



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

EFFECTOS DE LA CERVEZA EN EL DESARROLLO COGNITIVO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Tatiana Carranza Lozada

Máster Universitario en Neurociencias

Centro de Estudios de Postgrado

Año Académico 2020-21

EFFECTOS DE LA CERVEZA EN EL DESARROLLO COGNITIVO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Tatiana Carranza Lozada

Trabajo de Fin de Máster

Centro de Estudios de Postgrado

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2020-21

Palabras clave del trabajo:

Cerveza, deterioro cognitivo, demencia, envejecimiento, alcohol, cerebro, polifenoles, compuestos antioxidantes...

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: David Moranta Mesquida

Nombre Tutor/Tutora (si procede):

Índice

INTRODUCCIÓN	4
Deterioro cognitivo	4
Fisiopatología del envejecimiento	6
Etiología del envejecimiento: Teoría de los radicales libres.....	8
El consumo de cerveza como terapia preventiva del deterioro cognitivo asociado a la edad....	9
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
Animales de experimentación	12
Tratamientos (tipos de cerveza)	12
Análisis conductuales (pruebas comportamentales)	13
Laberinto radial.....	14
Laberinto de Barnes.....	15
Rota-rod (cilindro rotatorio)	16
Sacrificio.....	17
Análisis estadístico	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	31
CONSIDERACIONES FINALES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32

INTRODUCCIÓN

Deterioro cognitivo

La esperanza de vida ha ido en aumento de manera considerable durante el último siglo en los países occidentales, y de forma notable en todo el mundo, con lo que el porcentaje de personas mayores ha aumentado considerablemente (Rao y Shaji, 2007). El envejecimiento de la población representa un logro histórico, donde la sociedad tiene ahora el lujo de una mayor esperanza de vida. Desde la segunda mitad del siglo XX, las tendencias principales han sido el declive de la fertilidad y la urbanización, lo cual, junto con una mejora en la salud y la longevidad ha generado que la proporción de gente mayor de 65 años incremente en todo el mundo. Concretamente, Europa ha tenido la mayor proporción de población de 65 años en adelante durante varias décadas y se cree que seguirá siendo el líder en lo que queda de siglo XXI (Kinsella, 2000). De hecho, el grupo poblacional que está aumentando considerablemente en las últimas décadas es el de los adultos mayores de 85 años, y estos fenómenos se observan en mayor medida en las áreas de desarrollo más rápido, como América Latina, China e India (Rao y Shaji, 2007).

Sin embargo, una mayor esperanza de vida no es sinónimo de mayor calidad de vida de los adultos mayores. El crecimiento constante de las poblaciones de ancianos conlleva a un empeoramiento en las condiciones de salud mental, las cuales son una causa importante de morbilidad y mortalidad prematura para las personas mayores. A lo largo del envejecimiento, se producen cambios en la estructura y la función del cerebro que pueden producir un deterioro cognitivo, de forma que se puede afirmar con certeza que la función cognitiva empeora con la edad. Además, el avance de la edad suele conllevar una acumulación de enfermedades sistémicas, las cuales pueden agravar el deterioro cognitivo, de forma que resulta imprescindible distinguir los efectos del cambio patológico y del envejecimiento normal (Benton & Sivan, 1984). El envejecimiento normal se define según el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento como todos los cambios que se producen en el transcurso de la vida de una persona sana. Las teorías más comunes sobre el envejecimiento normal proponen aumentos lentos en el daño del ADN con los años, la pérdida progresiva del control de la calidad de las proteínas y/o pérdida de la capacidad regenerativa de las células madre (Liu et al., 2017). En cuanto a términos de aptitud cerebral, durante el envejecimiento normal se observan reducciones en funciones cognitivas específicas como la velocidad mental, la función ejecutiva y la memoria episódica (Nyberg et al., 2012). En ocasiones, estas alteraciones pueden tener repercusiones en funciones cognitivas más complejas como la toma de decisiones (Glisky, 2007). No obstante, las habilidades verbales y el conocimiento del mundo generalmente se conservan (Park & Reuter-Lorenz, 2009). De hecho, el envejecimiento no afecta de la misma forma a todos los tipos de memoria, ya que se ha descrito que el conocimiento de la información adquirida no disminuye (si no que puede aumentar), al igual que el lenguaje y las habilidades visuoespaciales, que están relativamente intactos. Por el contrario, la integración de nueva información sí que se ve afectada de forma negativa (Geda, 2012). Uno de los principales síntomas del envejecimiento es la demencia, cuya definición fue publicada en 1980 por la Asociación Estadounidense de Psiquiatría

(American Psychiatric Association, 2013), y señala que el diagnóstico debe limitarse a “los casos en los que exista una clara evidencia de un deterioro progresivo y significativo del funcionamiento intelectual y social u ocupacional”. En la demencia, el deterioro progresivo de las funciones cristalizadas tiene como consecuencia una pérdida en la calidad de vida del paciente. Estos pacientes tienen dificultades mayormente en el procesamiento de la información, la recuperación y la velocidad. Actualmente, en cuanto a la prevalencia estandarizada de la demencia por edad para personas mayores de 60 años, ésta se encuentra entre el 5% y el 7% alrededor del mundo, siendo en España del orden del 3,9% (Lobo et al., 2007). Para el año 2050 se prevee que el número de personas que padecen demencia en todo el mundo supere los 135 millones (Wei et al., 2017). No obstante, debido a que todavía no se ha demostrado que exista algún tratamiento eficaz para ninguna de las demencias degenerativas, es importante el control de los factores de riesgo. Los tratamientos comunes para el deterioro cognitivo que supone el envejecimiento incluyen medicamentos como inhibidores de la colinesterasa (donepezil, rivastigmina, galantamina), suplementos dietéticos y vitaminas, así como rutinas de ejercicio, entrenamiento cognitivo y rehabilitación (Fitzpatrick-Lewis et al., 2015).

En la mayoría de los casos, el deterioro cognitivo ocurre de forma continua, comenzando con el deterioro cognitivo propio del envejecimiento, seguido del deterioro cognitivo leve (DCL) y terminando con algún tipo de demencia (Pottie et al., 2016). Por ende, el DCL es un estado intermedio entre el deterioro cognitivo propio del envejecimiento y la demencia, que en muchos casos supone una fase prodrómica del síndrome demencial (Petersen et al., 1999), ya que más de la mitad de las personas que tienen DCL progresa a la demencia en 5 años. Las personas que sufren esta condición presentan problemas de memoria mayores que lo esperado para la edad del individuo y su nivel educativo, pero sin interferir de forma notable con las actividades de la vida diaria, a diferencia de lo que ocurre con la demencia (Gracia et al., 2017). Aunque se ha determinado una prevalencia de DCL entre el 5,0 y el 36,7% en todo el mundo (Sachdev et al., 2015), esta misma varía debido a factores como el punto de corte utilizado para definirlo, la edad en la evaluación inicial y la duración del seguimiento (Manly et al., 2008). Comúnmente, se evalúa utilizando herramientas de detección como el Mini-Examen del Estado Mental (MMSE), que tiene un rango de puntuación bruta de 0 a 30. Por debajo de 23 indicaría un posible deterioro cognitivo, y entre 24 y 25 para indicar demencia, aunque el límite específico varía según la edad y el nivel de educación (Lin et al., 2013). El subtipo amnésico de deterioro cognitivo leve podría constituir una etapa prodrómica de la misma, ya que tiene un gran riesgo de progresión a la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, también existe un modelo de deterioro cognitivo sin demencia (CIND), que puede progresar o no a la demencia. Abarca muchos trastornos, desde el deterioro circunscrito de la memoria hasta el consumo crónico de alcohol y drogas, enfermedades psiquiátricas, retraso mental y patologías vasculares (Gauthier et al., 2006). No obstante, cabe destacar que, en el DCL, las tasas de reducciones volumétricas corticales son más del doble que en el envejecimiento saludable en grandes áreas de la corteza cerebral, y que en el Alzheimer existen tasas de reducción de hasta tres veces mayores (Figura 1) (Anders et al., 2014).

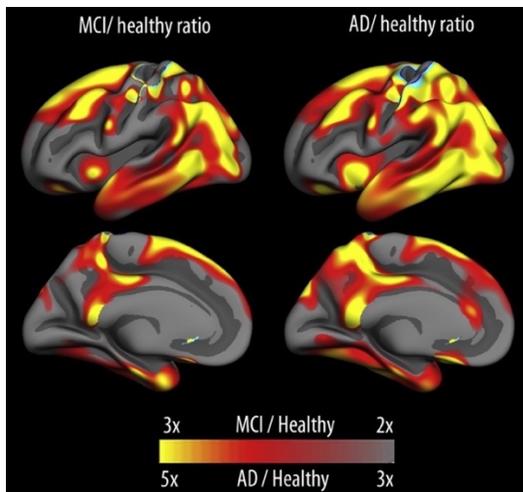


Figura 1. Diferencias en las tasas de atrofia cortical entre ancianos sanos (izquierda) y deterioro cognitivo leve/enfermedad de Alzheimer (derecha) (Fjell et al., 2014).

Ha habido muchos intentos para definir la entidad clínica en la disfunción de las capacidades cognitivas relacionadas con el envejecimiento. En 1982 fueron publicados dos sistemas de estadificación clínica que se utilizan aún en la actualidad para evaluar los límites del envejecimiento y la demencia. Estos son el índice de demencia clínica (CDR) (Hughes et al., 1982) y la escala de deterioro global para el envejecimiento y la demencia (GDS) (Reisberg et al., 1982). Los criterios de investigación para el DCL incluyen la presencia de dos o más alteraciones entre las que se encuentran el deterioro de la memoria función ejecutiva, atención o velocidad de procesamiento, habilidades perceptivo-motoras y lenguaje (Menéndez et al., 2013).

Fisiopatología del envejecimiento

Existen varios modelos explicativos de la dinámica de la actividad neurocognitiva en adultos mayores basados en activaciones cerebrales diferenciales, entre los que encontramos el modelo HERA (Right Hemiaging Model; Cabeza, 2001) y el modelo HAROLD (Hemispheric Asymmetry Reduction in Older Adults; Cabeza, 2002). El primero se basa en hallazgos conductuales, sosteniendo que la vejez provoca una mayor reducción de las funciones del hemisferio derecho en comparación con las del izquierdo (Mittenberg et al., 1989; Dolcos et al., 2002). La principal explicación de este fenómeno se encuentra en la menor porcentaje de materia gris en el hemisferio derecho en adultos mayores (Gur et al., 1987). A pesar de esta diferencia entre las capacidades verbales y espaciales en el envejecimiento, los déficits cognitivos principales asociados a la edad se producen al aplicar tareas nuevas sin poseer un conocimiento previo (Gerhardstein et al., 1998). Sin embargo, el modelo HAROLD predice que la actividad del córtex prefrontal (CPF) tiene una menor tendencia a la lateralización en personas mayores que en jóvenes (Cabeza, 2002). Además, esta reducción de la asimetría funcional también se experimenta en regiones subcorticales, ya que las personas jóvenes activan de forma selectiva el hipocampo izquierdo, y los adultos mayores activan los dos hipocamos en tareas de memoria episódica (Maguire y Frith, 2003). Este proceso se conoce como desdiferenciación, que es contraria a la diferenciación que ocurre en la infancia, y supone que la activación bilateral en las personas mayores dificulte

que se incorporen mecanismos neurales especializados (Li, Lindenberger y Sikstrom, 2001). Se ha comprobado que esta disminución en la asimetría puede deberse a una competencia en la inhibición mútua entre ambos hemisferios a través del cuerpo calloso, debido a un deterioro en la anatomía del mismo en personas mayores (Abe et al., 2002). En cualquier caso, resulta indiscutible que exista una reducción en el volumen cerebral bruto a lo largo del tiempo, con disminuciones anuales de entre el 0,2 y el 0,5% (Hedman et al., 2012). Algunos estudios demuestran que la reducción del volumen en la zona frontal es mayor que en la posterior (Allen et al., 2005). Sin embargo, aunque se ha considerado que los lóbulos frontales son especialmente vulnerables al envejecimiento normal, existe una evidencia creciente que apunta a que las áreas temporales sufren reducciones con la edad con una magnitud similar a los cambios frontales en adultos mayores sanos, apuntando a su relevancia en este proceso de envejecimiento cerebral (Pfefferbaum et al., 2013). Los cambios asociados a la edad en el volumen cortical se muestran en la Figura 2, donde se muestra el cambio porcentual de un año en ancianos sanos de entre 55 y 91 años de edad (Fjell et al., 2014).

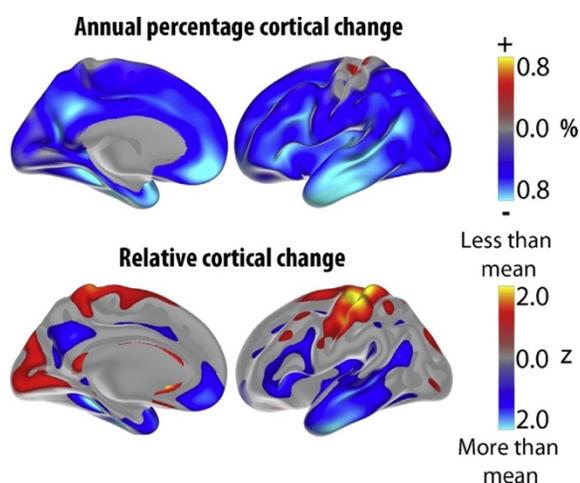


Figura 2. Reducciones volumétricas corticales longitudinales en el envejecimiento. Los colores azules representan áreas que se reducen más en un año que el resto de la corteza, y los colores amarillo-rojo representan áreas menos reducidas que la media. Aunque las reducciones corticales son relativamente globales en el envejecimiento normal, sin limitarse a regiones específicas, se observa una heterogeneidad, donde los lóbulos frontal y temporal son los que tienen el mayor grado de cambio relativo, además del área parietal medial (Fjell et al., 2014).

Anatómicamente, el envejecimiento normal se asocia con cambios estructurales que se deben principalmente a la atrofia extensa de la materia gris (Ramanoël et al., 2018). Sin embargo, como ocurre en las funciones cognitivas, la localización espacial y el grado de atrofia no son homogéneos en todo el cerebro en personas mayores (Fjell et al., 2014). Por otro lado, también se han observado cambios en el volumen tanto globales como regionales en la sustancia blanca, y de hecho es posible que esta reducción en la sustancia blanca esté más relacionada con el deterioro cognitivo que la reducción de la sustancia gris (Ziegler, 2010). Se ha descrito que el volumen de la sustancia blanca aumenta durante los primeros 40 años de vida de forma gradual, llegando a su máximo a los 50 años para luego disminuir rápidamente a partir de los 60 años (Liu et al., 2016). Además, se han descrito otros cambios macroestructurales en la sustancia blanca cerebral que se relacionan con un envejecimiento normal, como son lesiones de la sustancia blanca (leucoaraiosis), integridad alterada de la misma y posterior desconexión cortical (Caligiuri et al., 2015). Así, se ha correlacionado la

depresión en ancianos con lesiones subcorticales en la sustancia blanca, mientras que lesiones periventriculares de la misma se han asociado con el deterioro cognitivo (Liu et al., 2016).

De cualquier forma, la afectación al cerebro por el envejecimiento es diferente según la región cerebral, de forma que el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento se produce por la afectación a ciertas estructuras y no al conjunto del cerebro (Burke y Barnes, 2006). De esta forma, se ha relacionado el declive en la memoria episódica por envejecimiento con modificaciones en el hipocampo y otras estructuras del lóbulo temporal medial, mientras que el declive a nivel cortical se relaciona más con una reducción de los procesos de control cognitivo (Fjell et al., 2016). Además de los cambios estructurales, se ha descrito también que el cerebro parece ser más susceptible al daño inflamatorio durante el envejecimiento; de forma que al producirse una lesión, el exceso de inflamación que puede derivar a su vez a déficits cognitivos. De hecho, se ha descrito que la neuroinflamación es un proceso que ocurre durante el envejecimiento normal y que puede ser responsable de muchas alteraciones que ocurren en patologías más graves como el Alzheimer (Holmes y Butchart, 2011). Esto se debe a que hay estructuras cerebrales que se encuentran sensibilizadas, de forma que la respuesta inmune es demasiado alta (Godbout et al., 2005). Existe una mayor respuesta proinflamatoria por parte de la microglía debido a que su estado de activación está aumentado por la expresión de un fenotipo inflamatorio glial (MHCII, CD11b e Iba-1) (Barrientos et al., 2009). Se cree que uno de los principales factores que contribuyen a esta neuroinflamación asociada a la edad es el NF- κ B (nuclear-factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells), que interviene en esta respuesta inflamatoria (Sarkar y Fisher, 2006).

Etiología del envejecimiento: Teoría de los radicales libres

Varios estudios han demostrado que el envejecimiento está asociado a la acción de los radicales libres (especialmente el envejecimiento cerebral) (Fusco et al., 2007). Aunque se han propuesto más de 300 teorías para explicar el proceso del envejecimiento (Medvedev, 1990), es la propuesta de Denham Harman la que recibió una mayor aceptación, basándose en que los radicales libres están causalmente relacionados con el proceso de envejecimiento básico (Harman 1957). En un estado normal, el cuerpo se encuentra en un equilibrio entre oxidantes, antioxidantes y biomoléculas, pero el exceso de radicales libres conduce a la oxidación y a un deterioro funcional celular. De esta forma, la teoría de los radicales libres del envejecimiento propone la hipótesis de que los radicales libres derivados del oxígeno son responsables del daño relacionado con la edad a nivel de células y tejidos. Esta teoría se revisó en 1972 (Harman, 1972), cuando se determinó que son las mitocondrias, generalmente, las que generan la mayoría de radicales libres a nivel celular. Así mismo, se estableció que la tasa de daño de los radicales libres en las mitocondrias determina la duración de la vida (Gemma et al., 2007). Las células que utilizan oxígeno y, por lo tanto, producen especies reactivas de oxígeno, han creado complejos sistemas de defensa antioxidantes para neutralizarlas y protegerse contra el daño de los radicales libres. El radical libre más simple es un átomo de hidrógeno, pero los radicales centrados en O₂ son los más abundantes en los organismos aeróbicos. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas con un metabolismo aeróbico normal, son esenciales para procesos como la señalización intracelular y la defensa bacteriana. En la respiración celular se cree que hay una pérdida de electrones de la cadena de transporte mitocondrial para producir radicales libres y derivados de oxígeno

activo, llamados en su conjunto especies reactivas de oxígeno. En condiciones normales, un pequeño porcentaje (alrededor de un 1%) de estas ROS escapa de las defensas antioxidantes, de forma que contribuye al daño oxidativo y promueve el envejecimiento (Fusco et al., 2007). Este estrés oxidativo provoca una disfunción mitocondrial que da lugar a una crisis energética, y esto favorece la aparición de enfermedades neurodegenerativas, así como también acelera el envejecimiento (Stefanatos y Sanz, 2018). A pesar de que el radical superóxido no es tan reactivo, su producto de reacción, el peróxido de hidrógeno, en presencia de iones de metales traza (metales en cantidades muy pequeñas presentes en tejidos y células que en cantidades excesivas pueden resultar tóxicos) como Fe^{2+} , se convierte en radicales hidroxilo, que pueden oxidar la mayoría de biomoléculas (Quifer et al., 2014). Además, los sustratos orgánicos, posteriormente a su reacción con radicales hidroxilo en presencia de oxígeno se convierten en radicales peróxido, que inducen cambios químicos en orgánulos celulares como la membrana lipídica, el ADN y las proteínas, y eventualmente provocan la muerte celular (Martinez-Gomez, Caballero y Blanco, 2020).

Por lo tanto, el aumento del estrés oxidativo en el envejecimiento puede deberse al desequilibrio entre la creación de radicales libres y las defensas antioxidantes, siendo más abundantes durante el envejecimiento los primeros (Sastre et al., 2000). Esto implicaría que la base de los procesos moleculares del envejecimiento cerebral y la neurodegeneración sería acumulación de daños oxidativos en los componentes neuronales (Kolossova et al., 2006). Es por ello que la teoría de los radicales libres del envejecimiento ha fomentado investigaciones sobre el papel potencial de los nutrientes antioxidantes en las estrategias terapéuticas o preventivas (Mayne, 2003).

El consumo de cerveza como terapia preventiva del deterioro cognitivo asociado a la edad

Los antioxidantes son sustancias que inhiben o retrasan la oxidación de un sustrato cuando se encuentran en cantidades ínfimas, es decir, atenúan el estrés oxidativo que surge de la sobreproducción de ROS pudiendo eliminar radicales libres e inhibir enzimas prooxidativas (Koren et al., 2019). Las defensas antioxidantes endógenas son tanto enzimáticas (superóxido dismutasas, glutatión peroxidasas y catalasa) como de otro tipo (bilirrubina, glutatión, albúmina, ácido úrico, tioles y vitaminas). En este campo, los modelos animales han demostrado que los suplementos dietéticos con vitaminas antioxidantes pueden prevenir o incluso revertir los cambios asociados a la edad en las defensas antioxidantes del sistema nervioso central y reducir el estrés oxidativo (Tan et al., 2018).

Se ha descrito que la cerveza posee efectos antioxidantes (Martinez-Gomez, Caballero y Blanco, 2020). Se trata de una de las bebidas más antiguas, consumidas y populares alrededor de todo el mundo. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el consumo anual per cápita de cerveza en el 46,4% de los países europeos es superior a 70 L, con un máximo de 142,8L en Irlanda (FAO, 2011). A pesar de la controversia en relación al contenido alcohólico de la cerveza y si bien el abuso del alcohol es claramente nocivo, a principios de los años 90 se propuso la “paradoja francesa”, apuntando a un efecto beneficioso asociado al consumo de bebidas fermentadas (Renaud et al., 1992). Esta paradoja hace una distinción entre las bebidas alcohólicas fermentadas y las bebidas espirituosas, ya que se postuló que el consumo de las

primeras tenía un efecto positivo en la salud humana (De Gaetano et al., 2016). Sin embargo, sigue existiendo una gran controversia sobre los efectos del alcohol sobre el funcionamiento cognitivo, ya que los datos son contradictorios. Por un lado, un consumo excesivo de alcohol se asocia con daños importantes en la salud como daño neurológico y demencia (Stott et al., 2008; Zuccalà et al., 2001). Por otro lado, se ha demostrado que el consumo moderado de alcohol reduce el riesgo de demencia y se ha asociado a una mejor función cognitiva en comparación a personas que se abstienen o que consumen grandes cantidades de alcohol (Luchsinger et al., 2004). De forma similar, el estudio de Gu et al., 2014, sugirió que la ingesta moderada de alcohol se relaciona con mayores volúmenes cerebrales en personas mayores, y por lo tanto, una menor atrofia cerebral en el envejecimiento. Otros autores también han relacionado un mayor consumo de alcohol con un aumento de materia gris en hombres (Anstey et al., 2006), y una mayor densidad de materia blanca en la circunvolución frontal derecha y la región parietal derecha (de Bruin et al., 2005). Se ha descrito también una relación positiva entre la ingesta de alcohol y los volúmenes del hipocampo y la amígdala en los portadores de la isoforma $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (APOE), la cual supone un factor de riesgo del Alzheimer y del desarrollo cognitivo inadecuado (den Heijer, 2004). Además, se ha relacionado un consumo moderado de alcohol (en el rango de 1 a 3 bebidas diarias de baja graduación) con una reducción del riesgo de sufrir cardiopatía coronaria (Kaplan et al., 2000). Estos efectos beneficiosos de la ingesta alcohólica contra el deterioro cognitivo parecen concentrarse en las áreas de aprendizaje, el estado mental general y funciones ejecutivas (Ganguli et al., 2005). Se cree que estos efectos protectores del alcohol son debidos a mecanismos cardiovasculares que generan, y podrían ser incluso mayores sobre la demencia vascular (Peters, 2008). No obstante, diferentes bebidas alcohólicas pueden tener el mismo contenido alcohólico, por lo que, tanto el vino, la cerveza y el licor podrían ser protectores o pueden conferir riesgo de envejecimiento cerebral subóptimo (Gu et al., 2014). Entre los efectos perjudiciales descritos asociados al exceso de alcohol, se encuentra una mayor atrofia cerebral (Ding et al., 2004) y un deterioro en el procesamiento cognitivo en personas mayores (Edelstein et al., 1998; Zuccalà et al., 2001). Además, existen dos síndromes cognitivos crónicos propios del alcohol, que son el síndrome de Wernicke-Korsakoff (Butters, 1985), el cual se caracteriza por amnesia densa y alguna disfunción ejecutiva, y demencia alcohólica con déficits leves en la memoria (propio de personas mayores) (Ganguli et al., 2005).

En cualquier caso, los efectos beneficiosos atribuidos al consumo moderado de alcohol no deben reducirse a un único factor como es la cantidad de alcohol. En este sentido, muchos estudios han encontrado diferencias entre los efectos sobre la salud entre bebidas espirituosas y fermentadas con niveles similares de consumo de alcohol (Costa et al., 2017). La cerveza contiene ingredientes cuyas transformaciones durante el proceso de fabricación enriquecen a la cerveza de macronutrientes. Por ello, se ha descrito que el consumo moderado de cerveza tiene efectos beneficiosos sobre la salud humana, basados mayormente en las propiedades redox de los compuestos antioxidantes presentes en la cerveza, así como en el contenido de vitaminas, polifenoles y fibra. Estos compuestos antioxidantes (fenoles y melanoidinas principalmente) ofrecen características sensoriales y ventajas para la salud (Martinez-Gomez, Caballero y Blanco, 2020).

El contenido antioxidante de la cerveza es equivalente al del vino blanco, pero menor que el del vino tinto, aunque los antioxidantes específicos son diferentes porque la cebada y

el lúpulo que se utilizan en la cerveza contienen polifenoles diferentes a los de las uvas que se utiliza para la elaboración del vino (Lugasi, 2003). Los antioxidantes de la cerveza provienen mayormente de dos ingredientes que se utilizan en la elaboración de la cerveza: la malta y el lúpulo, por lo que la capacidad antioxidante de la cerveza depende del contenido de antioxidantes de estos dos ingredientes, y de varios parámetros involucrados en la elaboración de la cerveza. La mayor fuente de compuesto polifenólico de la cerveza es la malta (70-80%), mientras que resto proviene del lúpulo (20-30%) (Arranz et al., 2012). Los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas derivados principalmente de la fenilalanina y la tirosina, y su contenido en la cerveza depende de varios factores; mayormente de la variedad de cultivo y las condiciones ambientales de cultivo, así como el proceso de elaboración (Quesada-Molina et al., 2019). Entre otros efectos, se ha comprobado que después de la ingesta con cerveza sin alcohol, la presión arterial sistólica (que como se ha mencionado anteriormente es un factor de riesgo para el deterioro cognitivo) disminuye, por lo que probablemente los efectos beneficiosos descritos pueden atribuirse a la fracción no alcohólica de la cerveza, y en gran medida al contenido en polifenoles (Chiva-Blanch, 2014).

El interés por los compuestos polifenólicos reside principalmente en sus propiedades redox, entre las cuales se encuentran la reducción de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Así, los polifenoles parecen jugar un papel en la prevención de varias enfermedades crónicas importantes asociadas con el estrés oxidativo, entre las que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas (Martinez-Gomez, Caballero y Blanco, 2020). Por otro lado, se ha descubierto que los polifenoles también interactúan con la microbiota intestinal (Quesada-Molina et al., 2019). Esta interacción da forma a diversidad de especies de la microbiota intestinal y aporta beneficios para la salud humana, como la prevención de problemas gastrointestinales y la inhibición de la abundancia de especies bacterianas patógenas (Ma y Chen, 2020). Así mismo, también se ha descrito que reducen los marcadores de inflamación como IFN- γ , IL-1 β o NF- κ B (Magni et al., 2018), así como la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión, como VCAM-1 e ICAM-1, relacionadas con la inflamación intestinal (Martínez et al., 2013). Por último, algunas estructuras polifenólicas han demostrado incluso tener propiedades antidiabéticas, antimicrobianas, anticancerígenas y antiinflamatorias (Quesada-Molina et al., 2019).

Además de los compuestos polifenólicos y las melanoidinas, la cerveza también contiene vitamina C que puede contribuir a su capacidad antioxidante, ya que es capaz de disminuir los altos niveles de isoprostanos (un marcador de estrés oxidativo in vivo) en modelos animales (Bagi et al., 2003). Se sabe que la vitamina C es el principal antioxidante soluble en agua y se comporta como primera defensa contra los radicales libres en la sangre y el plasma. Es un fuerte inhibidor de la peroxidación lipídica y un regenerador de la vitamina E en lipoproteínas y membranas. A su vez, la vitamina E, presente también en la cerveza, protege contra el daño oxidativo actuando directamente con una variedad de radicales de oxígeno. De hecho, Vina et al., (2004) postulan que la vitamina E puede ser un tratamiento eficaz contra la enfermedad del Alzheimer.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo del presente trabajo fue analizar y estudiar los efectos del consumo de cerveza sobre el deterioro cognitivo propio del envejecimiento en un modelo de rata vieja, y precisar la acción que puede tener la fracción alcohólica de la cerveza sobre estos efectos. Como hipótesis se planteó que la cerveza puede tener efectos beneficiosos en el envejecimiento neuronal debido a sus propiedades antioxidantes, aunque el alcohol puede perturbar en este efecto positivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar albinas (*Rattus norvegicus*) de Charles-River (Barcelona, Spain) macho y hembras libres de patógenos (SPF) y no consanguíneas. Es una cepa ampliamente utilizada en la investigación del envejecimiento, concretamente en estudios neuronales y cognitivos, ya que fisiológicamente son muy buen modelo animal para extrapolar los resultados a humanos (Gallagher et al., 2011).

Se utilizaron 50 ratas con 15 meses de edad (480 – 600 g en machos y 280 – 350 g en hembras). Durante el periodo de experimentación los animales se alojaron en el estabulario de los Servicios Científico-Técnicos de la UIB (Tipo III, Institute for Laboratory Animal Research [ILAR]). Se albergaron en grupos de dos en jaulas de metacrilato translúcidas (50x32x12 cm) (Panlab s.l, Barcelona), junto con viruta de madera en el suelo como material de nidificación (Ultrasorb, Panlab). Se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, en condiciones ambientales controladas (temperatura 22 ± 1 °C; humedad: 50-60 %). Tuvieron acceso a una dieta estándar (Pablab A04) *ad libitum* y agua corriente.

Los animales se manipularon varios días antes de comenzar con las pruebas comportamentales para reducir el estrés relacionado con la manipulación, y los procedimientos se llevaron a cabo siempre durante el periodo diurno de 9:00 a 15:00. Además, fueron tratadas siguiendo el Convenio Europeo para la Protección de los Animales Vertebrados con Fines Experimentales y otros Fines Científicos (Directiva 2010/63/UE) y de acuerdo con el Comité de Bioética de la Universidad de las Islas Baleares. El proyecto fue aprobado el día 3 de julio de 2020 por la Consellería d'Agricultura, Pesca y Alimentación de las Islas Baleares (nº expediente 2020/11/AEXP).

Tratamientos (tipos de cerveza)

A fin de estudiar el posible efecto beneficioso de los antioxidantes presentes en la cerveza a nivel cerebral durante el envejecimiento, durante tres meses se aplicaron diferentes tratamientos, que constituyeron los distintos grupos de animales: **control**, **cerveza clásica** (Steinburg Clásica, alc. 4,8% vol), **cerveza sin alcohol** (Steinburg Sin, alc. <1% vol), y **cerveza sin alcohol con etanol añadido** (Steinburg Sin, al 4,8%). Según las indicaciones del fabricante de cerveza, la versión clásica (con alcohol) contenía agua, malta de cebada, maíz y lúpulo, mientras que la versión sin alcohol además contenía cebada y jarabe de glucosa.

Se escogió una cerveza tipo *lager* porque es el tipo de cerveza más consumido a nivel mundial y con el fin de poder extrapolar los resultados al efecto del consumo de cerveza en humanos (Martinez-Gómez et al., 2020).

El primer mes del estudio se utilizó para obtener los datos basales (tiempo 0). Al siguiente mes, y durante tres meses, los animales bebieron cerveza diariamente (excepto el grupo control, que se mantuvo bebiendo únicamente agua). Para ello, disponían de dos biberones, uno para el agua y el otro para la cerveza. Los biberones con cerveza clásica se les proporcionaba a las 13h, excepto aquellos días en los que se realizaban las pruebas comportamentales que se hacía posteriormente a los mismos, y se comprobaba que bebiesen todo el contenido. El volumen ingerido (34 ml/kg·día) se calculó como el equivalente a dos cervezas diarias para un hombre de 70 kg (figura 3), siguiendo las indicaciones de Kalyvianaki et al. (2020).

$$DHE \left(\frac{ml}{kg} \right) = \text{Dosis animal} \left(\frac{ml}{kg} \right) \cdot \frac{Km \text{ Animal}}{Km \text{ Humanos}}$$
$$DAE \left(\frac{ml}{kg} \right) = \text{Dosis humanos} \left(\frac{ml}{kg} \right) \cdot \frac{Km \text{ Humanos}}{Km \text{ Animales}}$$

Figura 3. Cálculo para las dosis entre especies basada en la superficie corporal. DHE: dosis humana equivalente. DAE: dosis animal equivalente. K_m : constante que relaciona el peso (kg) y la superficie corporal (m^2). Traducido de Kalyvianaki et al., 2020.

Además, se controló el peso de las ratas de forma periódica una vez a la semana, y una vez al mes se realizaron las pruebas comportamentales, así como la extracción de sangre (no analizada en este trabajo). Finalizados los tratamientos a los tres meses, se sacrificaron los animales por decapitación. Se extrajeron distintos órganos y se diseccionaron los cerebros, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C para futuros análisis.

Análisis conductuales (pruebas comportamentales)

Las pruebas comportamentales se utilizan para evaluar la función cognitiva de las ratas. En este caso, se utilizaron para estudiar el efecto de los tratamientos crónicos sobre la función cognitiva. Para ello se aplicaron las siguientes pruebas comportamentales: laberinto Radial (*radial maze*), laberinto de Barnes y prueba del cilindro rotatorio (*Rota-rod*), para evaluar respectivamente la memoria de trabajo espacial, el aprendizaje y la memoria visual-espacial. Estas pruebas se llevaron a cabo tanto antes de comenzar los tratamientos (pruebas control) como durante los tratamientos. Cada una de estas pruebas consta de diversas fases que se realizan en distintos días. A continuación, se detalla la planificación de las pruebas ideada para evitar interferencia en los resultados de cada test (figura 5) aquellos meses en los que se realizaban todas las pruebas.

	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
Semana 1	Familiarización Rota-rod	Familiarización Rota-rod	Familiarización Rota-rod Familiarización Barnes	Test Rota-rod Test Barnes (10 min)	Barnes (24h)
Semana 2	Familiarización Radial	Test Radial	Barnes (1 semana)	Barnes reverso	

Tabla 1. Planificación de las pruebas comportamentales realizadas durante el presente trabajo.

Laberinto radial

Esta prueba sirvió para estudiar la memoria de trabajo espacial de los animales, ya que se diseñó originalmente con este propósito (Olton y Samuelson, 1976). La versión realizada en este proyecto está constituida por 8 brazos equidistantes (70x11 cm) de una plataforma central (28 cm de diámetro) (figura 5). En el extremo de cada brazo extremos se encuentran pequeños huecos donde se coloca una cantidad pequeña de comida simplemente para promover la entrada de animales en todos los brazos. La memoria de trabajo en este caso permite al animal recordar que recientemente ha entrado en un brazo, de forma que la no entrada y la re-entrada los brazos se cuentan como errores de memoria de trabajo. En la entrada de cada brazo se localizan claves visuales diferenciales que permiten al animal identificar cada brazo.



Figura 4. Laberinto radial.

Para asegurar un mismo nivel motivacional de todos los animales para realizar la prueba, los animales se mantuvieron 24 h en ayuno, disponiendo únicamente de agua; de forma que tuviesen más necesidad de encontrar comida y así completar la prueba. El animal se coloca en la plataforma central para que pueda explorarlo durante 20 min como máximo, tiempo durante el que se registran los brazos visitados. El test finaliza cuando el animal ha entrado en todos los brazos o cuando hayan pasado los 20 min. A través de una cámara de vídeo conectada a un ordenador se registran las pruebas y el programa específico para el laberinto radial (Smart v2.5, Panlab, S.L, Barcelona, España) analiza los datos. Una vez acabada la prueba, se limpia el instrumento con etanol 95% antes de proseguir con el

siguiente animal, para evitar que el rastro del anterior interfiera en los resultados del siguiente.

Los parámetros que se analizaron fueron los siguientes: tiempo (minutos) que tardaba en visitar todos los brazos (T_{RD}) y el número de errores (nE_{RD}), correspondiente a la suma de los brazos revisitados y los no visitados. Estos parámetros se estudiaron para este test tanto antes del tratamiento como durante los tres meses del mismo.

Laberinto de Barnes

Esta prueba comportamental fue utilizada para estudiar el aprendizaje basado en la memoria visuo-espacial de los animales. Su función principal es observar la habilidad de los animales a la hora de aprender y recordar la ubicación de la caja de escape, a la que se dirigen dependiendo de la tendencia del animal para buscar protección. Para ello, se utilizó una base circular de madera (130 cm de diámetro) situada a 73,5 cm de altura desde el suelo, de color azul y con 18 agujeros (10 cm de diámetro) a 10 cms de distancia unos de otros. Situada en la parte baja de uno de estos agujeros está colocada la caja de escape (28x18x9,5 cm), que se mantiene en esa posición durante todo el experimento.



Figura 5. Laberinto Barnes.

En este estudio, se utilizó un procedimiento modificado del descrito por Barnes (1979), que consta de cinco fases. La primera fase es la de habituación, que se realiza el día previo al test. Durante tres minutos, las ratas se habitúan tanto al laberinto como a la caja de escape. Si no la encuentran, se les acompaña y se mantienen un minuto para que se adapten. No obstante, en esta fase no se enciende la luz ni se sitúa a la rata dentro de la caja de inicio.

La segunda fase era el entrenamiento, que se organizaba en tres entrenamientos secuenciales, seguidos por la prueba de un minuto, separados por un intervalo de 10 minutos cada uno. Aquí se pretendía que las ratas aprendiesen la ubicación de la caja de escape. En este caso, la rata se sitúa en el centro del laberinto con la caja de inicio de poliestireno para proporcionarle oscuridad y sensación de seguridad. Después de 10 s se levanta y se enciende la luz para que el cambio de luz sea más brusco. La agorafobia de las ratas es aún mayor al utilizar focos de 500 W, colocados 2 m por encima de la plataforma. Una vez que se retira la caja, el animal es libre para encontrar y entrar en la caja de escape en 3 minutos. Por lo tanto,

el entrenamiento termina cuando el animal descubre la caja de escape o a los 3 minutos de búsqueda. Si el animal no ha encontrado la caja, se le guía de forma suave hasta ella para que permanezca en su interior durante 1 min. Cuando el animal entra en la caja de escape se apagaba la luz. Posteriormente, se traslada el animal a su jaula y se espera hasta que transcurran 10 minutos para realizar el siguiente entrenamiento o test, limpiando la superficie con etanol 95% entre cada animal y sesión.

En la fase de test es cuando se observa si el animal ha aprendido la ubicación de la caja de escape, y se realiza a los 10 minutos posteriores del último entreno. Se colocan los animales de la misma forma que en los entrenamientos pero en este caso se realiza un único test y además se graba con una cámara de vídeo para poder registrarlo. El test finaliza en el momento en el que el animal encuentra la caja o cuando haya pasado 1 minuto.

La tercera y cuarta fase correspondía al test 24h y el test 1 semana, en los cuales se repetía el test pasado un día o una semana, respectivamente, con la prueba de un minuto. Esto permitía evaluar la memoria a largo plazo.

La quinta fase se trataba de realizar el test reverso, en el cual, pasado una semana, se cambiaba el lugar de la caja de escape al lado contrario del laberinto y se volvía a realizar la fase de entrenamiento para evaluar a los 10 min si los animales eran capaces de reaprender la posición de esta caja de escape y evaluar así la capacidad de generar nuevos recuerdos.

Los parámetros a analizar en los tests de un minuto fueron: tiempo (segundos) que tardaba la rata en entrar en el target (T_B) y el número de errores (nE_B), que corresponde a las veces que la rata se asomaba a un agujero donde no estaba el target. Estos parámetros se estudiaron para este test tanto antes del tratamiento como durante los tres meses del mismo.

Rota-rod (cilindro rotatorio)

El Rota-rod es una prueba que se utiliza para estudiar la coordinación motora y la resistencia a fatiga en ratas. Se basa en la capacidad de permanecer en equilibrio en una rueda rotatoria, va aumentando la aceleración a medida que pasa el tiempo gracias a un microprocesador que regula la aceleración (en este estudio, el incremento de velocidad fue de 4 a 40 cm/s durante un tiempo de 5 minutos) y controla el tiempo; el cual deja de contar cuando el animal cae en una plataforma. El modelo que se utilizó en este estudio fue *LE8350 Rota-rod* para 2 ratas (Panlab, S.L, Barcelona, España), con un cilindro de 30 cm de ancho y 8 de diámetro. Este cilindro se limpiaba con etanol 95% después de analizar cada animal. Antes de las pruebas, se realizó una habituación durante 4 días y al quinto día se realizaban los tests (Figura 4 o tabla 1). A cada rata se le realizaba la prueba 5 veces (con intervalos de 5 minutos), y con la media aritmética de las 5 pruebas se obtenía el resultado final. El parámetro a analizar fue el tiempo (segundos) que tardaba la rata en caer (T_{RR}), con los datos previos al tratamiento así como los datos obtenidos al tercer mes de tratamiento.



Figura 6. Rota-rod.

Sacrificio

Una vez pasados los 3 meses de tratamiento crónico, realizadas las últimas pruebas comportamentales, se sacrifican los animales por decapitación. Con este procedimiento se pretende que los fármacos anestésicos o eutanasia no interfieran con los parámetros cerebrales de interés. Además, se les administra de forma intraperitoneal NSD 1015 (100 mg/kg) media hora antes del sacrificio, lo que permite en futuros trabajos realizar un análisis de la tasa de síntesis de monoaminas. Una vez realizada la decapitación, los cerebros se extraen y se diseccionan rápidamente las distintas regiones cerebrales; se congelan en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C a la espera de su futuro análisis neuroquímico y molecular que pueda correlacionarse con los datos comportamentales obtenidos en este trabajo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó mediante el programa GraphPad Prism 8.3 El modelo estadístico utilizado fue el de medidas repetidas bifactorial (factor tratamiento y factor tiempo). El factor tratamiento es el relativo al efecto de la cerveza sobre cada grupo experimental (*Control*, *Cerveza clásica*, *Cerveza sin alcohol*, *Cerveza sin alcohol con etanol añadido*), mientras que el factor tiempo representa los meses en los que se aplicó el tratamiento a las ratas. La interacción, por lo tanto, aparece como el efecto entre el factor tiempo y el factor tratamiento. En el caso de los tests Rota-rod y Radial, el análisis se realizó con los datos previos al tratamiento y los datos al tercer mes.

Los datos se analizaron con el test ANOVA de dos vías y posteriormente con las pruebas de comparaciones múltiples post hoc. Para las comparaciones múltiples se utilizó el test de *Tukey*, con el cual se analizaron los datos del test Barnes dentro de un mismo grupo experimental en los diferentes meses con respecto al valor basal, y los datos para cada grupo experimental respecto al grupo control para cada mes. También se utilizó para analizar la evolución de los pesos a lo largo del tiempo, así como para los resultados del test Rota-rod. Además del test ANOVA, también se utilizó el test t de *Student* para comparar los valores

basales de todos los tratamientos de machos y hembras en el caso del test Radial, del Barnes y del Rota-rod, así como para detectar diferencias en las tasas de supervivencia. El nivel de significación considerado en todos los casos fue del 0.05.

RESULTADOS

Se realizó un control periódico del peso de las ratas de ambos sexos a lo largo de todo el tratamiento, lo que nos permitió detectar si había algún efecto nutricional por parte de los tratamientos y nos servía como indicador indirecto de su estado metabólico. Los resultados muestran que el peso se mantuvo estable a lo largo de todo el tratamiento y que no hubo diferencias significativas entre los distintos grupos (figura 7).

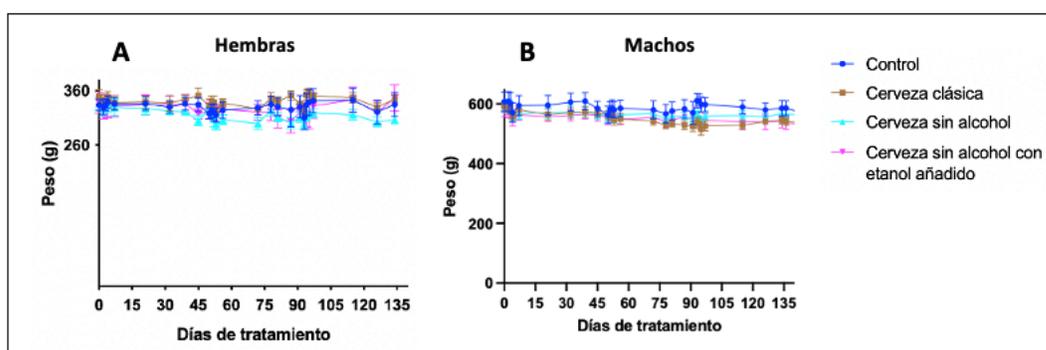


Figura 7: Evolución del peso de las ratas hembra (A) y macho (B) a lo largo del tratamiento. Se representan las medias para cada día en que se midió el peso de cada grupo experimental (*Control* en azul marino, *Cerveza clásica* en marrón, *Cerveza sin alcohol* en azul turquesa y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* en rosa) con su correspondiente error estándar. El análisis estadístico de datos con ANOVA de dos vías no dio significación en ningún factor ($p\text{-valor} < 0,05$).

De acuerdo a las previsiones y como era lógico por la edad de los animales y por la larga duración del tratamiento, algunos animales murieron, pero la mayoría sobrevivieron hasta finalizar el tratamiento. De hecho, la tasa de supervivencia más baja se encontró en el grupo *Control* de los machos, con un 91,18%, mientras que para las hembras fue de un 95,83 en todos los grupos, excepto para las ratas que bebían cerveza sin alcohol con etanol añadido, de las cuales sobrevivieron el 100%. Estos datos son los que se esperaban al trabajar con ratas de edad avanzada y no se detectan diferencias significativas entre los distintos grupos.

	Tasa de supervivencia	
	Hembras (%)	Macho (%)
<i>Control</i>	95,83	91,18
<i>Cerveza clásica</i>	95,83	97,05
<i>Cerveza sin alcohol</i>	95,83	97,05
<i>Cerveza sin alcohol con etanol añadido</i>	100	97,05

Tabla 2: Tasas de supervivencia de las ratas macho y hembra (%) durante el tratamiento. El análisis estadístico con el test t de *student* no presenta diferencias significativas ($p\text{-valor} > 0,05$).

MEMORIA DE TRABAJO ESPACIAL (LABERINTO RADIAL)

Se realizó el test del laberinto radial antes de iniciar el tratamiento (datos basales) y al final del tratamiento (tras 3 meses) para analizar si existían diferencias en la memoria visuo-espacial a lo largo del tratamiento (figura 8). Los resultados indicaron que no hay diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de realización del test (figuras A.1 y B.1) ni en los errores cometidos (figuras A.2 y B.2), lo que indica que no hay diferencias en la memoria visuo-espacial al finalizar los tratamientos.

Al observarse algunas diferencias entre machos y hembras en los resultados basales de la figura 8 (A y B), se decidió analizar si realmente existen diferencias significativas. Así, en la figura 8C se presentan los resultados basales obtenidos en el test del laberinto radial para machos y hembras. En el caso de las hembras, se encuentra mucha heterogeneidad entre los diferentes grupos experimentales si se compara con los machos. De esta forma, se encuentran diferencias significativas entre machos y hembras en los resultados basales de todos los tratamientos ($F=2.042$, $df=38$, $p\text{-valor}=0.0116$) (figura 8C), indicando que, de forma general, los machos lo hicieron peor, ya que tardaron más tiempo en finalizar el test, o no lo finalizaron. No obstante, si nos fijamos en las figuras 8A.1 y 8B.1, en el caso de los grupos *Cerveza clásica* y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido*, los resultados son bastante similares para machos y hembras, tanto en el tiempo de realización del test como en el número de errores cometidos.

En las **hembras** se observa que existe una tendencia (aunque no significativa) a disminuir el tiempo de realización del test (figura 8 A.1) y el número de errores (figura 8 A.2) en los grupos *Cerveza sin alcohol* y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido*. Puede además observarse que tanto los grupos *Control* y *Cerveza clásica*, en el momento previo al tratamiento, tardan menos tiempo en realizar el test que los grupos *Cerveza sin alcohol* y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido*, con un nE_{RD} también menor. Estos dos grupos presentan unos valores muy similares a los de los machos en el momento previo al tratamiento. La tendencia general de ambos grupos experimentales en hembras es a disminuir tanto el T_{RD} como el nE_{RD} a lo largo del tratamiento.

En cuanto al grupo de ratas **macho**, tampoco se encontraron diferencias significativas ni en cuanto al T_{RD} (figura 8 B.1) ni al nE_{RD} (figura 8 B.2) entre los resultados basales y el tercer mes. No obstante, como ocurre con las hembras, se observa una tendencia a disminuir el tiempo del test en los grupos *Cerveza sin alcohol* y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido*. Con respecto al número de errores, se observa una tendencia general a disminuir los mismos a lo largo del tratamiento en todos los grupos, aunque tampoco es significativa.

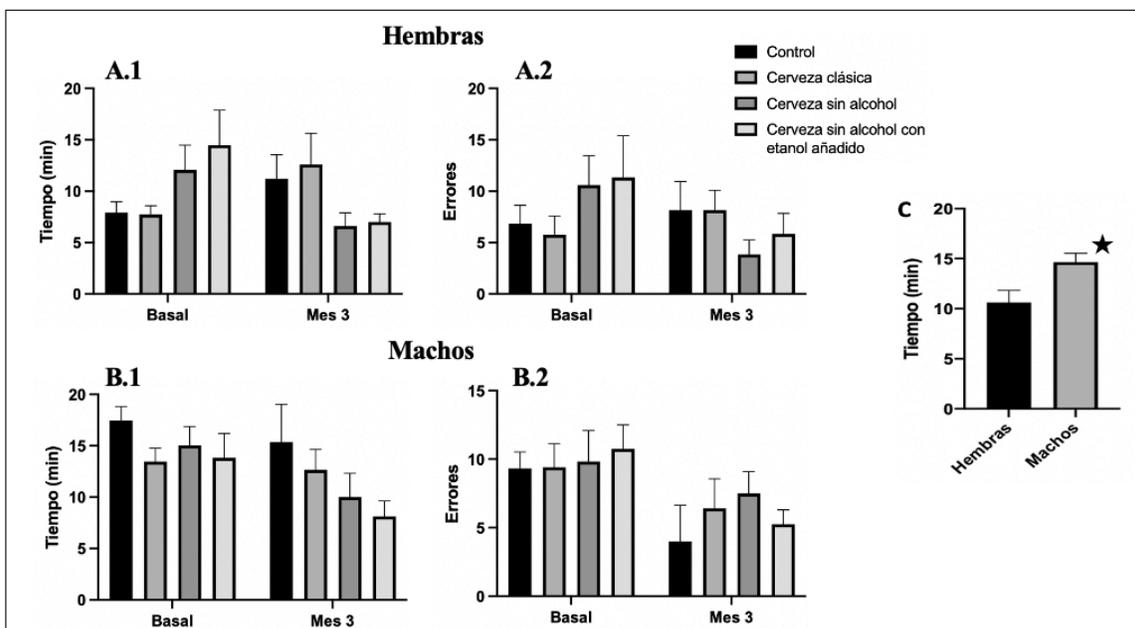


Figura 8: Resultados del test Radial en machos y hembras. **A.1:** Tiempo de realización del test (min) en hembras entre el inicio del estudio (basal) y el tercer mes. **A.2:** Número de errores en el test en ratas hembra. **B.1:** Tiempo de realización del test (min) en machos entre el inicio del estudio (basal) y el tercer mes. **B.2:** Número de errores en el test en machos. El análisis estadístico de datos con ANOVA de dos vías no dio significación en ningún factor (p -valor < 0,05). **C** (derecha): Resultados basales relativos al T_{RD} (tiempo de realización del test Radial) en machos y hembras. El análisis estadístico con el test t de *student* presenta una diferencia estadísticamente significativa (p -valor=0.0116).★: p -valor<0.05.

MEMORIA VISUAL-ESPACIAL (TEST DE BARNES)

En las figuras 9 y 10 se representan los datos obtenidos en las diferentes fases del test de Barnes (fase 2: a los 10 minutos; fase 3: a las 24 horas; fase 4: a la semana; y fase 5: test reverso) para hembras y machos, respectivamente. A la izquierda se presentan los resultados del tiempo para realizar el test (en minutos, T_B), mientras que a la derecha se representa el número de errores cometidos durante este test (nE_B). El análisis de ANOVA de dos vías sólo detectó diferencias significativas para el factor tiempo relativo al T_B , tanto para hembras como para machos.

La comparación entre machos y hembras en el tiempo de realización del test de Barnes con la prueba *t-student* dio resultados significativos para los datos basales de todos los tests; el test de 10 min, el test 24 hrs, 1 semana y reverso (p -valor= 0,0098; 0,0005; 0,0015; 0,0004, respectivamente). Estas diferencias en los resultados previos al tratamiento indican que las hembras tardaron significativamente más tiempo en completar el test en comparación a los machos, excepto en el test reverso donde las hembras tardaron menos.

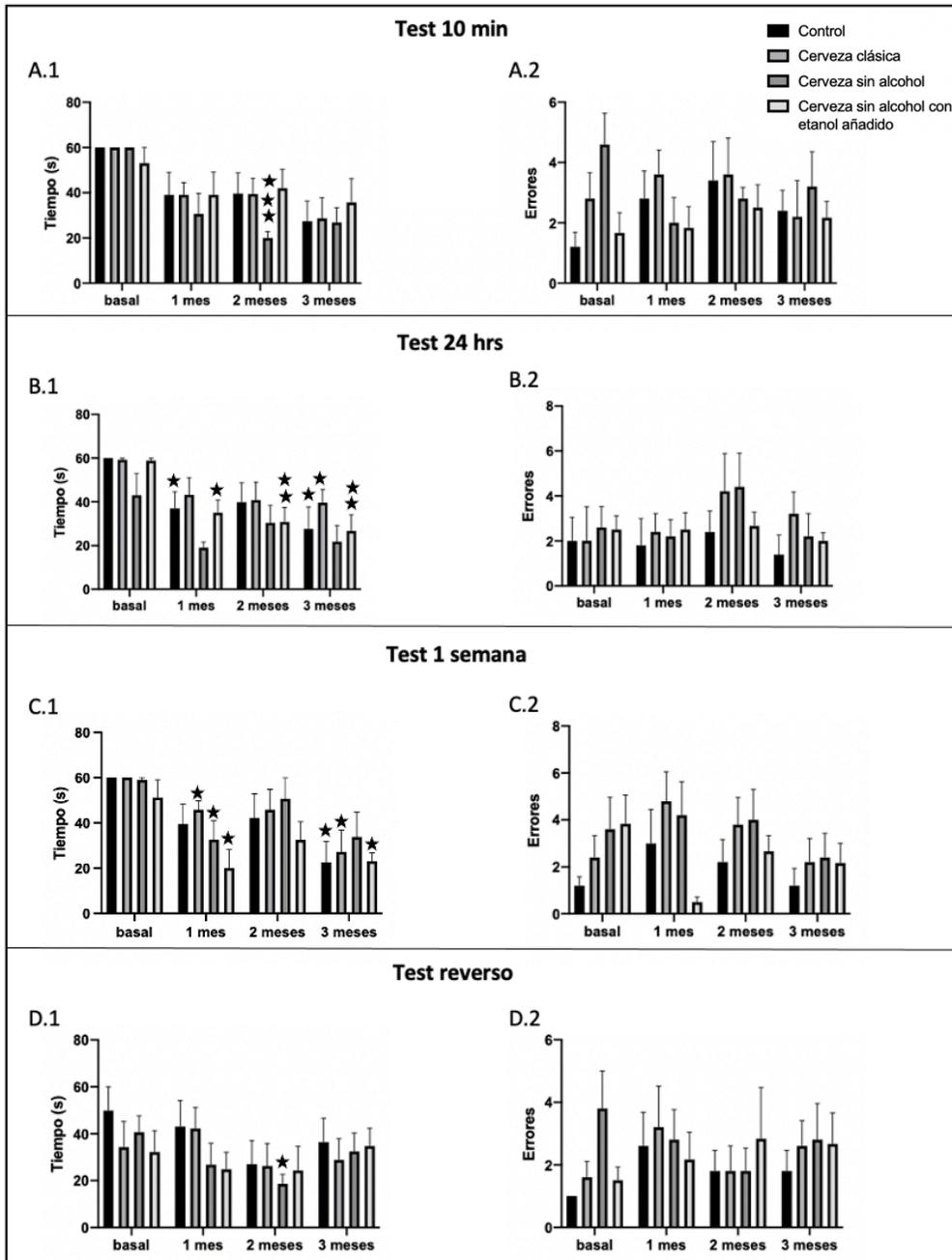


Figura 9: Resultados en hembras de los tiempos de realización del test de Barnes y de los errores a los 10 mins, a las 24 horas, a la semana y en el reverso durante todo el tratamiento. **A.1, B.1, C.1 y D.1:** Tiempo de realización del test a los 10 min, 24 hrs, 1 semana de la última sesión de entrenamiento y durante el test reverso, respectivamente. El análisis estadístico con ANOVA de dos vías presenta una diferencia estadísticamente significativa en el factor tiempo (respectivamente, $F(2,654, 45,11) = 16,05$, $p\text{-valor} < 0.001$; $F(2,414, 41,04) = 14,80$, $p\text{-valor} < 0.001$; $F(2,081, 34,68) = 12,79$, $p\text{-valor} < 0.001$; $F(2,835, 48,19) = 4,294$, $p\text{-valor} = 0.01$). **A.2, B.2, C.2 y D.2:** Número de errores en el test a los 10 min, 24 hrs, 1 semana y reverso, respectivamente. El análisis estadístico de datos con ANOVA de dos vías no dio significación para ningún factor. ★: $p\text{-valor} < 0.05$ en el test post-hoc de *Tukey* comparando los datos respecto a su valor basal.

En el caso de las **hembras**, los resultados en el test de 10 minutos mostraron una significación para el factor tiempo con un $p\text{-valor}<0.001$ (figura 9 A.1). Estos datos revelan que en el grupo *Cerveza sin alcohol*, la memoria a corto plazo mejora significativamente con el tiempo, ya que se encontraron diferencias entre los resultados basales del tiempo con respecto al segundo y tercer mes para este grupo ($p\text{-valor}<0.001$ y $p\text{-valor}=0.024$, respectivamente). Para el resto de grupos se observa también una tendencia a mejorar la memoria a corto plazo, ya que los T_B a lo largo del tratamiento son menores que los basales, aunque sin llegar a alcanzar significancia estadística. Sin embargo, en el caso del nE_B (figura 9 A.2), existe una tendencia a cometer más errores a lo largo del tratamiento en el caso de todos los grupos, excepto el grupo *Cerveza sin alcohol*, coincidiendo con la disminución significativa del T_B .

En el test 24 hrs, se encontró una significación en el factor tiempo con un $p\text{-valor}<0.0001$ (figura 9 B.1). Estas diferencias se encuentran en los grupos *Control*, *Cerveza clásica* y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido*, los cuales disminuyeron a lo largo del tratamiento el T_B . En el caso del grupo *Control*, el T_B disminuye en el segundo mes ($p\text{-valor}=0.0398$), para mantenerse estable en el segundo (sin diferencias significativas) y disminuir en el último mes ($p\text{-valor}=0.0319$). En el caso del grupo *Cerveza clásica*, se observa una tendencia a disminuir el T_B que se confirma en el último mes con diferencias significativas respecto al basal ($p\text{-valor}=0.0342$). Finalmente, el grupo *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* presenta una disminución significativa a lo largo de todo el tratamiento respecto a los datos basales ($p\text{-valor}=0.0147$ para el primer mes, $p\text{-valor}=0.0075$ para el segundo mes y $p\text{-valor}=0.009$ para el tercer mes). Esto indica que la memoria a largo plazo mejora significativamente en el tiempo para estos grupos. El único grupo para el que no se encontraron diferencias significativas fue el grupo *Cerveza sin alcohol*, pero debe considerarse que parte de un valor basal más bajo. En este grupo se observa una tendencia a disminuir el T_B en el primer y tercer mes, mientras que en el segundo tiende a aumentar, pero sin alcanzar los valores basales. La disminución significativa del T_B en el grupo *Control* se ve reflejada también en la tendencia a disminuir el nE_B (figura 9 B.2). Sin embargo, en los otros grupos el nE_B tiende a aumentar, excepto en el grupo *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* que se mantiene estable.

Esta mejora de la memoria a largo plazo observada en el T_B a lo largo del tratamiento se observa también en el test 1 semana (figura 9 C.1) ya que se encontraron diferencias significativas en el factor tiempo ($p\text{-valor}<0.001$). El grupo *Control* presenta una tendencia a disminuir el T_B a lo largo de los meses, que se confirma en el tercer mes ($p\text{-valor}=0.016$). El grupo *Cerveza clásica* también disminuye el T_B de forma significativa en los meses 1 y 3 ($p\text{-valor}=0.022$ y 0.026), así como el grupo *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* ($p\text{-valor}=0.022$ y 0.037). El grupo *Cerveza sin alcohol* presenta únicamente diferencias significativas entre los resultados basales y el primer mes ($p\text{-valor}=0.047$), ya que en el segundo mes aumenta el T_B y en el tercero tiende a igualarse al primero. Esta tendencia a disminuir el T_B en todos los grupos se ve reflejada en el nE_B (figura 9 C.2). Aunque los errores experimentan variaciones entre los meses (sobre todo en el primer mes, donde aumentan los errores en todos los grupos excepto el grupo *Cerveza sin alcohol con etanol añadido*), en el tercer mes éstos son menores que en el mes 0 y el mes 2, indicando así una tendencia a mejorar el nE_B .

En relación al test reverso, existe una tendencia global en todos los grupos a disminuir el T_B (figura 9 D.1), indicando una mejora en el reaprendizaje o en la modificación de recuerdos con el tiempo. Se encontraron diferencias significativas en el factor tiempo (p -valor <0.01), pero únicamente para el grupo *Cerveza sin alcohol* entre los datos basales y el segundo mes (p -valor=0.018), ya que, a pesar de presentar una tendencia a disminuir el T_B a lo largo del tratamiento, éste vuelve a aumentar en el tercer mes. Ocurre lo mismo para este grupo en el caso del nE_B (figura 9 D.2), pero sin presentar diferencias significativas en este caso. Para los demás grupos, los errores tienden a aumentar, lo cual implicaría un empeoramiento en el reaprendizaje, lo que supone una cierta discrepancia con los datos del T_B .

En el caso de los **machos**, no se encontraron diferencias significativas para ningún factor en los tests de 10 minutos, ni en el de 24 hrs ni en el test 1 semana con respecto al T_B (figura 10 A.1). De todas formas, en el caso del test de 10 minutos se observa alguna tendencia, como es el caso del grupo *Cerveza sin alcohol con etanol añadido*, el cual tiende a aumentar el T_B a lo largo del tratamiento. Los demás grupos varían mucho. El grupo *Control* disminuye el T_B en el segundo mes pero vuelve a aumentar en el tercer mes, superando así el T_B basal. De esta forma, se observa una tendencia a empeorar en la realización del test en estos dos grupos. Mientras tanto, el grupo *Cerveza clásica* y *Cerveza sin alcohol* tienden a mantenerse estables (aunque el primero disminuye mucho el T_B de forma puntual en el segundo mes). Con respecto al nE_B (figura 10 A.2) no se encontraron diferencias significativas para ningún factor. Los grupos *Control* y *Cerveza sin alcohol* se mantienen bastante estables a lo largo del tratamiento, mientras que el grupo *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* experimenta una tendencia a disminuir los errores hasta el segundo mes para volver a aumentar en el tercero. El grupo con *Cerveza clásica* se mantiene estable hasta el tercer mes, momento en el que realiza más errores.

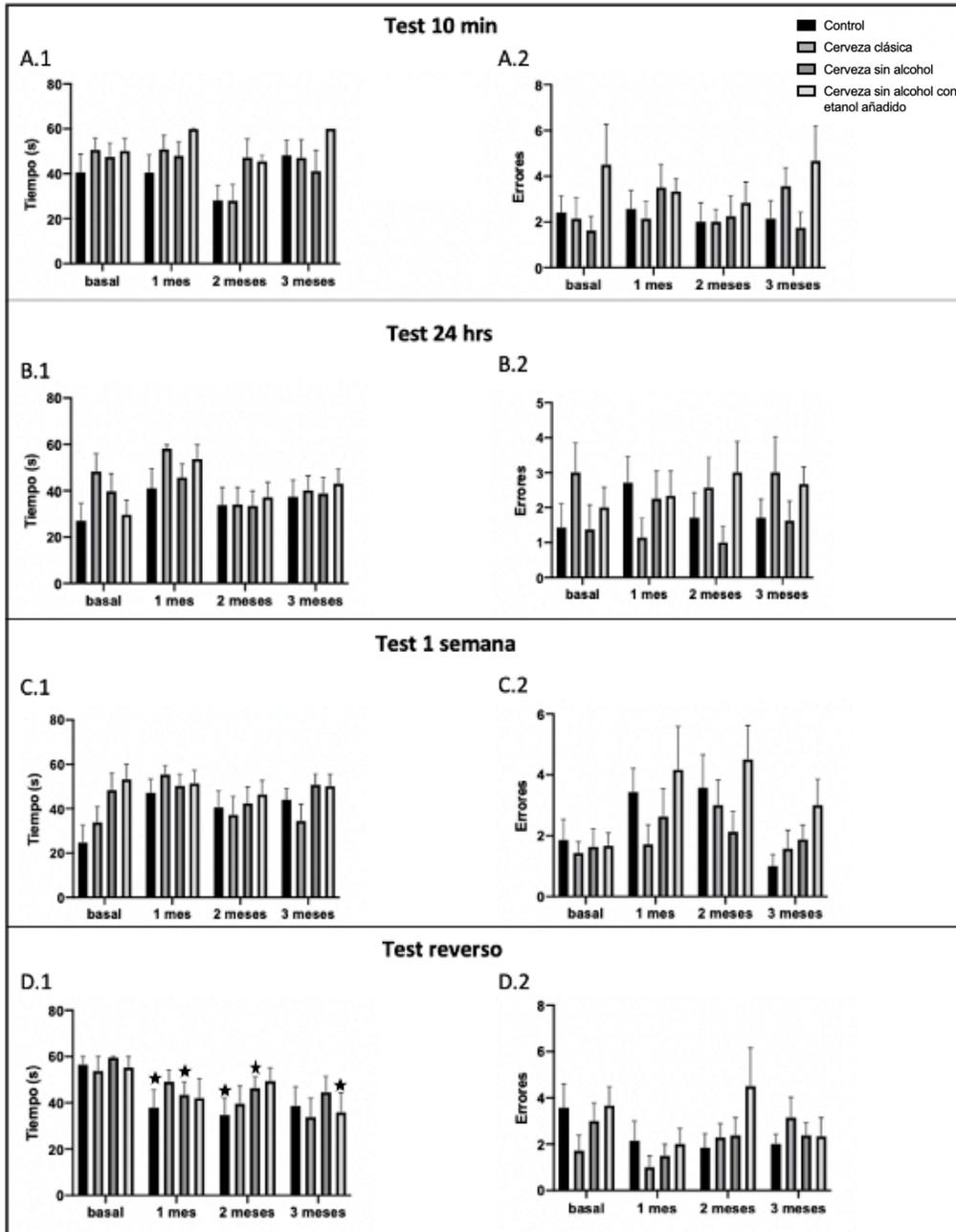


Figura 10: Resultados en machos de los tiempos de realización del test de Barnes y de los errores a los 10 mins, a las 24 horas, a la semana y en el reverso durante todo el tratamiento. **A.1, B.1, C.1 y D.1:** Tiempo de realialización del test a los 10 min, 24 hrs, 1 semana de la última sesión de entrenamiento y durante el test reverso, respectivamente. **A.1:** El análisis estadístico con ANOVA de dos vías presenta una diferencia estadísticamente significativa en el factor tiempo ($F(2,303, 47,59) = 3,821, p\text{-valor} = 0.24$). **B.1, C.1:** El análisis estadístico de datos con ANOVA de dos vías no dio significación para ningún factor. **D.1:** El análisis estadístico con ANOVA de dos vías presenta una diferencia estadísticamente significativa en el factor tiempo ($F(2,623, 62,95) = 6,659, p\text{-valor} < 0.001$). **A.2, B.2, C.2 y D.2:** Número de errores en el test a los 10 min, 24 hrs, 1 semana y reverso, respectivamente. El análisis estadístico de datos con ANOVA de dos vías no dio significación para ningún factor. ★: $p\text{-valor} < 0.05$ en el test post-hoc de *Tukey* comparando los datos respecto a su valor basal.

Con respecto al tiempo de realización del test (T_B) 24 hrs (figura 10 B.1), a pesar de no encontrarse diferencias significativas en ningún grupo y ningún factor, se observa una tendencia en los grupos *Control* y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* a aumentar el tiempo, al igual que con el nE_B (figura 10 B.2). Esto indica un empeoramiento en la realización del test a lo largo del tratamiento, y por lo tanto, en la memoria a largo plazo. En los grupos *Cerveza clásica* y *Cerveza sin alcohol* se observa un aumento en el T_B en el primer mes, pero después tiende a disminuir. El nE_B en el caso de estos dos grupos varía mucho a lo largo del tratamiento, por lo que no se observa ninguna tendencia relevante o mantenida. Además, existe una notable variabilidad entre grupos en los resultados basales, destacando el grupo *Control* como el que más errores comete.

En el test de una semana no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el T_B para ningún factor (figura 10 C.1). Sin embargo, se observa una tendencia a aumentar el mismo en el grupo *Control*, es decir, un empeoramiento en la memoria a largo plazo. En el caso del grupo *Cerveza clásica*, el T_B aumenta en el primer mes con respecto al valor basal pero se mantiene estable posteriormente hasta el final del tratamiento. El T_B de los grupos *Cerveza sin alcohol* y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* varía levemente a lo largo del tratamiento pero tiende a mantenerse estable. Con respecto al nE_B (figura 10 C.2), en el grupo *Control* experimenta un aumento hasta el segundo mes pero disminuye considerablemente en el tercer mes, evidenciando así un aprendizaje a largo plazo sin ningún tratamiento. Los grupos *Cerveza clásica* y *Cerveza sin alcohol* se mantienen estables durante todos los meses excepto en el segundo mes, donde experimentan un aumento en la cantidad de errores. El grupo *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* aumenta su nE_B de forma considerable durante el primer y segundo mes respecto al basal, pero disminuye en el tercer mes, produciéndose una mejora en la memoria a largo plazo en el último mes para este grupo, aunque en ningún caso se detectan diferencias significativas.

En cambio, durante la realización del test reverso (figura 10 D.1), se detectaron diferencias significativas en el factor tiempo (p -valor <0.001) y las comparaciones múltiples mediante el test de *Tukey* detectó diferencias en el grupo *Control* entre los datos basales y el primer mes (p -valor=0.0322) y el segundo mes (p -valor=0.0118). Y aunque en el tercer mes no se encuentran diferencias significativas con respecto a los T_B , la tendencia es a disminuir este tiempo, así como el nE_B para este grupo, lo cual implica una mejora en el reaprendizaje a largo plazo. Para el grupo *Cerveza sin alcohol* y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* la tendencia es la misma. En el grupo *Cerveza sin alcohol* se encuentran diferencias significativas en el primer mes (p -valor=0.0197) y el segundo (p -valor=0.0329) con respecto al basal. En el grupo *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* las diferencias son entre el tercer mes y el basal (p -valor=0.0416). Para el grupo *Cerveza clásica* también se observa una tendencia a disminuir el T_B , aunque sin diferencias significativas en ningún mes con respecto al basal. Esta aparente mejora en el reaprendizaje de los grupos en general, sólo se ve reflejada en el nE_B para el grupo *Control* (figura 10 D.2), como ya se ha comentado. Sin embargo, los otros grupos varían a lo largo del tratamiento, con cierta tendencia a aumentar en el caso del grupo *Cerveza clásica*. El grupo *Cerveza sin alcohol* a lo largo del tratamiento realiza menos errores que en el mes 0 pero se observa una tendencia a que aumenten. Finalmente, el grupo *Cerveza sin alcohol con etanol añadido* disminuye el nE_B en el primer y tercer mes, pasando por un aumento considerable de errores en el segundo mes.

COORDINACIÓN MOTORA (ROTA-ROD)

Los resultados basales obtenidos en el presente proyecto relativos a la coordinación motora analizada mediante la prueba del Rota-rod también puso de manifiesto diferencias significativas entre los valores obtenidos en ratas macho y hembras viejas de la misma edad. Así al parecer las hembras presentan una mejor coordinación que los machos ($F=14.37$, $df=47$, $p<0.05$) (figura 11 C). Por otro lado, en la figura 11A se muestran los resultados obtenidos en el test de Rota-rod a lo largo del tratamiento. En la figura 11A se observan los datos del tiempo que permanecieron las ratas encima del cilindro rotatorio (T_{RR}) de las hembras, mientras que en la figura 11B aparecen los datos de las ratas macho.

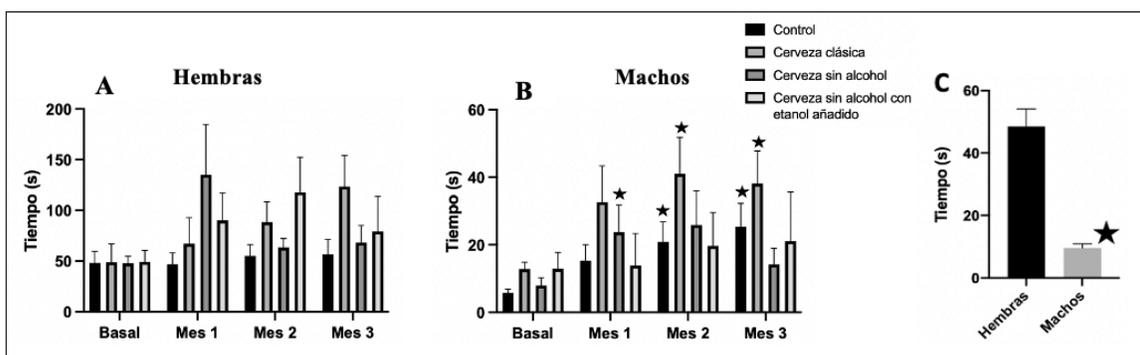


Figura 11: Datos del tiempo de permanencia (s) en el Rota-rod en machos y hembras. **A y B** (derecha y centro): Resultados del test Rota-rod a lo largo de todo el tratamiento. **A:** Tiempo (s) de realización del test en hembras, resultado de la media aritmética de los resultados de cada individuo (5 repeticiones). El análisis estadístico de datos con ANOVA de dos vías no dio significación para ningún factor. **B:** Tiempo (s) de realización del test en machos. El análisis estadístico de datos con ANOVA de dos vías dio significación en el factor tiempo ($F_{(2,913, 63,12)}=6.901$, p valor <0.001).★: p -valor <0.05 en el test post-hoc de *Tukey* comparando los datos respecto al valor basal. **C** (izquierda): Resultados basales del tiempo de permanencia. El análisis estadístico con el test *t* de *student* para la comparación de ambos grupos dio resultados significativos ($p<0.05$).★: p -valor <0.05 .

En el caso de las hembras, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos para ningún factor (p -valor $< 0,05$), pero se observa cierta tendencia a mantenerse más tiempo en el cilindro en el caso de los animales que bebieron cerveza diariamente. Sin embargo, aunque no se observaron diferencias significativas en el factor tratamiento, sí se observaron diferencias significativas en el factor tiempo en el caso de los machos ($F(2,913, 63,12) = 6,901$, p -valor <0.001). Estas diferencias se observan a través del test post-hoc *Tukey* para comparaciones múltiples, en los grupos **Control**, **Cerveza clásica** y **Cerveza sin alcohol**. En el caso del grupo **Control**, las diferencias se observan entre los datos basales y los del mes 2 y 3 (p -valor = 0.045 y 0.031, respectivamente), donde las ratas permanecieron más tiempo en el cilindro rotatorio a lo largo de los meses. En el grupo **Cerveza clásica**, las diferencias se encuentran también entre los datos basales y los meses 2 y 3 de tratamiento (p -valor = 0.046 para ambos). De la misma forma, estas diferencias son relativas a un aumento en el tiempo de permanencia durante el test a lo largo de los meses y del tratamiento. En el grupo **Cerveza sin alcohol** estas diferencias se encuentran únicamente entre los datos basales y el primer mes de tratamiento, indicando que en el primer mes el tiempo de permanencia fue mayor (p -valor = 0.035). En definitiva, parece que existe una

ligera tendencia a mejorar la coordinación motora a lo largo del tratamiento en las ratas macho y hembras que tomaron cerveza clásica; aunque con los datos presentados no existen diferencias estadísticamente significativas al realizar las comparaciones entre los grupos experimentales.

DISCUSIÓN

Ante los avances científicos de los últimos años, se ha presentado un aumento de la esperanza y la calidad de vida en los países occidentales, el cual ha provocado un incremento notable de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas (Sánchez-Muniz et al., 2019). Estas enfermedades conllevan a desórdenes cognitivos, cuyo resultado es una alteración de la memoria y la coordinación motora (Ramis et al., 2016), los cuales crean un alto grado de dependencia. Con la finalidad de retrasar el envejecimiento (y sus consecuencias), se han realizado estudios sobre el efecto de los antioxidantes, entre los cuales se encuentran los polifenoles, los cuales parecen jugar un papel en la prevención de varias enfermedades crónicas importantes asociadas con el estrés oxidativo, entre las que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas (Martinez-Gomez, Caballero y Blanco, 2020). Por esta razón, los polifenoles se presentan como posibles nuevos agentes terapéuticos anti-envejecimiento (Spencer et al., 2012). La cerveza, además de ser una de las bebidas alcohólicas más consumidas en el mundo (Colen & Swinnen, 2010), se presenta como un compuesto rico en polifenoles (Chiva-Blanch, 2014). En base a estos hechos, el objeto de este estudio se centra en la cerveza y sus efectos en el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento, ya que, en humanos y ratas, la edad es un factor que provoca un declive en la cognición y altera la morfología de las áreas cerebrales que participan en la cognición (Gawel et al., 2019).

Los resultados del presente estudio demuestran que el consumo moderado de cerveza de forma diaria no afecta al peso de los animales (figura 7). Esto coincide con estudios en humanos, donde se ha estudiado la relación entre el peso y consumo diario de cerveza en hombres y mujeres (Romeo et al., 2007). Aunque los datos obtenidos en el presente proyecto muestran una ligera tendencia a disminuir el peso en todos los grupos, tanto en las ratas macho como en hembras (figura 7), en otros estudios en humanos se ha observado que los hombres aumentan de peso con el consumo de alcohol (Wannamethee & Shaper, 2003). No obstante, la edad de los sujetos en dicho estudio era de 40-59 años, con lo cual los datos de este estudio no serían extrapolables o comparables a estos otros estudios realizados en humanos. Por otro lado, otro estudio realizado el siguiente año se observó que en mujeres el consumo moderado de cerveza no tenía efectos en el peso de las mujeres (Wannamethee et al., 2004), lo cual coincide con nuestros resultados en el caso de las ratas hembra, aunque también difieren en la edad de los sujetos.

Además, de acuerdo con otros estudios que buscan una relación entre la mortalidad y el alcohol (Poikolainen, 1995; Dawson, 2000), se observa que el grupo control (extrapolable al grupo de abstemios de estos dos estudios) es el que obtiene la menor tasa de supervivencia. Por esta razón, en ambos estudios concluyen que el consumo moderado de alcohol aumenta la esperanza de vida. Sin embargo, en el estudio de Renaud et al. (1999), no se observó una

reducción en la tasa global de mortalidad en los consumidores moderados de cerveza, aunque el tamaño muestral en este estudio fue muy limitado.

La memoria espacial de referencia, mediante la cual se recuerda una información determinada tras una serie de entrenos, se evaluó mediante el test de **Barnes** (figura 9). En las **hembras**, se observó que la memoria a largo plazo (test 24 hrs) mejoraba en todos los grupos de forma general (incluido el grupo control), por lo que todos los tipos de cerveza utilizadas en este estudio podrían ser beneficiosas para la memoria a largo plazo durante el envejecimiento. Apoyando esta idea, en el test de 1 semana ocurre lo mismo, ya que en todos los grupos se observa una mejora de la memoria a largo plazo. Sin embargo, aunque en el test de 10 minutos y en el reverso sólo se observaron diferencias significativas para el grupo que consumió *Cerveza sin alcohol*, la tendencia en el test de 10 minutos es a disminuir el tiempo en todos los grupos. No obstante, en estudios anteriores (Jones & Jones, 1980) se ha demostrado que el consumo de alcohol y la edad en las mujeres afectan negativamente a la memoria a corto plazo, lo cual no coincide con los datos obtenidos en el caso de las hembras que consumieron *Cerveza clásica* en nuestro proyecto. No obstante, cabe destacar que los sujetos de este estudio de 1980 tenían entre 21 y 55 años, de forma que no sería realmente comparable con los resultados obtenidos en el presente proyecto.

En cuanto a los **machos**, y al contrario que las hembras, únicamente se observaron diferencias significativas en el factor tratamiento en el test reverso para los grupos *Cerveza sin alcohol* y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido*, lo cual indicaría que los beneficios de la cerveza en el reaprendizaje estarían más relacionados con la fracción no alcohólica de la cerveza (Chiva-Blanch, 2014). No obstante, las diferencias encontradas en este proyecto son muy sutiles con respecto al grupo *Control*. Este aspecto se confirma con el número de errores, en el cual no se observaron diferencias significativas para ningún factor en ningún grupo de machos ni de hembras. Además, los datos tanto del T_B como del nE_B son muy dispares, por lo que los resultados no son concluyentes. Esto puede deberse a que quizás el método no sea el más preciso para evaluar la memoria espacial de referencia, ya que ha de tenerse en cuenta que las ratas, al tener una naturaleza exploradora, no siempre entran en el *target* cuando lo encuentran, y a medida que se van familiarizando con el entorno el estrés inicial disminuye y buscan otras alternativas (Harrison et al., 2006). Por esta razón, es posible que realmente no haya diferencias entre los tratamientos.

A pesar de la evidencia de que el estradiol (la hormona gonadal femenina) tiene efectos positivos sobre el aprendizaje y la memoria en animales y en humanos, no se ha encontrado una clara diferencia de género en el aprendizaje espacial en la mayoría de estudios con ratas y ratones (Gawel et al., 2019). Sin embargo, los estudios en los que sí se ha observado una diferencia entre machos y hembras, éstas indicaban que los ratones y las ratas macho tenían mejores resultados que las hembras en el test de Barnes (Barrett et al., 2009). Los datos de este estudio coinciden con los resultados obtenidos en el presente proyecto en relación al tiempo de realización del test, ya que se observa que de forma general las hembras tardaban más tiempo en completar el test o no lo completaban (figura 9 y figura 10). Sin embargo, los resultados obtenidos en el test reverso muestran lo contrario, ya que se aprecia que las hembras tardan ligeramente menos que los machos, contrariamente a lo que se ha encontrado en otros estudios, donde observaron que los machos tienen un mejor rendimiento de la memoria y mayores efectos de reversión (O'Leary & Brown, 2012). Estas diferencias

comportamentales de género también pueden deberse a factores como la edad del animal, el estado hormonal, el diseño del aparato, etc (Gawel et al., 2019).

Sin embargo, en nuestros resultados del test **Radial**, se encontró que las hembras lo hacían significativamente mejor que los machos (figura 8 C), contrariamente a los estudios nombrados anteriormente. Adicionalmente, un estudio de Gawel et al. (2019) observó que el estrés afecta de forma diferente a machos y a hembras, y produce un deterioro del aprendizaje espacial y la memoria, principalmente en ratas hembra, en tests como el laberinto radial, laberinto en Y o laberinto de agua de Morris. Además, aunque se ha observado que la edad es un factor crucial en el declive de la cognición tanto para machos como hembras, el deterioro cognitivo durante el envejecimiento puede verse afectado por la pérdida de hormonas gonadales (Gawel et al., 2019). Esta intervención de diversos factores en el caso de las hembras en cuanto a su comportamiento, contradice los resultados de este proyecto, pero podría explicar la variabilidad y/o heterogeneidad de datos entre los grupos de hembras que no aparece en los machos en el test Radial.

En relación a los tratamientos con los diferentes tipos de cerveza, a pesar de no haber presentado diferencias estadísticamente significativas en el factor tiempo ni el factor tratamiento, se observa tanto en hembras como en machos una tendencia a disminuir el T_{RD} y el nE_R en el tercer mes en los grupos *Cerveza sin alcohol* y *Cerveza sin alcohol con etanol añadido*, como ocurre también en el caso del test de Barnes en los machos. Esto podría indicar que los posibles efectos beneficiosos de la cerveza sobre la cognición estarían más relacionados con la fracción no alcohólica de la cerveza (Chiva-Blanch, 2014).

Con respecto a los resultados test del **Rota-rod** se observa que existe una tendencia beneficiosa en todos los grupos en la coordinación motora al consumir cerveza (figura 11). En el caso de los machos, esta tendencia se confirma con diferencias significativas. Además, también se observa en los datos basales que las hembras permanecen durante más tiempo en el Rota-rod que los machos, indicando por tanto una mejor coordinación motora sin el efecto de ningún tratamiento. Por lo tanto, el presente estudio demuestra que el consumo crónico moderado de cerveza conlleva cambios sobre la coordinación motora. Esta coordinación motora depende en gran medida de la funcionalidad del cerebelo (Sullivan et al., 1995). Esta mejor capacidad motora en hembras está en consonancia con lo que han descrito en otros estudios (Hernandez et al., 2020). Además de una mejor coordinación motora, se ha demostrado, a través de una tarea de toma de decisiones arriesgada (RDT) en la los animales tenían que elegir entre una recompensa de comida pequeña y “segura” y una recompensa de comida grande y “arriesgada”, que la motivación o valoración del riesgo de caída es diferente en machos que en hembras, siendo éstas más reacias al riesgo (Orsini et al., 2016). Por otro lado, también podríamos considerar que al tener las hembras un tamaño más pequeño, podrían haber percibido la altura hasta el suelo como más alta que en machos, implicando por lo tanto un riesgo más alto al caer y por este motivo permanecen más tiempo. Además, esta diferencia no se debe a una mayor fuerza física por parte de las hembras, si no a una mejor coordinación motora, como demuestran Hernandez et al. (2020). Esta capacidad mejorada para permanecer en el cilindro rotatorio en hembras podría verse influenciada también por su tamaño, ya que al ser más pequeñas que los machos mantendrían una mejor condición física que éstos (Hernandez et al., 2020). Sin embargo, para confirmar esta última opción se necesitarían medidas de salud metabólica y composición corporal (cantidad de

tejido adiposo, tejido óseo, etc) que en el presente proyecto no se han analizado. A pesar de que en machos y hembras el único grupo común que mejoró significativamente el tiempo de permanencia en el Rota-rod es el que consumió *Cerveza clásica*, en los demás grupos también se observa una tendencia a mejorar la coordinación. Por lo que cabe la posibilidad de que puedan haber predominado los efectos positivos y beneficiosos del contenido polifenólico de la cerveza por encima de los efectos negativos del alcohol sobre el cerebelo (Martinez-Gomez, Caballero & Blanco, 2020) en aquellos grupos que consumieron algún tipo de cerveza con alcohol. También ha de tenerse en cuenta que existen respuestas adaptativas a estimulaciones a dosis bajas, que serían dañinas a dosis altas; es lo que se conoce como hormesis, y conllevaría a una adaptación beneficiosa, promoviendo en este caso un ambiente prooxidativo (Prickett et al., 2004). Sin embargo, este efecto no se observa en los resultados obtenidos para los otros tests. Por ejemplo, en el grupo de las machos, los que más mejoraron y redujeron el tiempo de realización del test de barnes fueron las que consumieron cerveza sin alcohol y cerveza sin alcohol con etanol añadido, igual que ocurrió en el test Radial en machos y hembras. Por ello, para poder sacar mejores conclusiones, convendría repetir el estudio aumentando el tamaño muestral y la duración del tratamiento, y quizás elevar la dosis de alcohol, ya que probablemente sería necesaria una dosis más alta para que se viese afectada la coordinación motora. El cerebelo, además, podría ser más sensible a este efecto hormético por el alcohol, mientras que otras regiones más relacionadas con la memoria no lo serían tanto (por ejemplo, el estriado o el hipocampo), ya que se ha demostrado que existe una heterogeneidad en la población glial (concretamente en la microglía), presentando el cerebelo una densidad menor de la misma (Benusa, George & Dupree, 2020).

De forma general, no se obtuvieron en los tests realizados en este proyecto resultados que demuestren diferencias muy significativas entre los diferentes tratamientos realizados. Esta falta de significación puede deberse a varios motivos. Una posibilidad podría ser que no haya realmente diferencias entre los tratamientos, debido a la dosis baja de los mismos. Otra posibilidad podría ser relativa al tamaño muestral, en referencia al número de ratas por grupo experimental, lo cual podría explicar la gran variabilidad experimental observada en los tests cognitivos realizados en este estudio, como ocurre en el estudio de Jiménez, 2017. En el caso del Rota-rod, normalmente se recomienda utilizar grupos experimentales de 8 ratas (Carter, Morton & Dunnett, 2001). Sin embargo, algunos estudios en esta área experimental han obtenido resultados significativos con tan solo 5, 6 o 7 ratas (Sarubbo et al., 2018). En nuestro caso, a pesar de haber utilizado 8 ratas, no se obtuvieron resultados significativos en el caso de las hembras, por lo que la duración del tratamiento podría ser también un factor que hubiese determinado la no significación de los resultados, ya que podría haber sido insuficiente. Además, la administración del tratamiento no fue la misma que en estudios anteriores (Ramis et al., 2016; Sarubbo et al., 2015; Sarubo et al., 2018), donde se utilizó la vía intraperitoneal para la administración de polifenoles; alfa-tocopherol (vitamina E) en Ramis et al. (2016), resveratrol en Sarubbo et al. (2015) y silimarina, quercetina y naringenin en Sarubbo et al. (2018). Sin embargo, la dosis de polifenoles administrada en dichos estudios es mucho mayor que en el presente estudio, en el cual se realizó por vía oral para simular el consumo de cerveza (y por lo tanto de polifenoles) en humanos de la forma más similar posible. De hecho, en un estudio realizado por Gu et al. (2014) se encontraron diferencias significativas a través de la administración oral de diferentes bebidas alcohólicas (simulando un consumo leve-moderado de alcohol). Sin embargo, una de las principales controversias

sobre los polifenoles es su baja biodisponibilidad por vía oral, lo que podría estar afectando en este estudio.

Cabe destacar que existen pocos estudios que hayan realizado en roedores evaluaciones conductuales en ambos sexos en un mismo estudio. Por ello, la inclusión de sujetos femeninos en los estudios futuros sobre la neurobiología del envejecimiento cognitivo es esencial, ya que en la población humana las mujeres ocupan una mayor proporción de adultos mayores y su esperanza de vida es más larga que la de los sujetos masculinos (Howden y Meyer, 2011). Además, existen varios informes con los que se concluye que no es necesario aumentar el tamaño muestral para incluir hembras, ni tampoco es necesario tener en cuenta la fase del ciclo estral, a pesar de que comúnmente se indique como una razón para excluir a los sujetos femeninos (Hernandez et al., 2020).

CONCLUSIONES

- Las hembras de este estudio obtuvieron mejores resultados en la coordinación motora y en la memoria de trabajo espacial, mientras que los machos en el aprendizaje basado en la memoria visulo-espacial.
- El consumo crónico moderado de cerveza no modifica el peso corporal en ratas envejecidas, independientemente del sexo.
- La tasa de supervivencia no se ve afectada por el consumo crónico moderado de cerveza, ni en machos ni en hembras.
- El consumo crónico moderado de cerveza no tiene efectos negativos sobre el aprendizaje o la memoria en ratas envejecidas.
- El aprendizaje basado en la memoria visulo-espacial a corto y largo plazo tiende a mejorar con el consumo crónico moderado de cerveza, principalmente con la cerveza sin alcohol.
- La memoria de trabajo tiende a mejorar con el consumo crónico moderado de cerveza sin alcohol.
- La coordinación motora tiende a mejorar con el consumo crónico moderado de cerveza con alcohol en ratas macho de edad avanzada. A pesar de ello, las ratas hembra poseen una mejor coordinación motora que los machos.

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados presentaron tendencias en la mejora cognitiva por la acción de la cerveza, pero en la mayoría de los casos sin grandes diferencias significativas. Probablemente, un tratamiento superior a tres meses o un tamaño muestral superior habría dado diferencias significativas. De esta forma, para futuros estudios similares podría ser recomendable iniciar los experimentos con ratas más jóvenes que las utilizadas en este proyecto, de forma que se pueda alargar la duración del tratamiento, así como realizar un estudio de dosis-respuesta para analizar si dosis superiores suponen un mayor impacto, o establecer diferentes dosis de cerveza diaria extrapolable al consumo bajo, moderado o elevado en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

Abe O, Aoki S, Hayashi N, Yamada H, Kunimatsu A, Mori H, ... & Ohtomo K. (2002). Normal aging in the central nervous system: quantitative MR diffusion-tensor analysis. *Neurobiology of aging*, 23(3), 433-441.

Allen JS, Bruss J, Brown, CK, & Damasio, H. (2005). Normal neuroanatomical variation due to age: the major lobes and a parcellation of the temporal region. *Neurobiology of aging* 26(9), 1245-1260.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 3rd edn (DSM-III). Washington, DC: *American Psychiatric Association*, 1980: 124–26.

Anstey KJ, Jorm AF, Rejlade-Meslin C, Maller J, Kumar R, von Sanden C, et al. Weekly alcohol consumption, brain atrophy, and white matter hyperintensities in a community-based sample aged 60 to 64 years. *Psychosom Med.*, 2006: 68, 778–785.

Arranz S; Valderas-Martínez P; Chiva-Blanch G; Medina-Remón A; Lamuela-Raventós RM; Estruch R. Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. *Nutrients*, 2012: 4, 759–781.

Bagi Z, Cseko C, Toth E, Koller A. Oxidative stress-induced dysregulation of arteriosal wall shear stress and blood pressure in hyperhomocysteinemia is prevented by chronic vitamin C treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003: 285:H2277–H83.

Barnes C. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*: 93(1), 74–104.

Barrett GL, Bennie A, Trieu J, Ping S, Tsafoulis C (2009). The chronology of age-related spatial learning impairment in two rat strains, as tested by the Barnes maze. *Behav Neurosci* 123, 533–538.

Barrientos RM, Frank MG, Hein AM, Higgins EA, Watkins LR, Rudy JW, & Maier, SF. (2009). Time course of hippocampal IL-1 β and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection. *Brain, behavior, and immunity*: 23(1), 46-54.

Benton AL, & Sivan AB. (1984). Problems and conceptual issues in neuropsychological research in aging and dementia. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 6(1), 57-63.

Benusa SD, George NM, & Dupree JL. (2020). Microglial heterogeneity: distinct cell types or differential functional adaptation?. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 7(3), 248-263.

Burke SN, & Barnes CA. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature reviews neuroscience*, 7(1), 30-40.

Butters N. (1985). Alcoholic Korsakoff's syndrome: Some unresolved issues concerning etiology, neuropathology, and cognitive deficits. *Journal of clinical and Experimental Neuropsychology*, 7(2), 181-210.

Cabeza R. (2001). Cognitive neuroscience of aging: contributions of functional neuroimaging. *Scandinavian journal of psychology*, 42(3), 277-286.

Cabeza R, Anderson ND, Locantore JK, & McIntosh AR. (2002). Aging gracefully: compensatory brain activity in high-performing older adults. *Neuroimage*, 17(3), 1394-1402.

Caligiuri ME, Perrotta P, Augimeri A, Rocca F, Quattrone A, & Cherubini A. (2015). Automatic detection of white matter hyperintensities in healthy aging and pathology using magnetic resonance imaging: a review. *Neuroinformatics*, 13(3), 261-276.

Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor Coordination and Balance in Rodents. *Curr Protoc Neurosci.* 2001;15(1):8.12.1-8.12.14.

Chiva-Blanch G, Magraner E, Condines X, Valderas-Martínez P, Roth I, Arranz S, Casas R, Navarro M, Hervas A, Sisó A et al. Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: A randomized feeding trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2014, 25, 36–45.

Colen L, & Swinnen JF. (2010). Beer Drinking Nations. *The Determinants of Global Beer Consumption* (No. 270). LICOS Discussion paper.

Costa R, Rodrigues I, Guardão L, Rocha-Rodrigues S, Silva C, Magalhães J, ... & Soares R. (2017). Xanthohumol and 8-prenylnaringenin ameliorate diabetic-related metabolic dysfunctions in mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 45, 39-47.

Dawson DA. (2000). Alcohol consumption, alcohol dependence, and all-cause mortality. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(1), 72-81.

de Bruin EA, Hulshoff Pol HE, Schnack HG, Janssen J, Bijl S, Evans AC, et al. Focal brain matter differences associated with lifetime alcohol intake and visual attention in male but not in female non-alcohol- dependent drinkers. *Neuroimage*. 2005; 26, 536–545.

De Gaetano G, Costanzo S, Di Castelnuovo A, Badimon L, Bejko D, Alkerwi AA, ... & Iacoviello L. (2016). Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 26(6), 443-467.

den Heijer T, Vermeer SE, van Dijk EJ, Prins ND, Koudstaal PJ, van Duijn CM, et al. Alcohol intake in relation to brain magnetic resonance imaging findings in older persons without dementia. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:992–997.

Dolcos F, Rice HJ, & Cabeza R. (2002). Hemispheric asymmetry and aging: right hemisphere decline or asymmetry reduction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 26(7), 819-825.

Ding J, Eigenbrodt ML, Mosley TH Jr, Hutchinson RG, Folsom AR, Harris TB, et al. Alcohol intake and cerebral abnormalities on magnetic resonance imaging in a community-based population of middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke*. 2004; 35, 16–21

Edelstein SL, Kritz-Silverstein D, & Barrett-Connor E. (1998). Prospective association of smoking and alcohol use with cognitive function in an elderly cohort. *Journal of Women's Health*, 7(10), 1271-1281.

FAO (2011). Food Balance Sheet. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>.

Fitzpatrick-Lewis D, Ali MU, Warren R, et al. Screening for mild cognitive impairment: a systematic review. *CMAJ Open* 2015; 3:E419.

Fjell AM, McEvoy L, Holland D, Dale AM, Walhovd KB, & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2014). What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Progress in neurobiology*, 117, 20-40.

Fjell AM, Sneve MH, Storsve AB, Grydeland H, Yendiki A, & Walhovd KB. (2016). Brain events underlying episodic memory changes in aging: a longitudinal investigation of structural and functional connectivity. *Cerebral cortex*, 26(3), 1272-1286.

Fusco D, Colloca G, Monaco MRL, & Cesari M. (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical interventions in aging*, 2(3), 377.

Gallagher M, Stocker AM, & Koh MT. (2011). Mindspan: lessons from rat models of neurocognitive aging. *ILAR journal*, 52(1), 32-40.

Ganguli M, Vander Bilt J, Saxton JA, Shen C, & Dodge HH. (2005). Alcohol consumption and cognitive function in late life: a longitudinal community study. *Neurology*, 65(8), 1210-1217.

Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, Petersen RC, Ritchie K, Broich K, ... & Cummings JL. (2006). Mild cognitive impairment. *The lancet*, 367(9518), 1262-1270.

Gawel K, Gibula E, Marszalek-Grabska M, Filarowska J, & Kotlinska JH. (2019). Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 392(1), 1-18.

Geda YE. (2012). Mild cognitive impairment in older adults. *Current psychiatry reports*, 14(4), 320-327.

Gemma C, Vila J, Bachstetter A, & Bickford PC. (2007). Oxidative stress and the aging brain: From theory to prevention.

Gerhardstein P, Peterson MA, & Rapcsak SZ. (1998). Age-related hemispheric asymmetry in object discrimination. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*, 20(2), 174-185.

Glisky EL. Changes in cognitive function in human aging. In: Riddle DR, editor. *Brain aging: models, methods, and mechanisms*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Available: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3885/ (accessed 2021 Sept. 13).

Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, & Johnson RW. (2005). Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice after activation of the peripheral innate immune system. *The FASEB journal*, 19(10), 1329-1331.

Gracia Rebled AC, Santabárbara Serrano J, López Antón R, Tomás Aznar C, & Marcos Aragüés G. (2017). Ocupación laboral y riesgo de deterioro cognitivo y demencia en personas mayores de 55 años: una revisión sistemática. *Revista Española de Salud Pública*, 90, e50001.

Gur RC, Gur RE, Obrist WD, Skolnick BE, & Reivich M. (1987). Age and regional cerebral blood flow at rest and during cognitive activity. *Archives of general psychiatry*, 44(7), 617-621.

Gu Y, Scarmeas N, Short EE, Luchsinger, JA, DeCarli C, Stern Y, ... & Brickman AM. (2014). Alcohol intake and brain structure in a multiethnic elderly cohort. *Clinical Nutrition*, 33(4), 662-667.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1957; 2, 298–300.

Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 1972; 20, 145–7.

Harrison FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, McDonald MP. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn Mem.* 2006; 13(6):809-819.

Hedman AM, van Haren NE, Schnack HG, Kahn RS, & Hulshoff Pol HE. (2012). Human brain changes across the life span: a review of 56 longitudinal magnetic resonance imaging studies. *Human brain mapping*, 33(8), 1987-2002.

Hernandez AR, Truckenbrod LM, Campos KT, Williams SA, & Burke SN. (2020). Sex differences in age-related impairments vary across cognitive and physical assessments in rats. *Behavioral neuroscience*, 134(2), 69.

Holmes C, & Butchart J. (2011). Systemic inflammation and Alzheimer's disease.

Howden LM, & Meyer JA. (2011). *Age and sex composition, 2010*. US Department of Commerce, Economics and Statistics Administration, US Census Bureau.

Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Cohen LA, Martin RL. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry* 1982; *140*, 566–72.

Jiménez M. Análisis de La Eficacia de Un Tratamiento de Microinmunoterapia En La Prevención Del Deterioro Cognitivo Relacionado Con La Edad En Un Modelo de Rata.; 2017. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor Coordination and Balance in Rodents. *Curr Protoc Neurosci.* 2001; *15*(1), 8.12.1-8.12.14.

Jones MK, Jones BM. The relationship of age and drinking habits to the effects of alcohol on memory in women. *J Stud Alcohol.* 1980; *41*(1):179-186.

Kalyvianaki K, Malamos P, Mastrodimou N, Manoura-Zonou I, Vamvoukaki R, Notas G, ... & Kampa M. (2020). Toxicity evaluation of an essential oil mixture from the Cretan herbs thyme, Greek sage and Cretan dittany. *npj Science of Food*, *4*(1), 1-8.

Kaplan NM, Palmer BF, & Denke MA. (2000). Nutritional and health benefits of beer. *The American journal of the medical sciences*, *320*(5), 320-326.

Kinsella K. (2000). Demographic dimensions of global aging. *Journal of family issues*, *21*(5), 541-558.

Kolosova NG, Shcheglova TV, Sergeeva SV, Loskutova LV. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats. *Neurobiol Aging.* 2006;*27*(9):1289–97.

Koren D, Kun S, Hegyesné Vecseri B, Kun-Farkas G. Study of antioxidant activity during the malting and brewing process. *J. Food Sci. Technol.* 2019, *56*, 3801–3809.

Li SC, Lindenberger U, & Sikström S. (2001). Aging cognition: from neuromodulation to representation. *Trends in cognitive sciences*, *5*(11), 479-486.

Lin JS, O'Connor E, Rossom RC, et al. Screening for cognitive impairment in older adults: a systematic review for the US Pre-ventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2013; *159*, 601-12.

Liu H, Wang L, Geng Z, Zhu Q, Song Z, Chang R, & Lv H. (2016). A voxel-based morphometric study of age-and sex-related changes in white matter volume in the normal aging brain. *Neuropsychiatric disease and treatment*, *12*, 453.

Liu H, Yang Y, Xia Y, Zhu W, Leak RK, Wei Z, ... & Hu X. (2017). Aging of cerebral white matter. *Ageing research reviews*, *34*, 64-76.

Lobo A, Saz P, Marcos G, et al. Prevalence of dementia in a southern European population in two different time periods: The ZARADEMP project. *Acta Psychiatr Scand.* 2007; *116*(4):299.

Luchsinger JA, Tang MX, Siddiqui M, Shea S, & Mayeux R. (2004). Alcohol intake and risk of dementia. *Journal of the American Geriatrics Society*, 52(4), 540-546.

Lugasi, A. (2003). Polyphenol content and antioxidant properties of beer. *Acta Alimentaria*, 32(2), 181-192.

Ma G, & Chen Y. (2020). Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis. *Journal of Functional Foods*, 66, 103829.

Magni G, Marinelli A, Riccio D, Lecca D, Tonelli C, Abbracchio MP, ... & Ceruti S. (2018). Purple corn extract as anti-allodynic treatment for trigeminal pain: role of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 378.

Maguire EA, & Frith CD. (2003). Lateral asymmetry in the hippocampal response to the remoteness of autobiographical memories. *Journal of Neuroscience*, 23(12), 5302-5307.

Manly JJ, Tang M, Schupf N, et al. Frequency and course of mild cognitive impairment in a multiethnic community. *Ann Neurol* 2008; 63, 494-506.

Martinez-Gomez A, Caballero I, & Blanco CA. (2020). Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*, 10(3), 400.

Martínez N, Casós K, Simonetti P, Sáiz MP, Moreno JJ, & Mitjavila MT. (2013). De-alcoholised white and red wines decrease inflammatory markers and NF- κ B in atheroma plaques in apoE-deficient mice. *European journal of nutrition*, 52(2), 737-747.

Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research” *J Nutr.* 2003; 133(Suppl 3), 933S–40S.

Medvedev ZA. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological Reviews*, 65(3), 375-398.

Menéndez CZ, Piquero PS, Begega A, López L, & Arias JL. (2013). Attention and inhibition in mild cognitive impairment and Alzheimer's Disease. *Escritos de Psicología-Psychological Writings*, 6(3), 43-50.

Mittenberg, W, Seidenberg M, O'leary DS, & DiGiulio DV. (1989). Changes in cerebral functioning associated with normal aging. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 11(6), 918-932.

Nyberg L, Lövdén M, Riklund K, Lindenberger U, & Bäckman L. (2012). Memory aging and brain maintenance. *Trends in cognitive sciences*, 16(5), 292-305.

O'Leary TP, Brown RE (2012) The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6J mice on the Barnes maze. *J Neurosci Methods* 203, 315–324.

Olton D, & Samuelson R. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2(2), 97-116.

Orsini CA, Willis ML, Gilbert RJ, Bizon JL, & Setlow B. (2016). Sex differences in a rat model of risky decision making. *Behavioral neuroscience*, 130(1), 50.

Park DC, & Reuter-Lorenz P. (2009). The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annual review of psychology*, 60, 173-196.

Peters R, Peters J, Warner J, Beckett N, & Bulpitt C. (2008). Alcohol, dementia and cognitive decline in the elderly: a systematic review. *Age and ageing*, 37(5), 505-512.

Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome. *Arch Neurol.* 1999; 56(3). 303.

Pfefferbaum A, Rohlfing T, Rosenbloom MJ, Chu W, Colrain IM, & Sullivan EV. (2013). Variation in longitudinal trajectories of regional brain volumes of healthy men and women (ages 10 to 85 years) measured with atlas-based parcellation of MRI. *Neuroimage*, 65, 176-193.

Poikolainen K. (1995). Alcohol and Mortality: a review. *Journal of Clinical Epidemiology*, 48 (4), 455-465.

Pottie K, Rahal R, Jaramillo A, Birtwhistle R, Thombs BD, Singh H, ... & Canadian Task Force on Preventive Health Care. (2016). Recommendations on screening for cognitive impairment in older adults. *CMAJ*, 188(1), 37-46.

Prickett CD, Lister E, Collins M, Trevithick-Sutton CC, Hirst M, Vinson JA, ... & Trevithick JR. (2004). Alcohol: friend or foe? Alcoholic beverage hormesis for cataract and atherosclerosis is related to plasma antioxidant activity. *Nonlinearity in biology, toxicology, medicine*, 2(4), 15401420490900272.

Quesada-Molina M, Muñoz-Garach A, Tinahones FJ, & Moreno-Indias I. (2019). A new perspective on the health benefits of moderate beer consumption: Involvement of the gut microbiota. *Metabolites*, 9(11), 272.

Quifer P, Martínez M, Jáuregui O, Estruch R, Lamuela R, Chiva G, Vallverdú-Queralt A. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chem.* 2014, 169, 336-343.

Ramanoël S, Hoyau E, Kauffmann L, Renard F, Pichat C, Boudiaf N, ... & Baciú M. (2018). Gray matter volume and cognitive performance during normal aging. A voxel-based morphometry study. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 235.

Ramis MR, Sarubbo F, Terrasa JL, et al. Chronic α -tocopherol increases central monoamines synthesis and improves cognitive and motor abilities in old rats. *Rejuvenation Res.* 2016; 19(2), 159-171.

Rao TS, & Shaji KS. (2007). Demographic aging: Implications for mental health. *Indian Journal of Psychiatry*, 49(2), 78.

Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, & Crook T. (1982). The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *The American journal of psychiatry*.

Renaud SD, & de Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526.

Renaud SC, Guéguen R, Siest G, & Salamon R. (1999). Wine, beer, and mortality in middle-aged men from eastern France. *Archives of internal medicine*, 159(16), 1865-1870.

Romeo J, González Gross M, Wärnberg J, Díaz LE, & Marcos A. (2007). Does beer have an impact on weight gain? Effects of moderate beer consumption on body composition. *Nutricion hospitalaria*, 22(2), 223-228.

Sachdev PS, Lipnicki DM, Kochan NA, Crawford JD, Thalamuthu A, Andrews G, Brayne C, Matthews FE, Stephan BC, Lipton RB, Katz MJ, Ritchie K, Carriere I, Ancelin ML, Lam LC, Wong CH, Fung AW, Guaita A, Vaccaro R, Davin A, Ganguli M, Dodge H, Hughes T, Anstey KJ, Cherbuin N, Butterworth P, Ng TP, Gao Q, Reppermund S, Brodaty H, Schupf N, Manly J, Stern Y, Lobo A, Lopez-Anton R, Santabarbara J: The prevalence of mild cognitive impairment in diverse geographical and ethnocultural regions: The COSMIC Collaboration. *PLoS One* 2015; 10:e0142388.

Sánchez-Muniz FJ, Macho-González A, Garcimartín A, Santos-López JA, Benedí J, Bastida S, & González-Muñoz MJ. (2019). The nutritional components of beer and its relationship with neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Nutrients*, 11(7), 1558.

Sarkar D, & Fisher PB. (2006). Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer letters*, 236(1), 13-23.

Sarubbo F, Ramis MR, Aparicio S, et al. Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats. *Age (Omaha)*. 2015; 37(3), 1-11.

Sarubbo F, Ramis MR, Kienzer C, et al. Chronic Silymarin, Quercetin and Naringenin Treatments Increase Monoamines Synthesis and Hippocampal Sirt1 Levels Improving Cognition in Aged Rats. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2018; 13(1), 24-38.

Sastre J, Pallardó FV, & Viña J. (2000). Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB life*, 49(5), 427-435.

Spencer J, Vafeiadou K, Williams R, Vauzour D, Spencer J, Vafeiadou K, & Vauzour D. (2012). Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Molecular Aspects of Medicine*, 33, 83–97.

Stefanatos R, & Sanz A. (2018). The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS letters*, 592(5), 743-758.

Stott DJ, Falconer A, Kerr GD, Murray HM, Trompet S, Westendorp RG, ... & Ford I. (2008). Does low to moderate alcohol intake protect against cognitive decline in older people?. *Journal of the American Geriatrics Society*, 56(12), 2217-2224.

Sullivan EV, Rosenbloom MJ, Deshmukh A, Desmond JE, Pfefferbaum A. Alcohol and the Cerebellum: Effects on Balance, Motor Coordination, and Cognition. *Alcohol Health Res World*. 1995; 19(2), 138-141. Accessed January 19, 2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31798074>

Tan BL, Norhaizan ME, Liew WPP, & Sulaiman Rahman H. (2018). Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1162.

Vina J, Lloret A, Orti R, Alonso D.2004.Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress *Mol Asp Med* 251–2.117–23.

Wei J, Hu Y, Zhang L, Hao Q, Yang R, Lu H, ... & Chandrasekar EK. (2017). Hearing impairment, mild cognitive impairment, and dementia: a meta-analysis of cohort studies. *Dementia and geriatric cognitive disorders extra*, 7(3), 440-452.

Ziegler DA, Piguet O, Salat DH, Prince K, Connally E, & Corkin S. (2010). Cognition in healthy aging is related to regional white matter integrity, but not cortical thickness. *Neurobiology of aging*, 31(11), 1912-1926.

Zuccalà G, Onder G, Pedone C, Cesari M, Landi F, Bernabei R, & Cocchi A. (2001). Dose-related impact of alcohol consumption on cognitive function in advanced age: results of a multicenter survey. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(12), 1743-1748.