del tractament amb α -tocoferol a diferents dosis sobre la memòria de treball, així com suggereixen que una administració suplementària d'aquest compost podria ser utilitzada com a mètode no invasiu de protecció contra el deteriorament cognitiu en l'envelliment normal del cervell.

Grup i tractament	% de decreixement en temps (28 dies)	% de decreixement en nº d'errors (28 dies)
Tocoferol 20 mg	33.3 \pm 0.8***	5.7 \pm 0.6
Tocoferol 40+60mg	36.7 \pm 0.9***	52.2 \pm 0.4***

Taula 3. Efecte de l' α -tocoferol 20mg (n=8) i tocoferol 40+60mg (n=6) sobre la memòria de treball en rates velles, determinat mitjançant la prova del laberint radial (Radial Maze) realitzada als 28 dies del tractament. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SEM del % de decreixement respecte del grup control de la mateixa edat tractat amb vehicle (n=7). El temps mitjà, en valor absolut, del grup control vell ha estat de 16.17 \pm 1.9minuts. El nombre d'errors mitjà comesos pel grup control vell ha estat de 12 \pm 1. El nombre d'errors inclou la suma de braços no visitats al final del temps màxim establert (20 minuts) i les reentrades en un mateix braç. Les dades han estat sotmeses a l'anàlisi ANOVA one-way i s'han considerat diferències significatives quan $p < 0.05$. Les * representen el p-valor al comparar el tractament amb qüestió respecte del control.

5.3. Efecte del tractament d' α -tocoferol sobre els sistemes monoaminèrgics de l'estriat en rates velles.

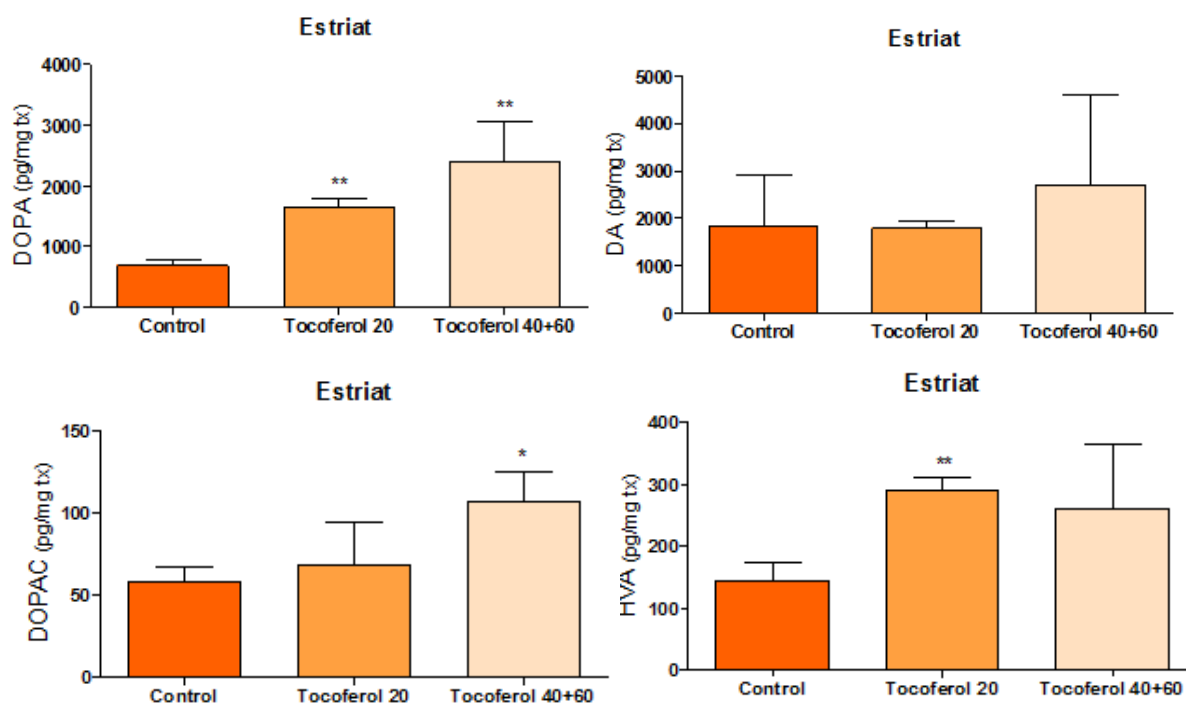


Fig 14. Efecte de dues dosis d'alfa-tocoferol (20mg i 40+60mg) sobre l'acumulació de DOPA (n=6), DA (n=6), DOPAC (n=6) i HVA (n=6) per tocoferol 20, i n=5 per tocoferol 40+60) després de la inhibició del l'enzim L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa mitjançant NSD-015 (100mg/kg, intraperitoneal). Els grups de rates control (n=6) varen ser tractats amb vehicle salí (1mg/kg/dia). Les columnes (ng/g) representen la mitjana \pm error estàndard de la mitjana, ambdós obtinguts de l'anàlisi dels n animals per grup. L'estadística es basa en l'anàlisi one-way de la varianza (ANOVA) seguit pel test post-hoc de Bonferroni. També s'ha realitzat el test T-Student. Les * representen el p-valor que s'obté quan es compara un dels dos tractaments amb el grup control: (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $n < 0.001$.

L'estriat és una regió on hi ha abundants neurones serotoninèrgiques i dopaminèrgiques. Per això, es determinaren els nivells de DOPA, DA, DOPAC, HVA, 5HIAA, 5-HT i 5HTP, en estriat de rates velles.

La figura 14 mostra la quantitat (pg/mg teixit humit) de DOPA (precursor de DA), DA, DOPAC i HVA (principals metabòlits) en l'estriat. Es pot observar un augment significatiu de DOPA amb les dues dosis d' α -tocoferol respecte del control. Quant a la DA, sota els tractaments de tocoferol no presenta variacions significatives respecte del control, ni entre dosis. Finalment, el tractament amb tocoferol 40+60 suposa un increment significatiu del contingut de DOPAC a l'estriat, mentre que és la dosi de tocoferol 20mg representa un augment considerable estadísticament de la quantitat de HVA en l'estriat.

La figura 15 mostra la quantitat (pg/mg teixit humit) de 5-HT, del seu precursor (5-HTP) i el seu principal metabòlit (5-HIAA), en l'estriat després del tractament amb diferents dosis de tocoferol. Cap dels tres composts presenten diferències significatives ni entre els tractaments ni respecte el control.

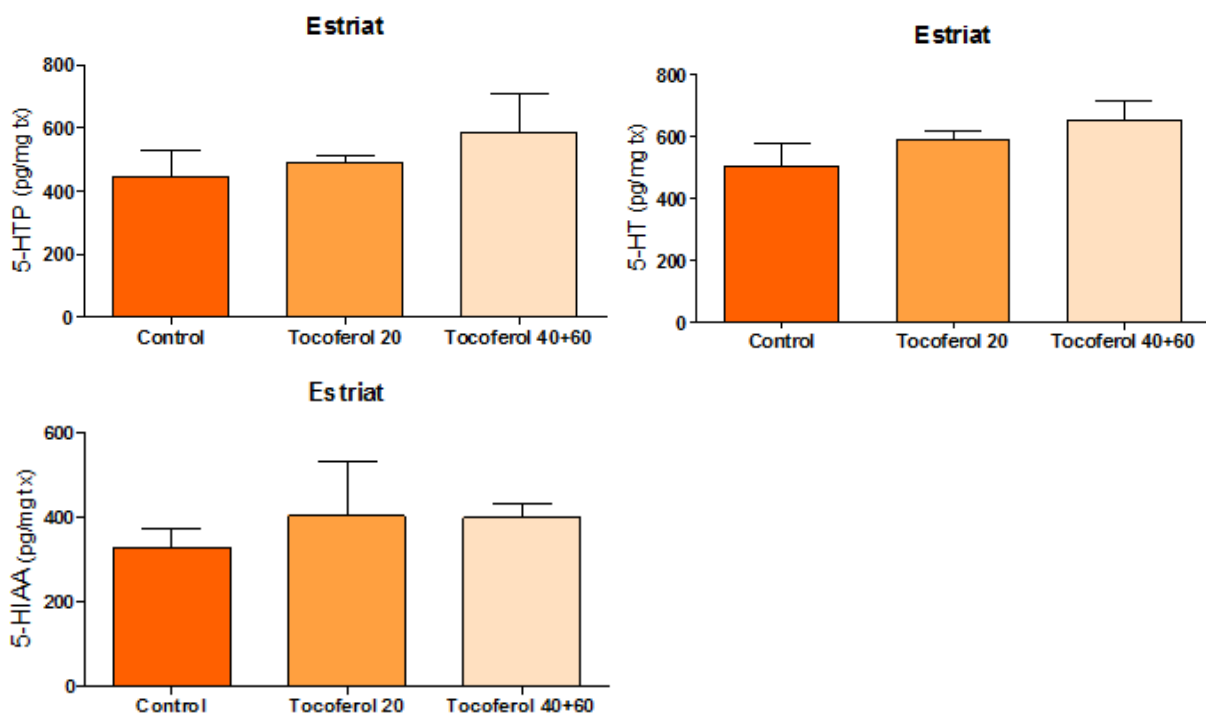


Fig 15. Efecte de dues dosis d'alfa-tocoferol (20mg i 40+60mg) sobre l'acumulació de 5-HTP (n=6), 5-HT (n=6 tocoferol 20, i n=5 per tocoferol 40+60) i HIAA (n=6) i HVA (n=5 per control, i n=6 per tocoferol20 i tocoferol40+60) després de la inhibició del l'enzim L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa mitjançant NSD-015 (100mg/kg, intraperitoneal). Els grups de rates control (n=6) varen ser tractats amb vehicle salí (1mg/kg/dia). Les columnes (ng/g) representen la mitjana \pm error estàndard de la mitjana, ambdós obtinguts de l'anàlisi dels n animals per grup. L'estadística es basa en l'anàlisi one-way de la variança (ANOVA) seguit pel test post-hoc de Bonferroni. També s'ha realitzat el test T-Student. Les * representen el p-valor que s'obté quan es compara un dels dos tractaments amb el grup control: (*)p<0.05; (**) p<0.01; (***)p<0.001.

5.4. Efecte del tractament amb α -tocoferol sobre el sistema monoaminèrgic de l'hipocamp de rates velles

L'hipocamp és una regió que presenta un gran nombre de neurones noradrenèrgiques i serotoninèrgiques. Per això, s'utilitza l'HPLC per determinar els nivells de DOPA, NA, DOPA, 5-HTP, 5-HT i 5-HIAA.

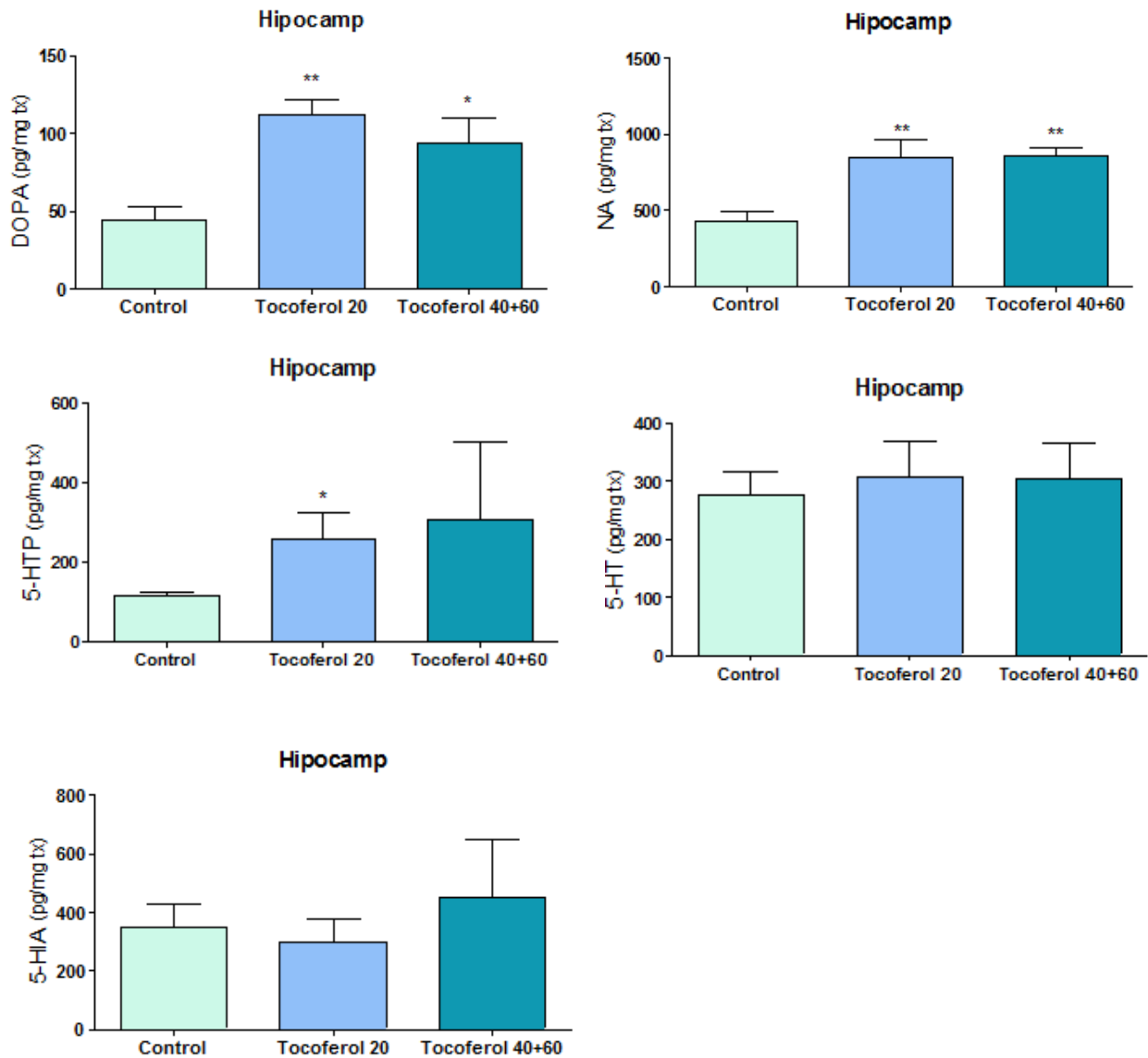


Fig 16. Efecte de dues dosis d' α -tocoferol (20 i 40+60mg) sobre l'acumulació de DOPA (n=6), NA (n=6), 5-HTP (n=4), 5-HT (n=6), i 5-HIAA (c; n=6 per tocoferol20, i n=5 per tocoferol40+60) després de la inhibició del l'enzim L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa mitjançant NSD-015 (100mg/kg, intraperitoneal). Els grups de rates control varen ser tractats amb vehicle salí (1mg/kg/dia). Les columnes representen la mitjana \pm error estàndard de la mitjana, ambdós obtinguts de l'anàlisi dels n animals per grup. L'estadística es basa en l'anàlisi one-way de la variança (ANOVA) seguit pel test post-hoc de Bonferroni. També s'ha realitzat el test T-Student. Les * representen el p-valor que s'obté quan es compara un dels dos tractaments amb el grup control: (*)p<0.05 ; (**)p<0.01 ; (***)p<0.001.

La figura 16 mostra la quantitat (pg/mg teixit humit) de DOPA i NA a l'hipocamp d'animals control i tractats amb diferents dosis d' α -tocoferol (20 i 40+60) durant 28 dies de tractament. Es pot observar un augment significatiu de la quantitat de DOPA a l'hipocamp amb les dues dosis d'alfa tocoferol, 20 i 40+60mg respecte al control. També s'observa un augment significatiu en l'acumulació de NA a l'hipocamp amb les diferents dosis d' α -tocoferol, respecte del control.

En la figura 16 també es pot observar la quantitat (pg/mg teixit humit) de 5-HT, del seu precursor (5-HTP) del seu principal metabòlit (5-HIA) a l'hipocamp, després del tractament crònic amb les diferents dosis d' α -tocoferol. En aquest cas es pot observar un augment significatiu de l'acumulació de 5-HTP en el cas del tractament tocoferol 20mg respecte del grup control. No es presenten diferències significatives sobre el contingut de 5-HTP entre els dos tractaments. Les dues dosis de tocoferol (20 i 40+60) suposen un augment de 5-HT a l'hipocamp, però no significatiu respecte del control. No s'observen diferències significatives entre tractaments ni respecte al control en el contingut de 5-HIAA a l'hipocamp

6. DISCUSSIÓ

6.1. Efecte de l'envelliment sobre el sistema monoaminèrgic d'hipocamp i estriat

Tot i la controvèrsia de l'efecte de l'edat sobre els sistemes adrenèrgic, colinèrgic, dopaminèrgic i serotoninèrgic (Finche i Roth, 1999; Fisher et al., 1992; McEntee i Crook, 1991; Morgan i May, 1990; Pradhan, 1980), aquest estudi defensa l'alteració de la neurotransmissió monoaminèrgica del cervell amb l'edat (Esteban et al., 2010), concretament a l'hipocamp i estriat, i dona suport a la reducció de la capacitat de les neurones per sintetitzar els neurotransmissors que actuen en les sinapsis amb l'edat (Alvarez i Sabatini, 2007), ja que s'ha observat un declivi considerable de totes les monoamines (NA, 5-HT i DA), precursors (DOPA i 5-HTP) i metabòlits (DOPAC, 5-HIA, HVA) subjectes d'estudi.

6.2. Efecte del tractament amb α -tocoferol sobre la memòria de treball

Els resultats obtinguts amb la prova del *Radial Maze* indiquen una clara millora de la memòria de treball dels individus tractats amb α -tocoferol ja que aquests presentaren una disminució dels temps necessari per completar el test, així com del nombre d'errors comesos, respecte del grup control. El percentatge de disminució del temps i del nombre d'errors augmenta amb la dosi de tocoferol, de manera que els subjectes tractats amb 40+60mg/kg/dia d' α -tocoferol demostraren major habilitat en l'execució del test.

6.3. Efecte de l'envelliment i del tractament amb α -tocoferol sobre el sistema dopaminèrgic i serotoninèrgic de l'estriat

Durant l'envelliment s'ha observat una disminució de la neurotransmissió dopaminèrgica en l'estriat (Ponzio et al., 1982; Giorgi et al., 1987; Stoessl et al., 1989; Marshall i Rosenstein, 1990), modificació que es pot veure implicada en alteracions motores i cognitives observades en individus vells (Murray i Waddington, 1991). No s'han evidenciat les possibles causes de la disminució dels nivells de DA però algunes de les propostes són la pèrdua neuronal, amb una mitjana de 3% per dècada en la substància negra (Fearnly et al., 1991), pèrdua de sinapsis (Colman et al., 1997; Mora et al., 2007), o bé pèrdua específica de proteïnes de les neurones (Mesco et al., 1993).

En aquest estudi, el sistema dopaminèrgic ha estat analitzat amb més profunditat a l'estriat que a l'hipocamp, ja que, tal i com es mencionà a la introducció, una de les tres rutes d'aquest sistema és la nigro-estriatal, en la qual, els axons que la formen desemboquen a l'estriat (nuclis caudat i putamen). De fet, aquest conté un 80% de tota la DA cerebral (Weiner i Molinoff, 1989). No obstant, en avançades edats i en absència de trastorns neurològics, els nivells de DA i de neurones amb DA del mesencèfal, on s'hi troba la substància negra, disminueix fins a un 50% (Morgan et al., 1987).

La quantitat de DOPA observada en el present estudi és el resultat de l'acció de la tirosina hidroxilasa. Però, a més, cal tenir en compte que la DOPA-descarboxilasa s'ha vist inhibida durant la darrera mitja hora de vida del subjecte, de manera que la quantitat de DOPA reflexa el total de DOPA acumulat en mitja hora, ja que cap fracció d'aquesta ha pogut ser metabolitzada a DA. S'ha observat un augment significatiu de DOPA en l'estriat de rates tractades amb α -tocoferol (amb ambdues dosis) respecte del grup control. Tal augment de DOPA equivaldrà a un augment de la síntesi DA ja que l'enzim DOPA-descarboxilasa no és l'enzim limitant, de manera que l'acumulació de DOPA dependrà directament de l'activitat de la tirosina hidroxilasa, que sí que és el limitant.

Tot i l'augment del precursor de la DA, DOPA, no s'ha observat un augment del contingut d'aquesta monoamina a l'estriat.

El metabòlit principal de la DA en el cervell de rata és el DOPAC, mentre que en el de primats és l'HVA, de manera que la formació de DOPAC pot ser utilitzada com a indicador

de l'activitat dopaminèrgica en rata (Cooper, 1996). Molts d'estudis han confirmat la disminució de l'HVA amb l'edat (McCormack et al., 2004), així com també en el putamen i caudat de micos d'avançada edat, tot i que no s'han detectat diferències per a la relació HVA/DA (Collier et al., 2007). En el present estudi, l'administració d'alfa-tocoferol ha suposat contrarestar l'efecte característic de l'envelliment, ja que ha desencadenat un augment significatiu dels metabòlits de la DA en l'estriat: DOPAC, per una dosi d'alfa-tocoferol de 40+60mg/kg/dia, i HVA quan la dosi administrada va ser de 20mg/kg/dia. Tenint en compte que els metabòlits dels neurotransmissors es generen quan aquests són alliberats a l'espai sinàptic i posteriorment degradats, l'augment dels metabòlits DOPAC i HVA pot ser conseqüència de la transmissió d'estímul nerviós i sinapsis en les terminals nervioses que s'estudien. Aquest augment dels metabòlits explicaria perquè els nivells de DA no augmenten tot i fer-ho els de DOPA.

Resumint, l'alfa-tocoferol ha suposat un augment de la síntesi de DA, ja que s'ha produït un increment dels nivells de DOPA. Les rates tractades amb aquest antioxidant han presentat major activitat dopaminèrgica, reflectida en un increment dels metabòlits DOPAC i HVA.

El sistema serotoninèrgic ha estat estudiat tant a l'hipocamp com a estriat, ja que les cèl·lules serotoninèrgiques es troben agrupades en 7 nuclis principals, dels quals neixen fibres que desemboquen, entre d'altres regions, a l'hipocamp i ganglis basals (putamen, caudat i globus pàl·lid) (Nestler et al., 2001).

L'etapa limitant de la ruta de síntesi de la 5-HT és la hidroxilació del triptòfan, catalitzada per la triptòfan hidroxilasa, de manera que aquest enzim és molt important per a la correcta neurotransmissió d'aquesta monoamina (Strüder et al., 2001; Fernstrom et al., 1972). Així, una disminució de l'activitat o quantitat d'aquest enzim es veu reflectida en una conseqüent reducció dels nivells de 5-HT intraneuronal i generalment també de 5-HIAA (el principal metabòlit de la 5-HT), tal i com s'ha determinat prèviament en rates envellides (Esteban et al., 2010) i coloms anillats (Garau et al., 2006). En aquest estudi, l'activitat del triptòfan hidroxilasa es pot fer visible observant l'acumulació que es dona durant 30 minuts *in vivo* de 5-HTP, gràcies a la inhibició de l'enzim que s'encarrega de catalitzar la conversió d'aquest a 5-HT, és a dir, l'enzim L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa. La hipòtesi inicial plantejava un augment de la 5-HT en l'estriat com a resultat de l'administració de l'alfa-tocoferol, i com a mecanisme per a contrarestar l'efecte de l'envelliment i les conseqüències esmentades. No obstant, en l'estriat no s'ha observat l'augment significatiu de 5-HTP, 5-HT ni HIAA.

6.4. Efecte de l'envelliment i del tractament amb α -tocoferol sobre el sistema noradrenèrgic i serotoninèrgic de l'hipocamp.

Com s'ha comentat a la introducció, la NA es sintetitza a partir de la DA principalment en neurones del *locus coeruleus*, els axons de les quals es dirigeixen al cerebel, medulla espinal, hipocamp, tàlem i escorça cerebral (Vera, 2005). És per això que la síntesi de la NA ha estat estudiada únicament a l'hipocamp i no en estriat. El precursor de la NA que ha estat estudiat en aquest treball és la DOPA. S'ha observat un augment significatiu de la DOPA en l'hipocamp de rata, suggerint també una major activitat i/o quantitat de la tirosina hidroxilasa en aquesta regió. L'augment de DOPA permet explicar l'increment del contingut de NA que s'ha donat en hipocamp. El catabolisme de la NA no ha pogut ser estudiat degut a les limitacions metodològiques de la tècnica HPLC.

Alguns estudis han demostrat que la tirosina hidroxilasa de l'estriat de rata presenta una disminució de la seva activitat amb l'edat (Ponzio et al., 1982). Aquests resultats es troben recolzats pel declivi del nombre de neurones de la substància negra (Sabel i Stein, 1981). A més, també s'ha demostrat la seva inhibició mitjançant l'oxidació (De la Cruz et al., 1996; Borges et al., 2002) i se l'ha considerat un enzim propens a l'oxidació (Friedman et al. 1972). Així, l'alfa-tocoferol, podria actuar en primer nivell realitzant la funció bàsica com a antioxidant i impeding la inactivació de la tirosina hidroxilasa.

A diferència dels resultats obtinguts en l'estriat, a l'hipocamp d'individus tractats amb α -tocoferol 20mg/kg/dia sí que s'ha observat un increment dels nivells de 5-HTP respecte dels pertanyents a individus control. Aquest increment revela un augment de l'activitat de l'enzim limitant, suggerint l'agilització de la ruta de síntesi de 5-HT. El tractament d' α -tocoferol 40mg/kg/dia sembla exercir una tendència a augmentar els nivells de 5-HTP, però que no s'arriba a fer significativa degut a la dispersió de les dades. Tot i l'augment significatiu del contingut de 5-HTP, no s'ha vist que sigui suficient com per incrementar els nivells de 5-HT ni 5-HIAA.

Estudis centrats amb la triptòfan hidroxilasa han revelat un augment de la seva activitat en rates madures respecte joves, però també una posterior disminució de l'afinitat pel seu substrat de quasi 7 vegades en el mesencèfal en rates velles respecte madures (Hussain et al., 2000). S'ha proposat que aquest comportament oscil·latori pot ser el resultat de variacions en la fosforilació d'aquest enzim (Hussain et al., 2000), duta a terme per la proteïna quinasa A (Johansen et al., 1996) i proteïnes kinases dependents de calci-calmodulina (Furukawa et al., 1992). Aquesta hipòtesi es troba recolzada pels estudis que demostren una disminució amb l'edat del contingut de calmodulina en varies regions del cervell (Teolato et al., 1983), així com de l'activitat de l'adenilat ciclasa, que conseqüentment activa la proteïna quinasa A (Hoskins et al., 1986). A més de la disminució dels nivells de 5-HT que es donen amb l'edat, cal esmentar la reducció del nombre de llocs d'unió d'aquesta monoamina en el lobus frontal, occipital i hipocamp (Arranz et al., 1993; Cheetham et al., 1988), fet que probablement contribueixi als efectes causats per la manca de funció de la 5-HT.

Així, tant en hipocamp com en estriat s'ha observat un major efecte beneficiós sobre el sistema catecolaminèrgic que sobre el serotoninèrgic. L'elevada sensibilitat que s'ha demostrat que presenta la triptòfan hidroxilasa davant el dany oxidatiu podria explicar perquè el sistema dopaminèrgic i noradrenèrgic presenten un major benefici quan són sotmesos al tractament amb α -tocoferol que el que ho fa el sistema serotoninèrgic.

Davant els resultats bioquímics obtinguts en aquest estudi, es pot pensar que la vitamina E desencadena d'alguna manera un augment de la quantitat o activitat de tirosina hidroxilasa i triptòfan hidroxilasa, millorant les vies de síntesi principalment dopaminèrgica i, en menor mesura, serotoninèrgica. Com ja s'ha vist en la introducció la influència de l' α -tocoferol sobre la transcripció de varis gens vinculats amb l'estrès oxidatiu, proliferació, inflamació i apoptosi (Mocchegiani et al., 2014), no es pot descartar que també actuï a nivell de l'expressió dels gens que codifiquen per la tirosina i triptòfan hidroxilases o bé dels gens que els regulen. No obstant, és més probable que l'efecte beneficiós del tractament amb α -tocoferol sigui o bé degut a un efecte protector front al declivi de la quantitat de neurones característic de l'envelliment o bé com a conseqüència de modificacions post-transcripcionals que modulin la seva activitat, com fosforilacions.

Cal mencionar que en general s'ha obtingut una major dispersió de dades, resultant en major error estadístic, en el tractament 40+60mg/kg/dia que en el 20mg/kg/dia. Es proposen dues hipòtesis per a tal efecte. La primera postula que pot deure's a diferències causades per error dins el grup experimental, ja siguin gèniques per mescla de camades, o bé fisiològiques. La segona defensa que l' α -tocoferol podria exercir diferents efectes, i que alguns predominen a baixes dosis i d'altres a elevades.

6.5. Correlació entre els resultats cognitius i bioquímics de rates sotmeses al tractament amb α -tocoferol

El progressiu deteriorament en les funcions motora i mental que es dona amb l'edat pot comprometre l'habilitat de l'individu envellit a mantenir un estil de vida independent i actiu (Cruz-Sánchez et al., 1997). Com que l'activitat locomotora exploratòria involucra el sistema monoaminèrgic (Esteban, 2010), els esmentats resultats comportamentals recolzen els bioquímics.

Els processos d'aprenentatge i memòria es troben parcialment regulats per l'activitat de la 5-HT i DA (González-Burgos et al., 2008), sent l'hipocamp i l'estriat les regions del cervell involucrades en la regulació del processament de la memòria en adults (González-Burgos et al., 2008; Adams et al., 2008).

Una de les conseqüències de l'envelliment és el dèficit cognitiu que es manifesta, per exemple, en el deteriorament en l'aprenentatge (Forster et al., 1994). Relacionat amb el sistema monoaminèrgic, l'exhauriment de DA en el prosencèfal provoca un deteriorament en la memòria de treball (Brozoski et al., 1979), mentre que la concentració cortical de DA s'ha correlacionat negativament amb el nombre d'errors efectuats en la tasca d'alternança del t-maze test (Sahakian et al., 1985). A més, estudis realitzats sobre ratolins transgènics que sobreexpressen el gen de la tirosina hidroxilasa han reportat una activitat locomotora augmentada (Söderpalm et al., 1999). Recolzant el paper de la DA, un altre estudi ha posat de manifest que la reducció de DA en l'estriat associada a l'edat, contribueix a la interrupció de la funció motora (McNeill et al., 1984). Per altra banda, durant la memòria de treball augmenta la 5-HT alliberada en l'estructura aviar anàloga al còrtex prefrontal de mamífers (Krakuyu et al., 2007). A més, s'ha suggerit que la reducció de NA cortical associada a l'edat es troba associada amb dèficits en l'aprenentatge espacial i memòria en rates velles (Collier et al., 2004).

Aquesta bibliografia recolza l'efecte positiu que suposa la millora dels sistemes dopaminèrgic i noradrenèrgic sobre l'execució de tasques cognitives, podent ser conseqüència del tractament amb l' α -tocoferol. La DA destaca pel seu paper controlant activitats cognitives, principalment funcions executives, com la planificació, memòria temporal, atenció o flexibilitat mental (Cools et al., 2002), així com també l'activitat motora (Fibiger, 1993). Per això, es pot adjudicar a l'augment de DOPA, en estriat i hipocamp provocat pel tractament d' α -tocoferol (20 i 40+60), com a responsable parcial de la millora cognitiva mencionada.

En el present estudi, la millora en l'execució de la prova del *Radial Maze* després del tractament amb α -tocoferol es troba en correlació amb l'augment de monoamines observat en hipocamp i estriat. Així, sembla que la millora principalment del sistema dopaminèrgic i noradrenèrgic i, en menor mesura, serotoninèrgic, de l'hipocamp i estriat participa en els efectes comportamentals induïts per l' α -tocoferol.

Aquests resultats suposen un avenç en el coneixement dels efectes de l' α -tocoferol sobre les catecolamines estudiades, els quals es poden enfocar cap a futures teràpies per a la prevenció o retràs del deteriorament cognitiu i motor associat a l'envelliment natural o a malalties neurodegeneratives. No obstant, es requereixen més estudis per dilucidar els mecanismes d'acció de l' α -tocoferol i les possibilitats d'aplicar-ho a tractaments en humans.

7. CONCLUSIONS

1. L'envelliment de rates suposa una reducció dels sistemes dopaminèrgic, noradrenèrgic i serotoninèrgic en hipocamp i estriat, en concordança amb estudis previs.
2. El tractament crònic amb α -tocoferol (20mg/kg/dia i 40mg/kg/dia) suposa la millora de la memòria de treball de rates velles respecte del grup control, considerada en base a la reducció del nombre d'errors i del temps necessari per a completar la prova del *Radial Maze*.
3. El tractament crònic amb α -tocoferol (20mg/kg/dia i 40mg/kg/dia) suposa un augment significatiu de la síntesi de DA a l'estriat, en base a l'augment d'acumulació de DOPA.
4. El tractament crònic amb α -tocoferol (20mg/kg/dia i 40mg/kg/dia) evidencia un augment significatiu de la síntesi de NA, en base a l'augment d'acumulació de DOPA, i del contingut total de la mateixa a l'hipocamp.
5. El tractament crònic amb α -tocoferol (20mg/kg/dia) implica un increment significatiu de la síntesi de 5-HT a l'hipocamp, en base a l'augment d'acumulació de 5-HTP.
6. Els resultats obtinguts a nivell cognitiu i bioquímic conclouen l'existència d'una correlació entre l'efecte beneficiós que exerceix el tractament amb α -tocoferol sobre la memòria de treball i sobre els sistemes catecolaminèrgics en estriat i hipocamp.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adams W., Kusljic S., Van den Buuse M. (2008) Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: effects on locomotor hyperactivity, prepulse inhibition and learning and memory. *Neuropharmacology*. 55:1048-1055
- Alvarez V.A. i Sabatini B.L. (2007). Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*. 30:79-97
- Arranz B., Eriksson A., Mellerup E., Plenge P., Marcusson J. (1993). Effect of aging in human cortical pre- and postsynaptic serotonin binding sites. *Brain Res*. 620:163-166
- Azzi, A., Gysin, R., Kempna, P., Munteanu, A., Negis, Y., Villacorta, L., Visarius, T., Zingg, J.M. (2004). Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1031:86-95.
- Bäckman L., Nyberg L., Lindenberger U., Li S.C., Farde L., (2006). The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: current status and future prospects. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 30, 791-807
- Barja G. (2005). Relación entre el estrés oxidativo mitocondrial y la velocidad del envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 40:243-9
- Battilana G.A. Teoría de los Radicales Libres y el Envejecimiento: Rol de la Mitocondria. Academia Nacional de Medicina de Lima-Perú. Disponible en: <http://www.acadnacmedicina.org.pe/actualidad28.html>
- Bishop N.A., Tao L., Yankner B.A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 464: 529-53
- Borges, C.R.; Geddes, T.; Watson, J.T.; Kuhn, D.M. (2002). Dopamine biosynthesis is regulated by S-glutathionylation. Potential mechanism of tyrosine hydroxylase inhibition during oxidative stress. *J. Biol. Chem*. 277:8295-48302
- Brandon NC, Llanos IC, Ruiz DA, Rodriguex AN (2010). Hormonas Catecolamínicas Adrenales. Universidad Nacional del Nordeste
- Brozowski T.J., Brown R.M., Rosvold H.E., Goldman P.S. (1979) Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science*. 205:929-932
- Burton, G.W., Cheng, S.C., Webb, A., Ingold, K.U. (1986). Vitamin E in young and old human red blood cells. *Biochem. Biophys. Acta* 860:84-90.
- Cheetham S., Crompton M., Katona C., Horton R. (1988). Brain 5-HT₂ receptor binding sites in depressed suicide victims. *Brain Res*. 443:272-280
- Clapp NK, Satterfield LC, Bowles ND. (1979) Effects of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) on mortality in BALB/c mice. *J Gerontol*. 34: 497-501.
- Claycombe, K.J., Meydani, S.N. (2001). Vitamin E and genome stability. *Mutat. Res*. 475:37-44.
- Collier T.J., Lipton J., Daley B.F., Palfi S., Yaping C., Sortwell C., Bakay R.A.E., Sladek J.R., Kordower J.H. (2007) Aging-Related Changes in the Nigrostriatal Dopamine System and the Response to MPTP in Nonhuman Primates: Diminished Compensatory Mechanisms as a Prelude to Parkinsonism. *Neurobiol Dis*. 26:56-65.
- Collier T.J., Greene J.G., Felten D.L., Stevens S.Y., Collier K.S. (2004). Reduced cortical noradrenergic neurotransmission is associated with increased neophobia and impaired spatial memory in aged rats. *Neurobiol Aging*. 25:209-221
- Colman, H., Nabekura, J., Lichtman, J. W (1997). Alterations in synaptic strength. *Science*. 275:356-361
- Cools R, Stefanova E, Barker R, Robbins T.W., Owen A.M. (2002). Dopaminergic modulation of high-level cognition in Parkinson's disease: the role of prefrontal cortex revealed by PET. *Brain*. 125: 584-594
- Cooper R.J., Bloom F.E., Roth R.H. (1996). The biochemical basis of neuropharmacology. *University Press*. 293-351
- Cote L. i Crutcher M.D. (1991). The basal ganglia. Principles of neural science. *Prentice-Hall International, Inc*. 647-659
- Crespo-Santiago D. i Fernández-Viadero C. (2012) Cambios cerebrales en el Envejecimiento Normal y Patológico. *Revista Neuropsiquiatría y Neurociencias*. 12:21-36
- Cruz-Sánchez F.F., Cardozo A., Castejón C., Tolosa E, Rossi M.L. (1997) Aging and the nigro-striatal pathway. *J Neural Transm*. 51:9-25
- De la Cruz C.P., Revilla E., Venero J.L., Ayala A., Cano J., Machado A. (1996). Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. *Free Radic Biol Med*. 20:53-61
- Enesco HE, Verdones-Smith C. (1980) α -Tocopherol increases lifespan in the rotifer *Philodina*. *Exp Gerontol*. 15:335-8.
- Engelhart, M.J., Geerlings, M.I., Ruitenberg, A., van Swieten, J.C., Hofman, A., Witteman, J.C., Breteler, M.M. (2002). Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 287:3223-3229.
- Epe, B (1996). DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 127: 223-249
- Esteban S., Garau C., Aparicio S., Moranta D., Barceló P., Fernández-Tresguerres J.A., Rial R., (2010). Improving Effects of Long-Term Growth Hormone Treatment on Monoaminergic Neurotransmission and Related Behavioral Tests in Aged Rats. *Rejuvenation Research*. 1-11
- Fearnley, J. M., Lees, A. J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra 37 regional selectivity. *Brain*. 114: 2283-2301
- Feldman R.S., Meyer J.S., Quenzer L.F. (1997). Principles of neuropsychopharmacology. *Sunderland, Sinauer*. 277-344
- Fernstrom J.D., Wurtman R.J. (1972). Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science*. 178:414-416
- Fibiger G.C. (1993). Mesolimbic dopamine: an analysis of its role in motivated behavior. *Semin Neurosci*. 5:321-27
- Finch C.E. i Roth G.S. (1999) Biochemistry of aging. In: Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects. *Lippincott-Raven Publishers*, Philadelphia, p. 613-633
- Finch, C.E. (1978). Age-related changes in brain catecholamines: A synopsis of findings in C57BL/6J mice and other rodent models. *Adv. Exp. Med. Biol*. 113:15-39
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol*. 15:247-254.
- Fisher W, Chen KS, Gage FH, Bjorklund A (1992) Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rat during aging. *Neurobiol Aging* 13: 9-23.
- Forster M.J., Dubey A., Dawson K.M., Stutts W.A., Lal H., Sohal R.S. (1994) Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:4765-4769.
- Frank, J., Chin, X.W., Schrader, C., Eckert, G.P., Rimbach, G. (2012). Do tocotrienols have potential as neuroprotective dietary factors? *Ageing Res. Rev*. 11:163-180.
- Friedman P., Kappelman A., Kaufman S. (1972). Partial purification and characterization of tryptophan hydroxylase from rabbit hindbrain. *J Biol Chem*. 247:4165-4273.
- Furukawa Y., Ikuta N., Omata S., Yamuchi T., Isobe T., Ichimura T. (1993) Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 194:144-149

- **Garau C., Aparicio S., Rial R., Nicolau M.C., Esteban S.** (2006). Age-related changes in circadian rhythm of serotonin synthesis in ring doves: Effects of increased tryptophan ingestion *Experimental Gerontology* 41:40–48.
- **Gerschman R.** (1962). Man's dependence on the earthly atmosphere. Proc 1st Symp Submarine and Space Medicine. *MacMillan: New York*. P. 475.
- **Gey K.F., Puska P., Jordan P., Moser U.K.** (1991) Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 53:326S-34S
- **Giorgi O., De Montis G., Porceddu M.L., Mele S., Calderini G., Toifano G., Biggio G.** (1987). Developmental and age-related changes in D1-dopamine receptors and dopamine content in the rat striatum. *Dev. Brain Res.* 35:283-29
- **Godefroy F., Bassant M.H., Weil-Fugazza J., Lamour Y.** (1989) Age-related changes in dopaminergic and serotonergic indices in the rat forebrain. *Neurobiol Aging* 10:187-190
- **Gonzalez-Burgos I, Feria-Velasco A.** (2008). Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res.* 172:603-623
- **Goodman, Y., Mattson, M.P.** (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp. Neurol.* 128:1–12.
- **Goudsmit, E.; Feenstra, M.G.; Swaab, D.F.** (1990). Central monoamine metabolism in the male Brown-Norway rat in relation to aging and testosterone. *Brain Res. Bull.* 25:755-763
- **Harik S.I., Mc Cracken K.A.** (1986) Age-related increase in presynaptic noradrenergic markers of the rat cerebral cortex. *Brain Res* 381: 125-130
- **Harman D.** (1956) A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11:298-300.
- **Harman, D.** (1972) The biologic clock: The mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 20:145–147.
- **Harman, D.** (1993) Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Aging.* 3:60-80
- **Harrington, L.A., Harley, C.B.** (1988). Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 43:71–78.
- **Hayflick L.** (1985). Theories of biological aging. *Exp Gerontol.* 20:145-59.
- **Hoskins B., Ho I.** (1986) Effects of maturation and aging on calmodulin and calmodulin regulated enzymes in various regions of mouse brain. *Mech Ageing Dev.* 36:173-186
- **Hussain A.M. i Mitra A.K.** (2000). Effects of aging on tryptophan hydroxylase in rat brain: implications on serotonin level. *Drug Metabolism and Disposition.* 28: 1038-1042
- **Jackson D.M., Westlind-Danielsson A.** (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther.* 6:291-369
- **Johansen P., Jennings I., Cotton R., Kuhn D.** (1993). Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase by endogenous protein kinase A. *J Neurochem.* 66:817-823
- **Joseph J.A., Dalton T.K., Hunt W.A.** (1988). Age-related decrements in the muscarinic enhancement of K⁺-evoked release of endogenous striatal dopamine: an indicator of altered cholinergic-dopaminergic reciprocal inhibitory control in senescence. *Brain Res.* 454:140-148
- **Kaga, E., Karademir, B., Baykal, A.T., Ozer, N.K.** (2013). Identification of differentially expressed proteins in atherosclerotic aorta and effect of vitamin E. *J. Proteomics* 92:260–273
- **Karakuyu S., Herold C., Gunturkun O., Diekamp B., Kaul N., Forman H.J.** (2007). Differential increase of extracellular dopamine and serotonin in the 'prefrontal cortex' and striatum of pigeons during working memory. *Eur J Neurosc.* 26:2293–2302
- **Kaul, N.; Forman, H.J.** (2000) Reactive Oxygen Species in Physiology and Toxicology: From Lipid Peroxidation to Transcriptional Activation; *Rhodes, C.R.* P. 310–335.
- **Kish, S.J., Zhong, X.H., Hornykiewicz, O., Haycock, J.W.,** (1995). Striatal 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase in aging: disparity between postmortem. *Annals of Neurology.* 38: 260-264
- **Kohn RR.** (1971) Effect of antioxidants on life-span of C57BL mice. *J Gerontol.* 26:378-80.
- **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.* 64: 131-142
- **Kuhar, Couceyro, Lambert** (1999). Catecholamines, Chapter 12. Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects. *Raven Press.* P.243-261
- **Kumar H., Lim H-W., More S.V., Kim B-W., Koppula S., Kim I.S, Choi D-K.** (2012) The Role of Free Radicals in the Aging Brain and Parkinson's Disease: Convergence and Parallelism. *International Journal of Molecular Sciences.* 13:10478-10504
- **Landfield P.W., Eldridge J.C.** (1994). Evolving aspects of the glucocorticoid hypothesis of brain aging: hormonal modulation of neuronal calcium homeostasis. *Neurobiol Aging.* 15:579-588.
- **Ledvina M, Hodánová M.** (1980). The effect of simultaneous administration of tocopherol and sunflower oil on the life-span of female mice. *Exp Gerontol.* 15:67-71.
- **Leslie FM, Luoghin SE, Strenberg DB, Mc Gangh JL, Young LE, Zornetzer SF** (1985) Noradrenergic changes and memory loss in aged mice. *Brain Res* 359: 292-299.
- **Lin, M.T., Beal, M.F.** (2006). Alzheimer's APP mangles mitochondria. *Nat. Med.* 12:1241–1243.
- **Liochev, S.I.** (2013) Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic. Biol. Med.* 60:1-4
- **Lirangi, M., Meydani, M., Zingg, J.M., Azzi, A.** (2012). α -Tocopheryl-phosphate regulation of gene expression in preadipocytes and adipocytes. *Biofactors* 38:450–457.
- **Lu T. i Finkel T.** (2008). Free radicals and senescence. *Experimental Cell Research,* 314:1918-1922.
- **Machado A, Cano J, Santiago M** (1986) The change with age in biogenic amines and their metabolites in the striatum of the rat. *Arch Gerontol Geriatry* 5: 333-342.
- **Malgor L.A., Valsecia M.E.** (2000). Farmacología médica.
- **Mandavilli, B.S., Santos, J.H., Van Houten, B.** (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat. Res.* 509: 127–151.
- **Mangialasche, F., Kivipelto, M., Mecocci, P., Rizzuto, D., Palmer, K., Winblad, B., Fratiglioni, L.** (2010). High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age. *J. Alzheimers Dis.* 20:1029–1037.
- **Marshall J.F. i Rosenstein A.J.** (1990). Age-related decline in rat striatal dopamine metabolism is regionally homogeneous. *Neurobiol Aging.* 11:131-137
- **McCormack AL, Di Monte DA, Delfani K, Irwin I, DeLanney LE, Langston WJ, Janson AM.** (2004) Aging of the nigrostriatal system in the squirrel monkey. *J Comp Neurol.* 471:387–395
- **McEntee W. J., Crook T. H.** (1991). Serotonin, memory, and the ageing brain. *Psychopharmacology* 103: 143–149
- **McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG** (1987). Molecular neurobiology of the mammalian brain. *Plenum Press.* 265-317
- **McNeill T.H., Koek L.L., Haycock J.W.** (1984). The nigrostriatal system. *Peptides.* 5:263-268
- **Medvedev Z.A.** (1990). An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev.* 65:375-98.

- **Meek J, Bertilsson L, Cheney D, Zsilla G i Costa E** (1977). Aging-induced changes in acetylcholine and serotonin content of discrete brain nuclei. *J Gerontol.* 32:129-131
- **Mesco E. R., Carlson S. G., Joseph J. A., Roth G. S.** (1993). Decreased striatal D2 dopamine receptor mRNA synthesis during aging. *Brain Res Mol Brain Res*, 17:160-162
- **Meydani, M.** (1995). Vitamin E. *Lancet* 345:170–175.
- **Meydani, M., Macauley, J.B., Blumberg, J.B.** (1988). Effect of dietary vitamin E and selenium on susceptibility of brain regions to lipid peroxidation. *Lipids* 23:405–409.
- **Miguez JM, Aldegunde M, Paz-Valinas L, Recio J, Sanchez-Barcelo E** (1999) Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *J Neural Transm* 106: 1089-1098
- **Minot C.S.** (1097). The problem of age, growth and age. *Pop Sci Monthly.* 71:509-27.
- **Miquel J.** (2005). Integración de teorías del envejecimiento . *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 41:125-7
- **Mocchegiani E., Costarelli L., Giacconi R., Malavolta M., Basso A., Piacenza F., Ostan R., Cevenini E., Gonos E.S., Franceschi C., Monti D.** (2014) E-gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: Implications for treatment. A systematic review. *Ageing Research Reviews* 14:81–101
- **Molinoff P.B., Weinschilboum R., Axelrod J.** (1971). A sensitive enzymatic assay for dopamine-hydroxylase. *J Pharmacol Exp Ther.* 178:425-431
- **Monji, A., Morimoto, N., Okuyama, I., Yamashita, N., Tashiro, N.** (1994). Effect of dietaryvitamin E on lipofuscin accumulation with age in the rat brain. *Brain Res.* 634:62–68.
- **Mora, F., Segovia, G., & del Arco, A.** (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev*, 55:78-88
- **Moretti A, Carfagna N, Trunzo F** (1987) Effect of aging on monoamines and their metabolites in the rat brain. *Neurochem Res* 12: 1035-1039
- **Morgan D.G., May P.C., Finch C.E.** (1987). Dopamine and serotonin. *J. Am. Geriatr Soc.* 35:334-345
- **Morgan DG, May PC** (1990) Age-related changes in synaptic neurochemistry. In: Hadbook of the biology of aging. *Academic Press, New York*, p. 219-254.
- **Morris, M.C.** (2012). Nutritional determinants of cognitive aging and dementia. *Proc.Nutr. Soc.* 71:1–13.
- **Munteanu, A., Zingg, J.M., Ogru, E., Libinaki, R., Gianello, R., West, S., Negis, Y., Azzi, A.**(2004). Modulation of cell proliferation and gene expression by alpha-tocopherylphosphates: relevance to atherosclerosis and inflammation. *Biochem. Biophys.Res. Commun.* 318, 311–316.
- **Murray A.M. i Waddington J.L.** (1991) Age-related changes in the regulation of behavior by D-1:D-2 dopamine receptor interactions. *Neurobiol Aging.* 12:431-435
- **Nagtsu T., Levitt M., Udenfriend S.,** (1964). Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239:2910-2917
- **Navarro, A., Gomez, C., Sanchez-Pino, M.J., Gonzalez, H., Bandez, M.J., Boveris, A.D., Boveris, A.**(2005). Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am. J. Physiol.Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1392–R1399.
- **Nestler E, Hyman S, Malenka R** (2001). Mood and emotion, Chapters 8, 9 i 15. Molecular Neuropharmacology. *McGraw-Hill.* P. 167-190; 191-200; 327-354
- **Niki, E., Traber, M.G.** (2012). A history of vitamin E. *Ann. Nutr. Metab.* 61:207–212.
- **Orgel LE.** (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 49:517-21.
- **Pae, M., Meydani, S.N., Wu, D.** (2012). The role of nutrition in enhancing immunity in aging. *Aging Dis.* 3:91–129.
- **Park D.C. i Reuter-Lorenz P.** (2009). The adaptative brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol.* 60:173-196
- **Pearl R.** (1928). The rate of living. *London: University of London Press.* P.50
- **Ponzio F, Brunello N, Algeri S.** (1978). Catecholamine synthesis in brains of aging rats. *J Neurochem* 30: 1617-1620.
- **Ponzio F., G. Calderini, G. Lomuscio, G. Vantini, G. Toffano, S. Algeri.** (1982). Changes in monoamines and their metabolite levels in some brain regions of aged rats. *Neurobiol Aging* 3:23-29 (1982)
- **Porta EA, Joun NS, Nitta RT.**(1980) Effects of the type of dietary fat at two levels of vitamin E in Wistar male rats during development and aging. I. Lifespan, serum biochemical parameters and pathological changes. *Mech Ageing Dev.* 13:1-39
- **Pradhan, S.N.** (1980). Central neurotransmitters and aging. *J. Neurochem.* 30:1617-1620
- **Rhee, S.G.** (1999) Redox signaling: Hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* 31:53–59.
- **Rimbach, G., Moehring, J., Huebbe, P., Lodge, J.K.** (2010). Gene-regulatory activity of alpha-tocopherol. *Molecules* 15:1746–1761.
- **Rose G.M., Gerhard G.A., Conboy G.L., Hoffer B.J.** (1986). Age-related alterations in monoamine release form rat striatum: an in vivo electrochemical study. *Neurobiol Aging* 7:77
- **Sabel B.A., Stein D.G.** (1981) Extensive loss of subcortical neurons in the aging rat brain. *Experimental Neurology.* 73:507-516
- **Sahakian B.J., Sarna G.S., Kantamaneni B.D., Jackson A., Huston P.H., Curzon G.** (1985) Association between learning and cortical catecholamines in non-drugtreated rats. *Psychopharmacology.* 86:339-343
- **Schmidt A.M., Hori O., Brett J., Yan S.D., Wautier J.L., Stern D.** (1994) Cellular receptors for advanced glycation end products. *Arterioscler. Thromb.* 14:1521-1528.
- **Shock N.** (1957). Age changes in some physiologic processes. *Geriatrics.* 12:40-48
- **Sirvio J, Lahtinen H, Riekkinen P Jr, Riekkinen P** (1994) Spatial learning and noradrenaline content in the brain and periphery of young and aged rats. *Exp Neurol* 125: 312-315.
- **Söderpalm B., Ericson M., Bohlooly M., Engel J.A., Törnell J.** (1999). Bovine growth hormone transgenic mice display alterations in locomotor activity and brain monoamine neurochemistry. *Endocrinology.* 140:5619-5625
- **Sohal, R.S. i Orr, W.C.** (2011) The redox stress hypothesis of aging. *Free Radical Biology & Medicine.* 15:564-587
- **Sparks D., Markesbery W. and Slevin J.** (1985). Age-associated alteration of serotonergic synaptic. *Neurobiol Aging.* 6:213-217.
- **Stoessl A.J., Martin-Iverson M.T., Barth T.M., Dourish C.I., Iversen S.D.** (1989). Effects of ageing on the behavioural responses to dopamine agonists: decreased yawning and locomotion, but increased stereotypy. *Brain Res.* 496:20-30
- **Strehler B.L., Mark D.D., Mildvan A.S.** (1959). GEE MV: Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium. *J Gerontol.* 14:430-439
- **Strong R, Samorajski T, Gottesfeld Z** (1984) High-affinity uptake of neurotransmitters in rat neostriatum effects of aging. *J Neurochem* 43: 1766-1768.

- **Strüder HK, Weicker H.** (2001). Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance. Part I. *Int J Sports Med.* 22:467–481
- **Tarragon E., Lopez L., Ros-Bernal F., Yuste J.E., Ortiz-Cullera V., Martin E., Schenker E., Aujard F., Bordet R., Richardson J.C., Herrero M.T.** (2012). The Radial Arm Maze (RAM) for the Evaluation of Working and Reference Memory Deficits in the Diurnal Rodent *Octodon degus*. *Proceedings of Measuring Behavior.* P98-100.
- **Teolato S., Calderini G., Bonetti A., Toffano G.** (1983). Calmodulin content in different brain areas of aging rats. *Neurosci Lett.* 38:57-60
- **Timiras PS, Hudson DB, Miller C** (1982). Developing and aging brain serotonergic systems. In: The aging brain: cellular and molecular mechanisms of aging in the central nervous system. *Raven Press, New York*, 20:173-184.
- **Tiwari, V., Kuhad, A., Bishnoi, M., Chopra, K.** (2009). Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative-nitrosative stress in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93:183–189.
- **Turrens JF.** (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552:335-344
- **Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160:1–40.
- **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
- **Villanueva, C., Kross, R.D.** (2012) Antioxidant-induced stress. *Int. J. Mol. Sci.* 13:2091-2109
- **Vina, J., Borras, C., Mohamed, K., Garcia-Valles, R., Gomez- Cabrera, M.C.** (2013). The free radical theory of ageing revisited. The cell signaling disruption theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.* 19:779-787
- **Viña J., Borras C., Miquel J.,** (2007). Theories of ageing. *IUBMB Life.* 59:249-254
- **Zingg, J.M., Han, S.N., Pang, E., Meydani, M., Meydani, S.N., Azzi, A.** (2013). *In vivo* regulation of gene transcription by alpha- and gamma-tocopherol in murine T lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 538:111–119.
- **Zorov, D.B.** (1996). Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: a strategy of how to fight these. *Biochim. Biophys. Acta.* 1275: 10-15
- **Weiner D.B., Kokai Y., Wada T., Cohen J.A., Williams W.V., Greene M.I.,** (1989). Linkage of tyrosine kinase activity with transforming ability of the p185neu oncoprotein. *Oncogene.* 4:1175-1183
- **Weiner N., Molinoff P.B.** (1989). Storage and release of catecholamines. In: Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects. *New York: Raven.* 236–239. A19