



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

**Efecte de l'activitat física en la prevenció de  
l'envelliment cerebral. Estudi neuroquímic i  
comportamental.  
Elionor Lynton Pons**

**Grau de Biologia**

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 43219378D

Treball tutelat per Susana Esteban Valdés  
Departament de Fisiologia Animal



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

Paraules clau del treball:

Envelliment, exercici, memòria, coordinació motora, Dopamina, Noradrenalina, Serotonina, Tirosina hidroxilasa, Triptòfan hidroxilasa, sistema monoaminèrgic.



# Índex.

<b>Resum</b>	<b>4</b>
<b>Introducció</b>	<b>5</b>
<b>Material i mètodes</b>	<b>7</b>
<b>1. Animals d'experimentació</b>	<b>7</b>
<b>2. Exercici</b>	<b>7</b>
2.1. Dissecció i preparació de mostres	7
<b>3. Determinació cromatogràfica dels nivells de precursors (DOPA i 5-HTP), monoamines (DA, NA i 5-HT) i metabolits (DOPAC, HVA i 5-HIAA).</b>	<b>8</b>
3.1. Anàlisi cromatogràfic	9
<b>4. Proves comportamentals</b>	<b>10</b>
4.1. Radial maze	10
4.2. Test de Barnes	11
4.3. Reconeixement d'objectes	12
4.4. Rota-Rod	13
<b>5. Anàlisi estadístic</b>	<b>14</b>
<b>Resultats</b>	<b>15</b>
<b>1. Efecte de l'exercici crònic sobre el sistema monoaminèrgic de l'estriat i l'hipocamp de rates velles.</b>	<b>15</b>
1.1. Estriat	15
1.2. Hipocamp	17
<b>2. Efecte de l'exercici crònic sobre la memòria espacial</b>	<b>18</b>
<b>3. Efecte de l'exercici crònic sobre la memòria no espacial</b>	<b>21</b>
<b>4. Efecte de l'exercici crònic sobre la coordinació motora</b>	<b>23</b>
<b>Discussió</b>	<b>25</b>
<b>1. Efecte de l'exercici crònic sobre el sistema monoaminèrgic de l'estriat i l'hipocamp de rates velles</b>	<b>25</b>
<b>2. Efecte de l'exercici crònic sobre la memòria espacial, la memòria no espacial i la coordinació motora</b>	<b>26</b>
<b>3. Reciprocitat entre els resultats de les proves comportamentals i els anàlisis neuroquímics de les rates sotmeses a exercici crònic</b>	<b>27</b>
<b>Conclusions</b>	<b>28</b>
<b>Agraïments</b>	<b>28</b>
<b>Referències</b>	<b>29</b>

## **RESUM.**

Avui en dia s'ha augmentat molt l'esperança de vida a nivell mundial per la qual cosa hi ha un gran interès en mantenir una bona qualitat de vida i retardar el declivi cognitiu i motor associat a l'envelliment. La literatura científica evidencia els beneficis generals de l'exercici i la societat cada vegada mostra més interès en aquests. Els canvis en l'individu associats amb l'edat són complexos i es produeixen a molts nivells de l'organisme. Múltiples investigacions mostren la capacitat de l'exercici en retardar els mecanismes d'envelliment cerebral i hi ha evidències que suggereixen que la realització d'exercici físic afecta positivament a la memòria i l'activitat motora. En aquest estudi s'ha analitzat l'efecte de l'exercici físic, crònic i progressiu sobre les capacitats cognitives i motores i sobre el sistema monoaminèrgic a dues regions cerebrals: l'estriat i l'hipocamp. S'ha observat que la realització de l'exercici programat ha millorat les capacitats cognitives i motores de les rates velles estudiades a través de diverses proves comportamentals. Aquest també ha mostrat un augment en els nivells de les monoamines 5-HT, NA i DA analitzades a l'hipocamp i a l'estriat. Els resultats mostren una correlació amb els d'altres investigadors que han reportat que l'exercici pot servir com a teràpia per mitigar els efectes negatius dels mecanismes d'envelliment cerebral sobre la memòria i la coordinació motora i també en certes malalties neurodegeneratives.

## **ABSTRACT.**

Today has greatly increased life expectancy in the world so there is a great interest in maintaining a good quality of life and delayed motor and cognitive decline associated with aging. The scientific literature demonstrates the benefits of general exercise and society increasingly showing more interest in them. Changes in individual associated with age are complex and occur at many levels in the body. Multiple studies show the ability of exercise in delaying the mechanisms of brain aging and there is evidence suggesting that physical exercise positively affects memory and motor activity. This study analysed the effect of chronic exercise in old rats on cognitive and motor abilities and also on monoaminergic neurotransmitters in two brain regions: hippocampus and striatum. It has been observed that the realization of an exercise program improved cognitive and motor abilities in the studied old rats through various behavioural tests. It was also shown an increase in the levels of monoamines 5-HT, NA and DA analysed in the hippocampus and striatum. The results show a correlation with other researchers which have reported that exercise can serve as therapy to mitigate negative effects of brain aging as well as memory and motor coordination in certain neurodegenerative diseases.

# INTRODUCCIÓ.

L'augment de l'esperança de vida als països desenvolupats ocasionada pel desenvolupament de la medicina i les noves tecnologies, juntament amb una disminució del nombre de naixements en aquests països, ha donat lloc a un increment del percentatge de la població que es troba en una edat avançada (Park et al., 2009). Aquest fet, però, comporta també un augment de la incidència de malalties neurodegeneratives que impliquen un cost econòmic per al sistema sanitari dels països i per les famílies dels afectats, a més d'afligir a la qualitat de vida d'aquestes (Hebert et al., 2003). Degut a això, augmenten cada vegada més el nombre d'investigacions relacionades amb el tema de l'envelliment i sobretot de les malalties neurodegeneratives amb l'objectiu, ja no d'allargar l'esperança de vida, sinó d'aconseguir que es millori la qualitat dels anys viscuts.

L'envelliment és un procés fisiològic natural que comporta canvis funcionals, estructurals i moleculars a tot els nivells de l'organisme, inclòs el sistema nerviós central (SNC). Aquest procés implica alteracions en la memòria, la cognició, la funció motora i l'estat d'ànim. Molts dels mecanismes d'envelliment del sistema nerviós central són compartits amb els que ocorren a tot l'organisme mentre que alguns són específics: per exemple, els mecanismes d'envelliment que afecten a les neurotrofines i els neurotransmissors (Glorioso et al., 2011).

Els mecanismes moleculars d'envelliment que comparteix el SNC amb la resta de l'organisme són, entre d'altres, el dany en l'estructura de l'ADN, la desregulació del Calci, l'acumulació de radicals lliures (ROS), la disfunció mitocondrial i els processos inflamatoris (Foster, 2007; Yankner et al., 2008; Sergiev et al., 2015). Per altra banda, els mecanismes moleculars d'envelliment relacionats amb les neurotrofines (especialment la BDNF) i els neurotransmissor es troben estrictament lligats al SNC (Bäckman et al., 2006; Mattson, 2008).

Per tal de poder millorar la qualitat de vida de les persones amb edats avançades, s'estan investigant multitud de teràpies que tenen com a objectiu clau la pal·liació dels efectes de l'envelliment sobre el cervell i, com a conseqüència, la memòria. Algunes d'aquestes investigacions es basen en les propietats de les herbes medicinals (Chang et al., 2008; Ho, et al., 2010), altres es fomenten en una dieta de restricció calòrica (Masoro, 2005; Ramis et al., 2015) i altres en teràpies amb antioxidants (de la Lastra i Villegas, 2005; Anekonda, 2006). Aquest estudi experimental s'ha centrat en l'exercici com a teràpia per a la reducció de la pèrdua de memòria i coordinació motora amb l'edat.

Una gran quantitat d'autors recolzen la teoria que postula que l'exercici afecta positivament a la plasticitat neuronal (Erickson et al., 2012; Yau, et al., 2014; Meeusen, 2014).

L'activitat física és “qualsevol moviment del cos produït pels músculs esquelètics que requereix una despesa energètica” mentre que l'exercici és “una subcategoria de l'activitat física que és planejada, estructurada, repetitiva i té un propòsit en el sentit de de que té com a objectiu la millora o el manteniment d'un o més components de l'aptitud física” (WHO, 2010).

La realització d'exercici redueix l'atròfia del cervell i millora la memòria i altres funcions cognitives (Hötting et al., 2013). A més, molts estudis informen que l'activitat física i l'aptitud cardiovascular són bons predictors del rendiment cognitiu d'un individu (Barnes et al., 2003; Etgen et al., 2010).

Per altra banda, es sap que les monoamines serotonina (5-HT), dopamina (DA) i noradrenalina (NA) es troben estretament relacionades amb la memòria. La 5-HT es veu implicada amb la memòria recent i l'aprenentatge, entre altres moltes funcions neuronals com l'alimentació o el dolor (McEntee et al., 1991; Ricaurte et al., 1993; Harvey, 1996). En el cas de la DA, aquesta regula l'activitat locomotora a l'estriat i té a veure amb la memòria de treball i la persistència temporal d'aquesta a l'hipocamp (Williams et al., 1995; Berke et al., 2000; Bethus et al., 2010). En quant a la NA, està relacionada amb la memòria emocional a l'amígdala i la memòria de treball a l'escorça prefrontal (Chamberlain et al., 2006; van Stegeren, 2008).

Així, per explicar aquesta relació entre l'exercici i la cognició i la memòria, s'ha considerat interessant analitzar en aquest estudi els nivells de les monoamines 5-HT, DA i NA a dues estructures cerebrals molt vinculades amb l'aprenentatge i la memòria: l'hipocamp i l'estriat.

Segons Meeusen i De Meirleir (1995), durant la realització d'exercici es produeixen canvis en els nivells de monoamines. L'anàlisi de l'alliberament de neurotransmissors durant l'exercici, gràcies a sondes de microdiàlisi situades a diferents parts del cervell, demostraren canvis en l'alliberament de la 5-HT, DA i NA de manera que es pot dir que la pràctica d'exercici, a més de ser bona per la salut cardiovascular, també ho és per el cervell (Meeusen, 2005).

Estudis recents suggereixen que mantenir-se físicament actiu mentre s'envelleix podria protegir del dany cerebral que pot limitar la mobilitat en la vellesa. L'activitat física diària podria protegir la funció motora de les lesions cerebrals relacionades amb l'edat i inclús mitigar la malaltia d'Alzheimer i altres demències (Fleischman, 2015).

L'objectiu d'aquest estudi és analitzar l'efecte que té l'exercici físic, crònic i progressiu sobre les capacitats cognitives i motores de les rates velles i el possible efecte d'aquest sobre els nivells dels neurotransmissors relacionats amb les capacitats esmentades.

# MATERIAL I MÈTODES.

## 1. Animals d'experimentació.

Per a dur a terme l'estudi s'han utilitzat rates mascle Sprague Dawley velles (de 18 mesos a l'inici de l'experiment) d'uns  $668 \pm 35$  grams. Tots els individus eren provinents de l'estabulari de la Universitat de les Illes Balears (Tipus II, registre nºES704000000540 a la Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears) i es mantenien individualment dins gàbies de propilè translúcides. Les condicions de llum, temperatura i humitat eren controlades: la cambra on es mantenien els animals es trobava a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , amb una humitat del 70% i amb un cicle de llum-obscuritat de 12 hores.

L'alimentació va seguir una dieta estàndard tipus A04 (Panlab®) i l'aigua era de lliure accés. A més, tots els animals han estat tractats amb concordança amb la Convenció Europea per la Protecció d'animals Vertebrats utilitzats per experimentació i altres fins científics (Directiva 86/609/EEC), essent els protocols aprovats per el comitè Local Bioètic de la Universitat de les Illes Balears (UIB), Espanya.

## 2. Exercici.

Els animals van ser sotmesos a un programa d'exercici diari (de dilluns a divendres) d'una durada d'un mes. Cada dia se'ls obligava a fer exercici sobre una roda giratòria (Panlab®) durant 5 minuts a una velocitat constant de 4 rpm però que es va anar augmentant progressivament al llarg del mes d'estudi fins arribar una velocitat de 15 rpm. El temps de permanència damunt la roda també es va anar augmentant escalonadament fins arribar als 10 minuts. Abans d'iniciar el programa d'exercici, i cada 15 dies, es van realitzar diversos tests comportamentals per avaluar el rendiment cognitiu (Radial maze, Reconeixement d'objectes, Barnes maze) i la coordinació motora (Rota-rod).

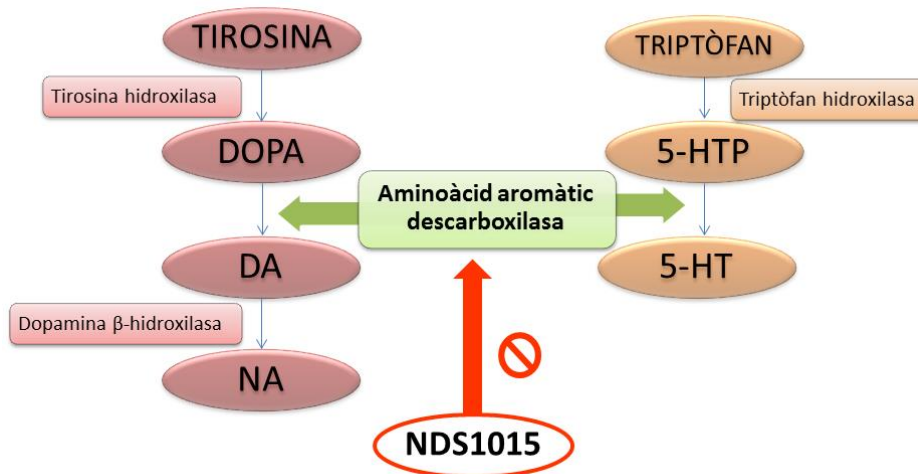
### 2.1. Dissecció i preparació de mostres.

Una vegada acabat el període d'exercici que s'havia estipulat per dur a terme l'experiment, es varen subministrar 100 mg/kg de NSD-1015 (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya) tant a les rates control com a les que havien seguit el protocol d'exercici. Al cap de 30 minuts totes varen ser sacrificades per el mètode de decapitació.

La utilització de NSD (clorhidrat de 3-hidroxibenzil-hidrazina) és deguda a la determinació de l'activitat dels enzims tirosina hidroxilasa (TH) i triptòfan hidroxilasa (TPH). Ambdós són enzims limitants de la síntesi de NA i DA (TH) i de 5-HT (TPH). A la figura 1 es pot veure la ruta de formació de les monoamines a estudiar i el punt on actua el NSD.

### 3. Determinació cromatogràfica dels nivells de precursors (DOPA i 5-HTP), monoamines (DA, NA i 5-HT) i metabolits (DOPAC, HVA i 5-HIAA).

En condicions normals, la DOPA i la 5-HTP (Figura 1) es transformen ràpidament a DA o NA i 5-HT, respectivament. Però quan s'afegeix NSD-1015 (100 mg/kg), aquest inhibeix l'activitat de la descarboxilasa que permet el pas de DOPA i 5-HTP a DA o NA i 5-HT i com a resultat tenim l'acumulació dels dos precursors. Per tant, la quantitat de DOPA i 5-HTP acumulats en un temps determinat serà directament proporcional a l'activitat TH i TPH respectivament.



**Figura 1.** Representació esquemàtica de l'acció de NSD1015 sobre l'enzim Aminoàcid aromàtic descarboxilasa que actua tant en la síntesi de 5-HT com en la de DA i NA.

Una vegada sacrificades les rates, es va procedir a la dissecció del cervell sobre una placa d'alumini a 4°C. Es varen guardar immediatament en nitrogen líquid les regions cerebrals de l'hipocamp i l'estriat i s'emmagatzemaren a -80°C per ser posteriorment analitzades (Esteban et al. 2010).

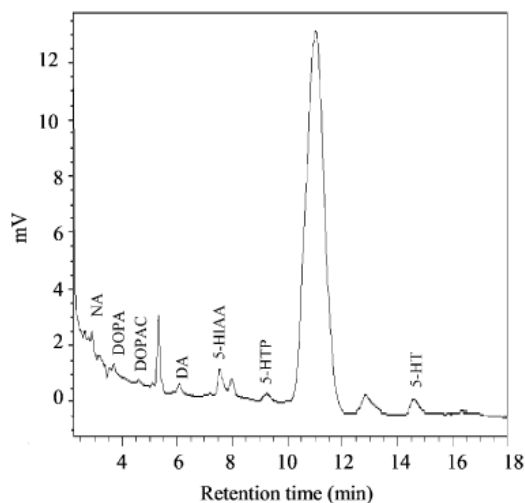
Abans de fer la cromatografia es varen pesar les mostres d'hipocamp i estriat i, primerament, es van homogeneïtzar amb un Ultraturrax (tipus Tp 18/10) en 1 ml de tampó d'homogeneïtzació (HClO<sub>4</sub> 0,4M, k<sub>2</sub>EDTA 0,01% i Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0,1%) durant 30 segons i en fred. Tot seguit es varen centrifugar les mostres durant 20 minuts a 40000 g i 4°C (centrifuga refrigerada sèrie Biocen 22R amb rotor Orto alresa RT22Ns 140311/01). El sobrenedant obtingut es va filtrar amb un filtre de xeringa de tefló de 0,45 µm de diàmetre de porus (Spartan-3, Sigma-Aldrich; Millex®-LH; Milipodre; Billerica, Mass, USA) i es va guardar a -80°C fins al moment de la determinació per HPLC amb detecció electroquímica (HPLC-ED).



### 3.1. Anàlisi cromatogràfic

Per a la determinació dels nivells de precursors (DOPA i 5-HTP), monoamines (DA, NA i 5-HT) i metabolits (DOPAC, HVA i 5-HIAA) es va utilitzar la Cromatografia líquida d'alta eficàcia amb detecció electroquímica (HPLC-ED). Per tal de separar els diferents precursors, monoamines i metabolits que volíem quantificar es va utilitzar una columna en fase reversa Spherisorb S3 ODS1 C18 (3 µm de mida de partícula, 4,6 mm x 10 cm; Waters) acoplada a una precolumna Tracer ODS2 C18 (2-5 µm de mida de partícula)(Teknokroma). La fase mòvil (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M; àcid octà sulfònic 2,1 M; K<sub>2</sub>EDTA 0,1 M i metanol 10-12% (v/v); i pH ajustat al rang 2,72-2,76 amb H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%) va ser impulsada a un fluxe de 0,8 ml/min per una bomba de doble pistó tipus Waters M-510.

Els composts es varen detectar electroquímicament, mantenint un potencial aplicat de +75V front a l'electrode de referència *in situ* (Ag/AgCl) mitjançant un detector electroquímic (Waters 2465 Electrochemical Detector). La corrent que es va produir la va captar un ordinador PC gràcies al software Empower Pro de Waters®, a través d'una interfase tipus WAT busSAT/IN Module (Waters).



**Figura 2.** Representació de l'anàlisi cromatogràfic d'una mostra d'estriat obtingut durant el processament de mostres on s'identifiquen, en aquest ordre, els següents composts: NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HIAA, 5-HTP, HVA i 5-HT. El pic entre 5-HTP i 5-HT correspon a NSD1015.

Finalment, les quantitats dels composts de les diferents mostres es calcularen realitzant primer una corba estàndard a partir de patrons externs de cada compost a estudiar i, una vegada fet això, es van analitzar les mostres. Gràcies al software, s'obtingueren unes corbes de les mostres que, interpolades al pic de corba estàndard, donàren els resultats de les concentracions de NA, DOPA, DOPAC, DA, 5-HTP, 5-HIAA, HVA, 5-HT (exemple figura 2). Les dades de les concentracions es varen corregir tenint en compte el volum injectat, el volum de dilució de les mostres i el pes de cada una. Els valors es varen expressar en nanograms per gram de teixit humit (ng/g).

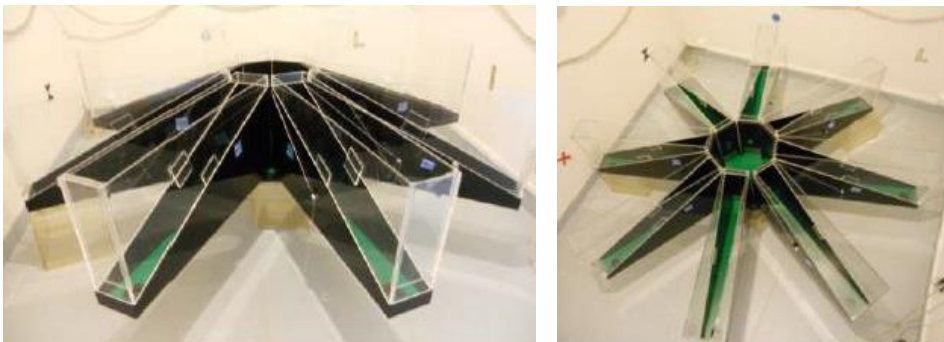
#### 4. Proves comportamentals.

Les proves comportamentals es varen dur a terme entre les 8:30 i les 13:00 hores de manera que els tests es realitzessin aproximadament a la mateixa hora perquè sinó els resultats no serien comparables, ja que el nivell d'activitat de les rates és diferent al llarg del dia.

Una vegada utilitzat i abans de canviar d'animal, es fa net el material de cada prova amb etanol 70%.

##### 4.1.Radial maze.

El Radial maze (Panlab, S.L. Barcelona, Espanya) és un test comportamental que valora la memòria espacial. Consta d'una plataforma central octogonal de 28 cm de diàmetre a partir de la qual surten 8 braços de 70x11 cm que es troben distribuïts amb una distància igual als dels altres. Al final de cada un dels braços hi trobem un pouet on s'hi deposita un trosset de *pellet* que atreu a l'animal.



**Figura 3.** Estructura de la prova comportamental del Radial maze. Imatge realitzada al laboratori de Neurofisiologia de la UIB.

El test s'inicia quan, després de sotmetre els individus a 48 hores de dejú però amb lliure accés a aigua (això és perquè a l'hora de fer la prova hi hagi un reforç positiu que les motivi a entrar als braços a cercar el *pellet*), es col·loca una de les rates a estudiar a la plataforma central del Radial maze. En aquest moment es comença a comptar el temps durant el qual l'animal anirà recorrent el laberint, podent entrar als diferents braços. La prova acaba quan la rata ha entrat completament a tots els braços o bé passats un màxim de 20 minuts.

Durant la realització del test es van anotant els braços visitats (que estan enumerats), el recorregut de l'animal, el número de braços on ha menjat i el temps transcorregut. A més, gràcies al programa Smart v2.5 (Panlab, S.L. Barcelona, Espanya) que està connecta a una càmera de vídeo digital, es grava i s'analitza el recorregut de cada rata.

## Test de Barnes.

Aquesta prova comportamental serveix per mesurar l'aprenentatge visual-espacial i la memòria dels animals testats. La infraestructura consta d'una taula circular de 130 cm de diàmetre que es troba a 75 cm del sòl. Aquesta presenta 18 forats de 10 cm de diàmetre situats a la perifèria, a 3 cm de la vora i amb una distància de 10 cm entre un i l'altre. Un dels forats està connectat amb una caixa de plàstic de 20x10 cm i és l'anomenat *target* (l'objectiu de la prova). La resta de forats donen directament al sòl i per tant són falsos amagatalls. Amb l'objectiu de que l'animal s'orienti, a la cambra on es realitza la prova hi ha col·locades senyals a les parets i el mateix experimentador també s'ha de situar sempre en el mateix lloc ja que equival a un punt de referència.

L'objectiu del test és que la rata entri al *target* per escapar de l'estímul negatiu que és l'excés de llum al que és sotmesa.

Primer es du a terme una fase de *Familiarització* (un dia abans del test), la finalitat de la qual és l'habitució de l'animal a l'estructura de la prova. La rata es col·loca en el laberint deixant que explori la superfície fins que es fiqui al *target* o fins que hagin passat un màxim de 3 minuts. Tot seguit es deixa que l'animal quedi dins el *target* durant 1 minut (en el cas de que no l'hagi trobat se'l dirigeix cap allà).

Una vegada feta la *Familiarització* es pot realitzar el *Test*, que es divideix en entrenaments i prova final:

- a. Per començar es fan 3 entrenaments. Abans del començament de cada entrenament la rata es troba en un ambient obscur de manera que quan es col·loca sobre l'estructura del test de Barnes es sent molestada per la intensitat de la llum i cerca el *target*. En cas de que no el trobi, es deixen passar un màxim de 180 segons. Hi ha un descans de 10 minuts entre cada entrenament.
- b. La prova final es realitza exactament igual que els entrenaments amb la única diferència que el temps màxim ara és de 90 segons.



**Figura 4.** Dispositiu del test de Barnes. Les figures de les parets serveixen per l'orientació de l'animal. Imatges realitzades al laboratori de Neurofisiologia de la UIB.

Els paràmetres que s'anoten tant en els entrenaments com a la prova final són els següents: temps en arribar al *target* (latència total), forats que ha explorat (estan enumerats), estratègia que ha seguit i número d'errors realitzats (visites a forats que no són el *target*). A més, es té en compte si la rata ha visitat el *target* però no s'hi ha amagat (latència primària).

En quant a l'estratègia, se'n defineixen 3:

- Directe: aquella en la qual la rata va directament al *target* o a un dels dos forats del seu costat.
- Seriada: aquella en la qual l'animal comença explorant un forat, després el del seu costat i així successivament fins a trobar el *target*.
- Aleatòria o mixta: aquella en la qual no es segueix cap patró concret.

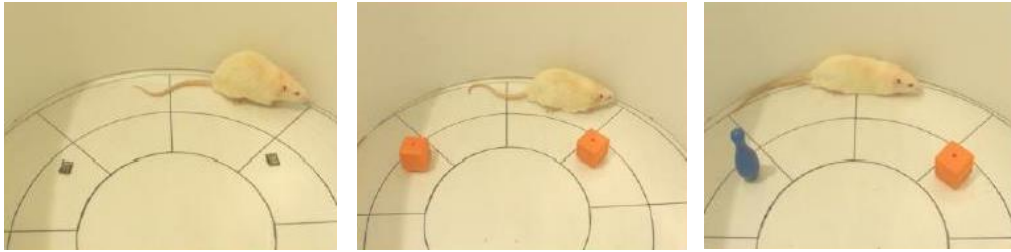
#### **4.2.Reconeixement d'objectes.**

El test de reconeixement d'un objecte nou ha estat utilitzat per mesurar la memòria de tipus no espacial. Gràcies a aquesta prova es pot analitzar la capacitat de recuperar informació que ja s'havia adquirit i incorporar-ne de nova.

La prova s'ha dut a terme en una espècie de cilindre de fusta i metacrilat, obert per la part superior i amb les següents mides: 78 cm de diàmetre i 60 cm d'altura. A la base de l'estructura hi ha dues marques situades a 23 cm del centre a les quals es col·loquen els objectes que l'animal ha de reconèixer. Els paràmetres a analitzar són el temps d'exploració de cada objecte i el recorregut que ha fet la rata.

Aquest test es realitza en dues fases:

- Habitució: en la qual l'animal explora lliurement l'estructura física de la prova de manera que s'hi acostuma. Es duu a terme els 3 dies previs al test i durant 10 minuts. A més, l'animal també s'acostuma a la presència dels examinadors i al renou del cronòmetre.
- Prova: també té varies fases.
  1. *Rehabituació*. L'animal es col·loca a l'estructura on es realitza el test durant un minut.
  2. *Familiarització*. Es col·loquen dos objectes idèntics a les marques que es troben a 23 cm del centre de l'estructura i s'enganxen amb l'ajuda d'un velcro. Es deixa que l'animal explori els objectes durant 30 segons (entre els dos objectes) o fins un màxim de 10 minuts si l'animal no arriba a explorar un dels dos objectes.
  3. *Retràs*. Un període de 10 minuts abans de començar el test.
  4. *Test*. Els objectes utilitzats en la familiarització són substituïts per altres: un de color i forma igual i l'altre diferent tant en color com en forma. Es torna a col·locar la rata al centre del dispositiu i s'actua com a la familiarització; el test acaba quan la rata suma un temps de 30 segons d'exploració dels dos objectes o quan han passat un màxim de 10 minuts.



**Figura 5.** Dispositiu per a la realització de la prova de Reconeixement d'objectes en diferents moments: la imatge de l'esquerra correspon a la fase d'Habitució, la d'enmig a la fase de Familiarització i la de la dreta al Test. Imatges realitzades al laboratori de Neurofisiologia de la UIB.

El que s'anota és el recorregut de l'animal i el temps que està explorant cada objecte, distingint el familiar (que havia conegut a la fase familiarització) del nou (el que es diferent tant en forma com en color).

### 4.3.Rota-rod.

El Rota-rod (Panlab, S.L., Barcelona, Espanya) és una prova que ens serveix per avaluar la coordinació motora dels animals que estem estudiant. Es tracta d'una roda de 8 cm de diàmetre que es troba a una altura de 42 cm, la qual pot girar a la velocitat que l'examinador vulgui. En aquest cas s'utilitza en el mode d'acceleració (es passa de 4 a 40 rpm en un minut).



**Figura 6.** Estructura de la prova de coordinació motora del Rota-rod. Imatges realitzades al laboratori de Neurofisiologia de la UIB.

Existeixen dues fases:

- Entrenament: en el mode manteniment i a una velocitat constant de 4 rpm es deixa la rata sobre la roda fins que s'aconsegueix que es mantingui un cert temps sobre aquesta sense caure.
- Test: amb el Rota-rod en mode de manteniment i a 4 rpm es posa l'animal damunt la roda fins que s'estabilitza. Una vegada estabilitzat es passa al mode acceleració. Això es repeteix 5 vegades sempre deixant un temps entre un test i un altre perquè els animals puguin descansar.

El que s'ha d'anotar en aquest cas és el temps que duren sobre la roda i fins a quina velocitat arriben.

## **5. Anàlisi estadístic**

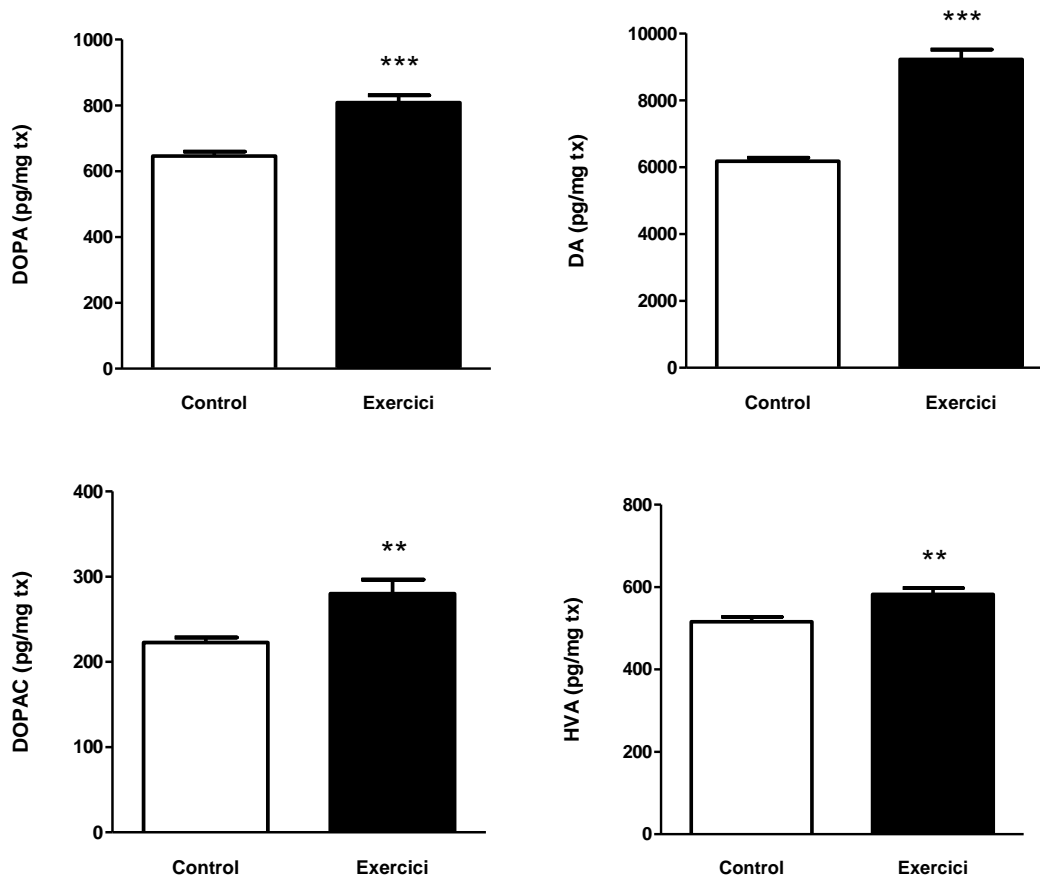
Per a l'anàlisi estadístic s'ha utilitzat el software GraphPad Prism 5 fent un anàlisi two-way de la variança (ANOVA) al comparar més de dos grups experimentals i un posttest de Bonferroni. A l'hora de comparar 2 grups experimentals s'ha fet amb el test t-Student. S'ha considerat estadísticament significatiu un nivell mínim de probabilitat inferior o igual a 0,05 ( $p$ ). Els resultats s'han expressat com: valors mitjans  $\pm$  error estàndard de la mitjana (SEM).

## RESULTATS.

### 1. Efecte de l'exercici crònic sobre el sistema monoaminèrgic de l'estriat i l'hipocamp de rates velles.

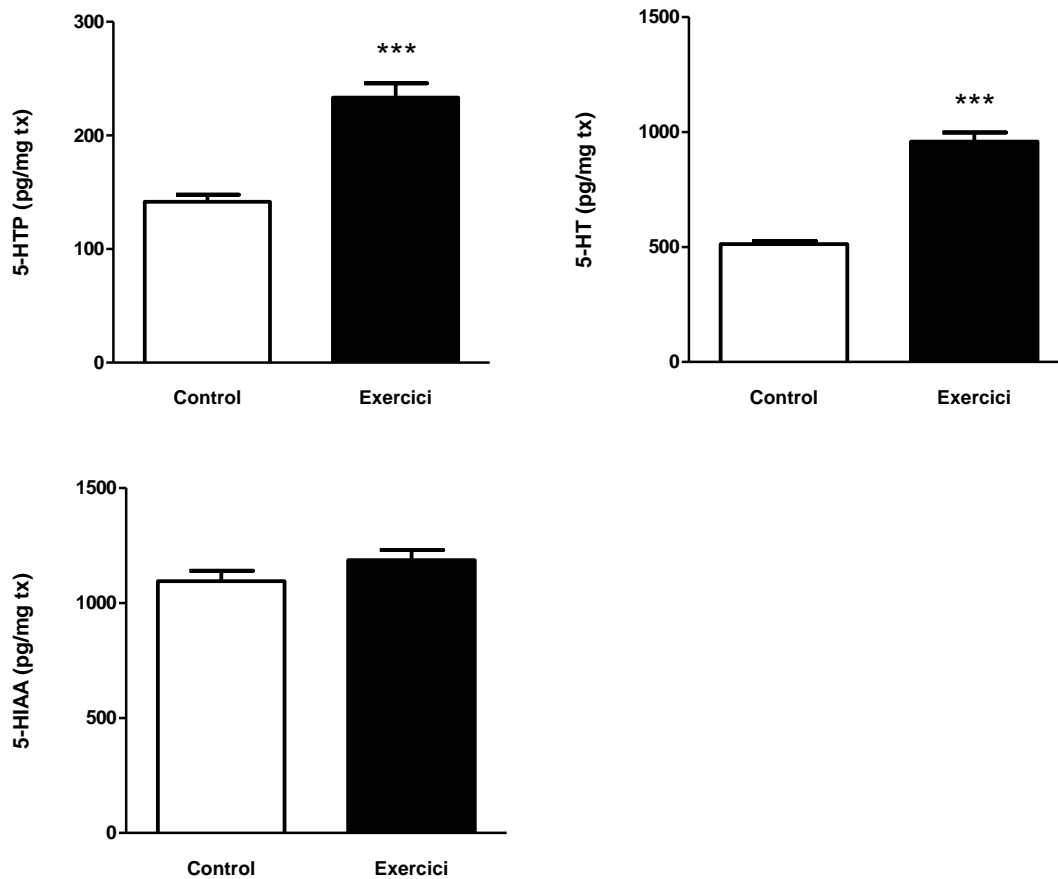
#### 1.1. Estriat

A l'estriat podem trobar una gran abundància de neurones dopaminèrgiques i serotoninèrgiques, per la qual cosa es varen analitzar els nivells de DA i 5-HT d'aquesta regió, a més dels nivells dels seus precursors (DOPA de la DA i 5-HTP de la 5-HT) i dels seus metabòlits (DOPAC i HVA de la DA i 5-HIAA de la 5-HT).



**Figura 7.** Representació de les diferències dels nivells de DOPA, DA, DOPAC i HVA entre els animals control (n=8) i els sotmesos a exercici crònic (n=7) després de la subministració de NSD-1015 (100 mg/kg, intraperitoneal), inhibidor de l'enzim L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa. Les columnes (pg/mg tx) representen la mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana. Per l'estadística s'ha dut a terme el test T-Student. El símbol \* representa el p-valor obtingut al comparar els animals sotmesos a exercici crònic amb els control: (\*\*)  $p \leq 0.01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

A la figura 7 es poden veure les quantitats de DA, el seu precursor i els seus metabòlits en picograms per mil·ligram de teixit humit. Es pot observar un augment significatiu dels nivells de totes les molècules analitzades a les rates sotmeses a exercici crònic respecte de les rates control.

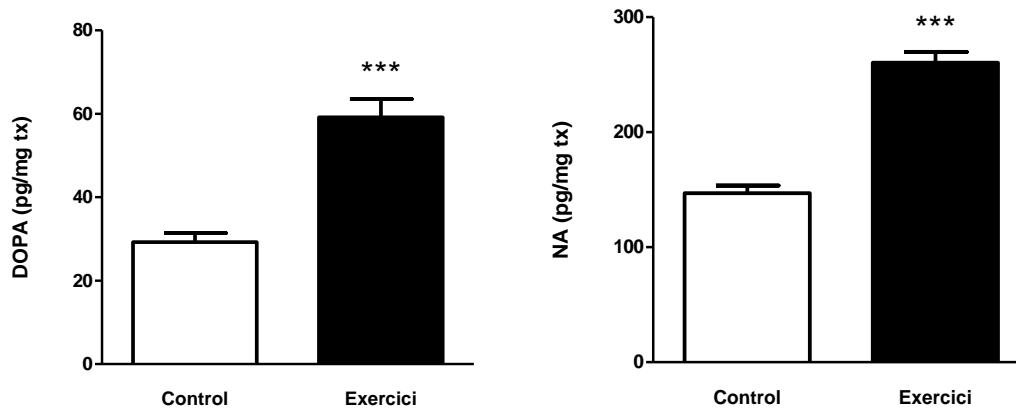


**Figura 8.** Representació de les diferències del nivells de 5-HTP, 5-HT, i 5-HIAA entre els animals control ( $n=8$ ) i els sotmesos a exercici crònic ( $n=7$ ) després de la subministració de NSD-1015 (100 mg/kg, intraperitoneal), inhibidor de l'enzim L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa. Les columnes (pg/mg tx) representen la mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana. Per l'estadística s'ha dut a terme el test T-Student. El símbol \* representa el p-valor obtingut al comparar els animals sotmesos a exercici crònic amb els control: (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

Els nivells de 5-HT, el seu precursor (5-HTP) i el seu metabolit (5-HIAA) presents a les rates sotmeses a exercici crònic es comparen amb els de les rates control a la figura 8. En aquesta mateixa figura es pot veure com hi ha una major concentració de 5-HTP i 5-HT a l'estriat dels animals que varen dur a terme el seguiment de l'exercici i que aquest augment és significatiu. En el cas del 5-HIAA també es pot observar un augment tot i que la diferència no és estadísticament significativa.



## 1.2.Hipocamp

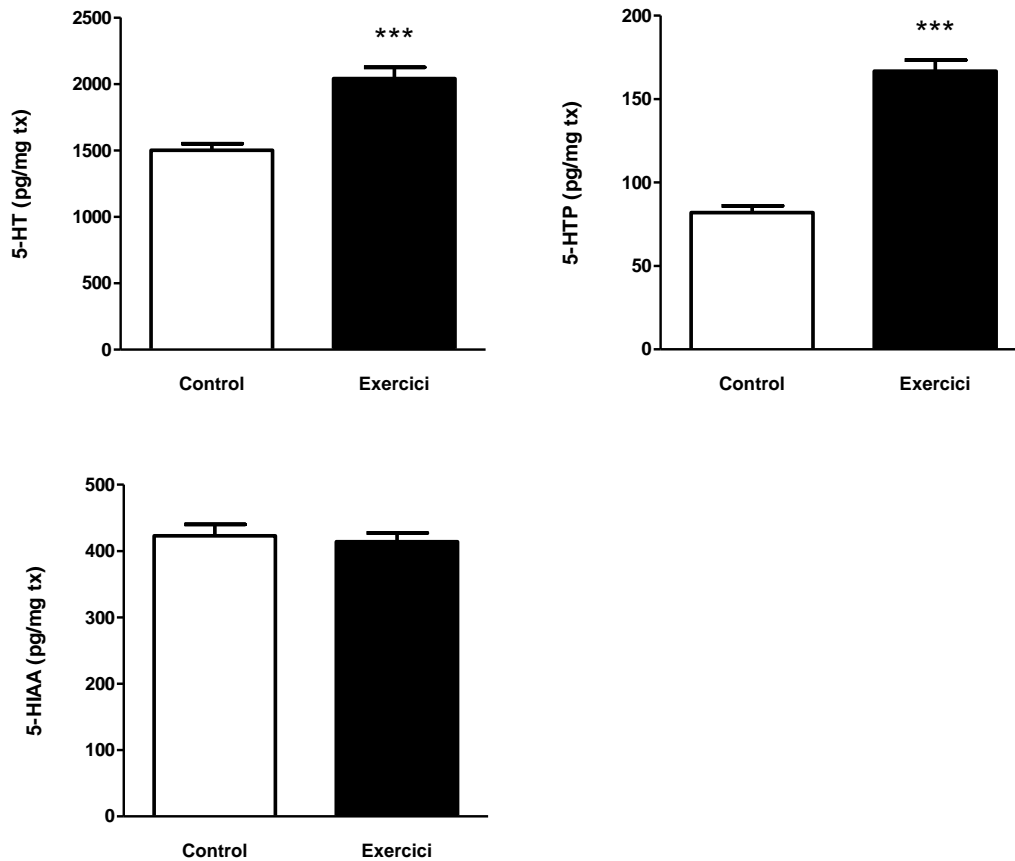


**Figura 9.** Representació de les diferències dels nivells de DOPA-i NA, entre els animals control ( $n=8$ ) i els sotmesos a exercici crònic ( $n=7$ ) després de la subministració de NSD-1015 (100 mg/kg, intraperitoneal), inhibidor de l'enzim L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa. Les columnes (pg/mg tx) representen la mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana. Per l'estadística s'ha dut a terme el test T-Student. El símbol \* representa el p-valor obtingut al comparar els animals sotmesos a exercici crònic amb els control: (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

A l'hipocamp també podem trobar una gran abundància de neurones serotoninèrgiques però, a diferència de l'estriat, hi predominen també les neurones noradrenèrgiques. Per això, d'aquesta regió es varen analitzar els nivells de NA i 5-HT, a més dels nivells dels seus precursors (DOPA de la NA i 5-HTP de la 5-HT) i del metabòlit de la 5-HT (5-HIAA), ja que els de la NA no es poden quantificar per el mètode utilitzat.

La figura 9 mostra com els nivells de NA i el seu precursor (DOPA) a l'hipocamp són majors amb una diferència estadísticament significativa als animals que varen ser sotmesos a exercici respecte dels control.

A la figura 10 hi ha representats els nivells de 5-HT, el seu precursor i el seu metabòlit de l'hipocamp, comparant les rates que havien seguit el protocol d'exercici i les control. Les diferències en els nivells de la 5-HTP i la 5-HT són estadísticament significatius, essent majors a l'hipocamp dels animals sotmesos a exercici crònic. En canvi, el nivell del metabòlit 5-HIAA és menor a les rates exercici que a les control tot i que no hi ha diferències significatives.

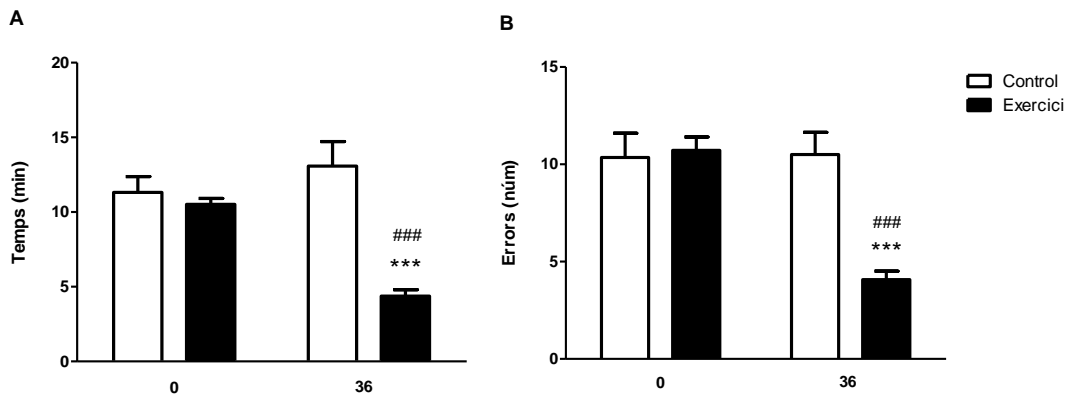


**Figura 10.** Representació de les diferències dels nivells de 5-HTP, 5-HT i 5-HIAA entre els animals control ( $n=8$ ) i els sotmesos a exercici crònic ( $n=7$ ) després de la subministració de NSD-1015 (100 mg/kg, intraperitoneal), inhibidor de l'enzim L-aminoàcid aromàtic descarboxilasa. Les columnes (pg/mg tx) representen la mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana. Per l'estadística s'ha dut a terme el test T-Student. El símbol \* representa el p-valor obtingut al comparar els animals sotmesos a exercici crònic amb els control: (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

## 2. Efecte de l'exercici crònic sobre la memòria espacial.

En aquest estudi s'ha analitzat la memòria espacial de les rates sotmeses a un exercici crònic i de les control mitjançant dos tests: el Radial maze i el Test de Barnes.

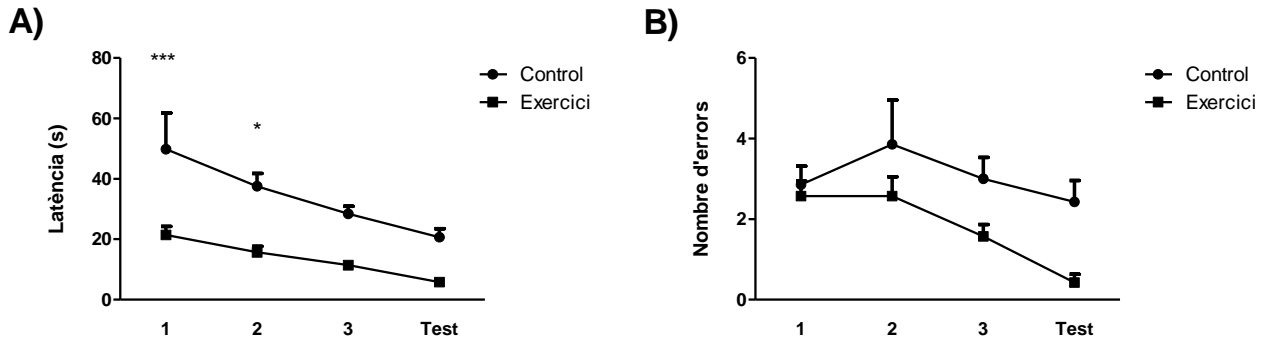
En el Radial maze (o laberint radial) el que s'ha tingut en compte ha estat el temps necessari per completar el laberint (que tenia un màxim de 20 minuts, com bé s'explica a l'apartat de "Material i mètodes") i el nombre d'errors realitzats.



**Figura 11.** Efecte de l'exercici ( $n=7$ ) sobre el temps necessari per completar la prova (A) del laberint radial (Radial Maze) i el nombre d'errors realitzats (B) en aquesta prova. Es recullen els resultats dels tests realitzats el primer dia de l'experiment (0) i 36 dies després de començar amb el seguiment d'exercici estipulat (36). Les dades s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM del temps necessari per completar la prova, o dels errors comesos. Per l'estadística s'ha dut a terme un test T-Student entre les diferents variables i les diferències s'han considerat significatives quan  $p \leq 0,05$ . El símbol \* representa el p-valor obtingut al comparar els animals sotmesos a exercici crònic amb el respectiu control: (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ . El símbol # representa el p-valor obtingut al comparar els animals sotmesos a exercici crònic durant 36 dies amb ells mateixos el primer dia de l'experiment: (###)  $p \leq 0,001$ .

Els animals sotmesos a exercici durant un mes milloraren el temps d'execució de la prova en un 58,29% ( $p < 0,0001$ ) respecte a ells mateixos a l'inici de l'experiment i el temps d'execució d'aquestes també fou menor a l'hora de comparar-lo amb el de les control passat el mes, concretament un 66,56% ( $p = 0,0002$ ) menor. A més, les rates que dugueren a terme l'exercici disminuïren el número d'errors de la prova en un 61,96% ( $p < 0,0001$ ) respecte a l'inici del tractament i en un 61,23% ( $p = 0,0002$ ) respecte al seu control. A la figura 11 es poden veure representats els valors obtinguts del temps i el nombre d'errors a la prova del laberint radial.

L'altra prova que es va realitzar amb l'objectiu d'analitzar la memòria espacial va ser el Test de Barnes (el qual s'ha explicat detalladament a l'apartat de "Material i mètodes"). En aquesta prova es tengué en compte el temps que tardà l'animal a arribar al *target* (latència total) i el nombre d'errors realitzats abans d'arribar al *target*.



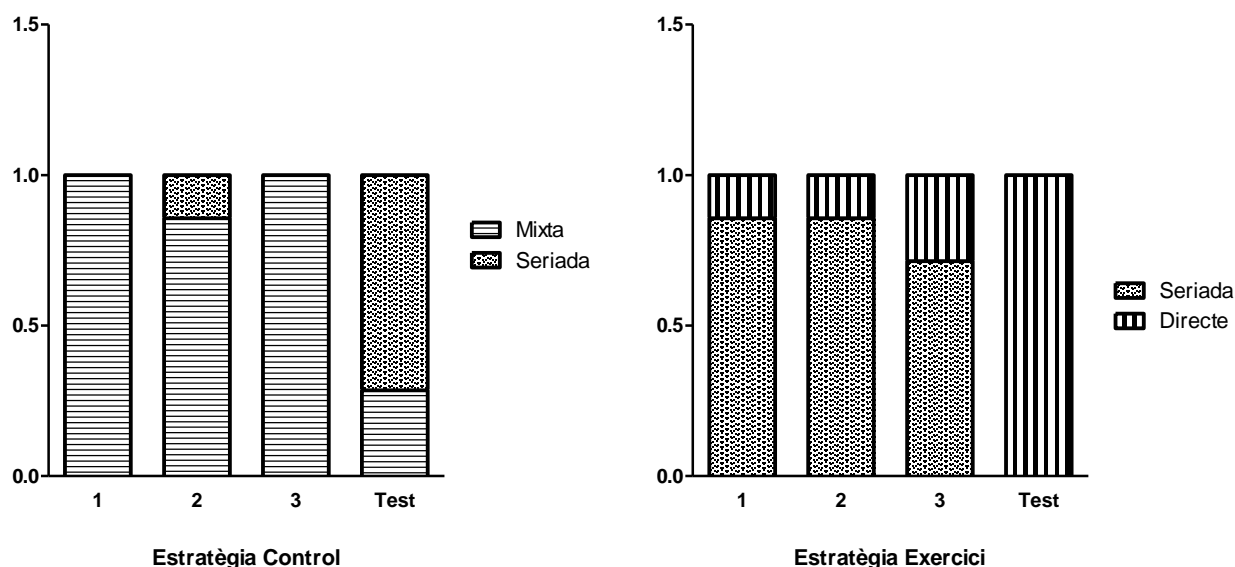
**Figura 12.** Efecte de l'exercici (36 dies) al test de Barnes a rates velles comparant amb el seu respecteiu control. Els punts representen el promig  $\pm$ SEM del temps necessari per arribar al target (A) i el nombre d'errors comesos (B). Un Two-way ANOVA seguit de Bonferroni test detectà diferències significatives: (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ , (\*)  $p \leq 0,01$  comparant el grup d'exercici amb el seu corresponent grup control.

L'anàlisi Two-way ANOVA mostrà diferències significatives en el temps de latència entre les proves i entre els tractaments (exercici i control). A més, un posttest de Bonferroni evidencià que els animals sotmesos a exercici durant un mes milloraren en un 57,11% ( $p < 0,001$ ) el temps de latència de la prova 1 i un 58,24% ( $p < 0,05$ ) en la prova 2 respecte els animals control. Les rates que havien estat obligades a realitzar exercici presentaren una latència un 59,86% en la prova 3 i un 70,98% al test (tot i que les dades de la prova 3 i el test no mostren diferències significatives entre els animals control i exercici).

En quant als errors, les rates que realitzaren l'exercici obligat feren un 10% menys d'errors a la prova 1, un 33,42% menys a la prova 2, un 47,67% menys a la prova 3 i un 82,30% menys al test. L'anàlisi amb un Two-way ANOVA va revelar diferències significatives en el temps de latència entre les proves i entre els tractaments (exercici i control). Tot i això, el posttest de Bonferroni no va mostrar diferències significatives.

Per acabar, es va estudiar un darrer paràmetre del test de Barnes: l'estratègia seguida per els animals testats. Com es pot veure a la figura 13, l'estratègia dels animals control passats 36 dies de l'inici de l'estudi va ser 100% mixta al primer temps d'entrenament. En el segon temps d'entrenament es va utilitzar un 85,71% l'estratègia mixta i un 14,29% l'estratègia seriada i en el tercer temps d'entrenament l'estratègia seguida va tornar a ser 100% mixta. Al temps del test, els animals control seguiren un 71,43% l'estratègia seriada i la resta seguí la mixta.

Els animals sotmesos a exercici durant un mes, en canvi, ja van començar amb un 85,71% seguint l'estratègia seriada i un 14,29% la directe al primer temps d'entrenament. En el segon temps d'entrenament els percentatges de l'estratègia seguida foren els mateixos que els del primer però, en el tercer, s'augmentà fins al 28,57% l'estratègia directe, quedant un 71,43% d'animals que seguiren la seriada. Finalment, al temps del test, les rates que havien estat sotmeses a exercici crònic seguiren en un 100% l'estratègia directe, la que demostra la millor memòria espacial.



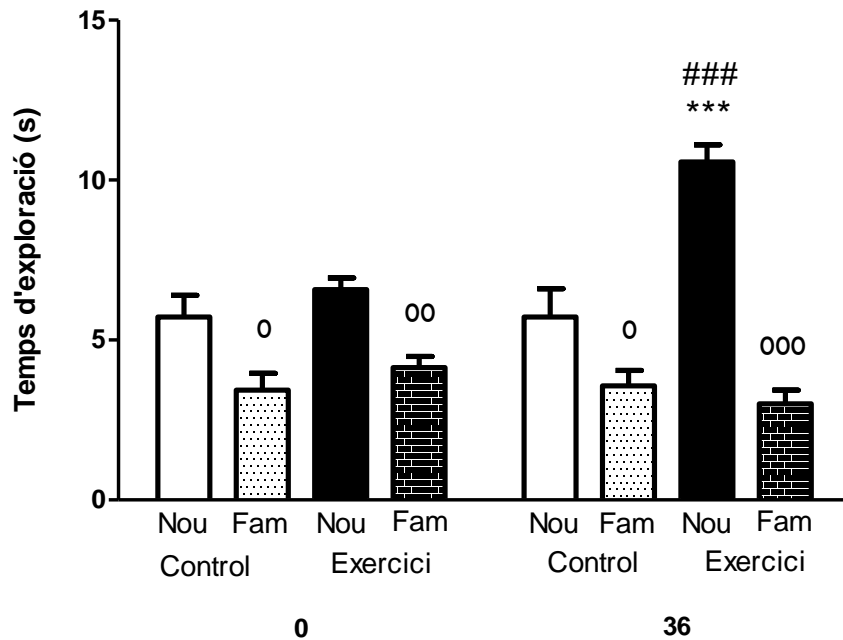
**Figura 13.** Estratègia seguida en el test de Barnes (en tant per 1) per els animals control ( $n=7$ ) i els animals sotmesos a exercici crònic ( $n=7$ ) en el primer temps d'entrenament (1), el segon (2), el tercer (3) i en el temps del test (Test) als 36 dies de l'inici de l'exercici.

### 3. Efecte de l'exercici crònic sobre la memòria no espacial.

La memòria no espacial es va determinar en aquest estudi mitjançant la prova de Reconeixement d'objectes. El que es va tenir en compte va ser el temps d'exploració de cada objecte, nou i familiar, ja que aquest paràmetre demostra les diferències (si n'hi ha) entre els patrons d'exploració de les rates sotmeses a exercici durant un mes i els de les control.

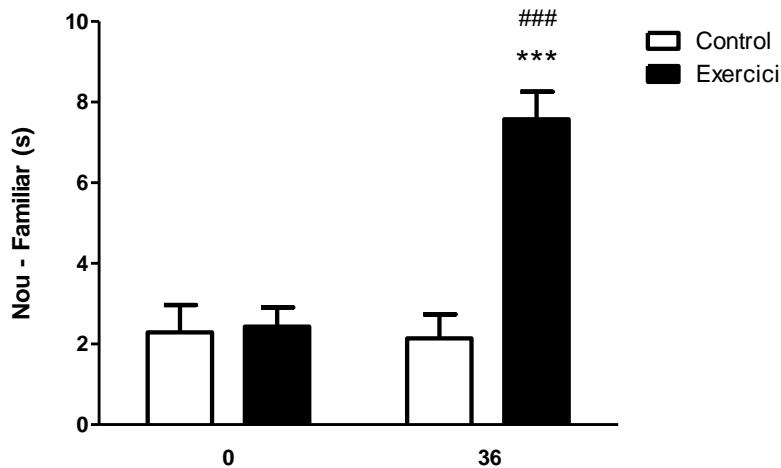
A la figura 14 hi ha representades les diferències en el temps d'exploració (s) que s'observaren entre els animals control i els animals exercici, a l'inici de l'estudi i al final. Els animals que havien estat sotmesos a exercici durant un mes exploraren un 85,11% ( $p<0,001$ ) més l'objecte Nou que no pas els control. Aquests mateixos (exercici) augmentaren un 60,88% ( $p<0,001$ ) el temps d'exploració de l'objecte Nou comparant-los amb ells mateixos a l'inici de l'estudi, és a dir, abans de començar amb el seguiment d'exercici.

D'altra banda, s'han trobat diferències significatives entre el temps d'exploració de l'objecte Nou i el Familiar en tots els casos. Als 0 dies les rates control exploraren un 41,50% ( $p<0,05$ ) més l'objecte Nou i els rates exercici un 36,99% ( $p<0,01$ ) més. Passats 36 dies, les rates control exploraren l'objecte Nou un 37,48% ( $p<0,05$ ) més que l'objecte Familiar i les rates exercici un 71,70% ( $p<0,001$ ).



**Figura 14.** Representació del temps d'exploració a la prova de Reconeixement d'objectes a l'inici de l'estudi (dia 0) i al final (passats 36 dies) dels animals sotmesos a exercici crònic ( $n=7$ ) i dels control ( $n=7$ ). Es té en compte el temps d'exploració de l'objecte nou (Nou) i el familiar (Fam). La prova estadística Two-way ANOVA seguida d'un test Bonferroni detectà diferències significatives: (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  comparant el grup exercici amb els seu corresponent control; (###)  $p \leq 0,001$  comparant els animals sotmesos a exercici a l'inici i final de l'estudi; (°)  $p \leq 0,05$ , (°°)  $p \leq 0,01$ , (°°°)  $p \leq 0,001$  comparant l'objecte Familiar amb l'objecte Nou.

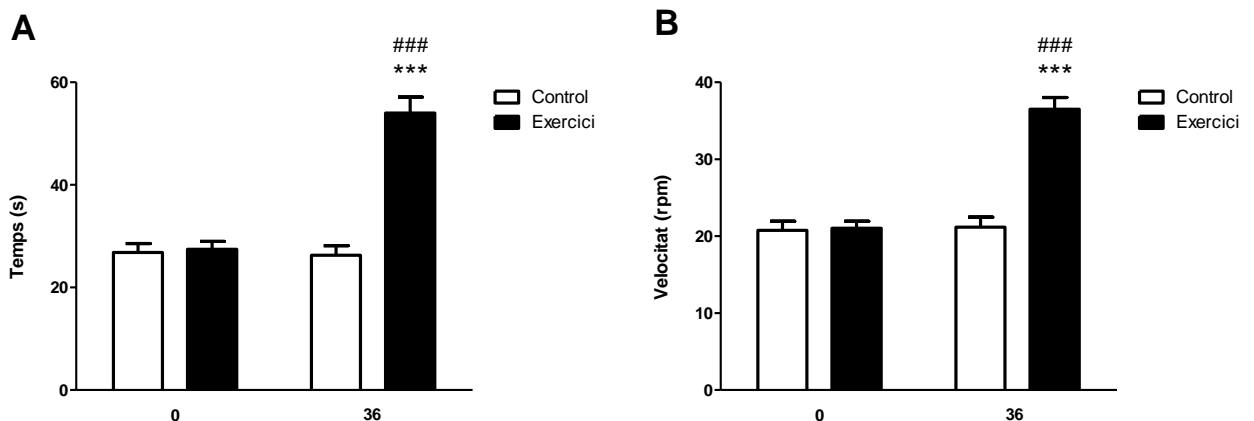
A la figura 15 hi ha representat el paràmetre Nou-Familiar de la prova de Reconeixement d'objectes. Aquest paràmetre mostra els temps que els animals han estat explorant més l'objecte nou que el familiar. En el cas dels animals sotmesos a exercici, aquests mostraren un valor del paràmetre Nou-Familiar un 253,74% ( $p < 0,0001$ ) major que els seu corresponent control. A l'hora de comparar-los amb ells mateixos a l'inici de l'estudi, el paràmetre va augmentar un 211,52%.



**Figura 15.** Representació del paràmetre Nou menys Familiar (Nou-Familiar) de les rates sotmeses a exercici crònic ( $n=7$ ) i control ( $n=7$ ) de la prova de Reconeixement d'objectes a l'inici (0) i final (36) de l'estudi. Les barres representen el promig  $\pm$  SEM del paràmetre Nou-Familiar. El test estadístic T-Student detectà diferències significatives: (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  comparant el grup d'exercici amb el seu corresponent control; (###)  $p \leq 0,001$  comparant els animals sotmesos a exercici a l'inici i final de l'estudi.

#### 4. Efecte de l'exercici crònic sobre la coordinació motora. (Rota-Rod).

La prova del Rota-Rod es va realitzar amb la finalitat d'estudiar l'efecte de l'exercici crònic sobre la coordinació motora, analitzant el temps que els animals testats aconseguiren mantenir-se sobre la roda sense caure (tot augmentant progressivament la velocitat a la que la roda girava seguint el protocol descrit a "Material i mètodes").



**Figura 16. A:** Representació gràfica del temps de permanència (s) al test del Rota-Rod dels animals control ( $n=7$ ) i dels sotmesos a exercici crònic ( $n=7$ ) a l'inici de l'estudi (0) i 36 dies després de començar amb el seguiment d'exercici (36). **B:** Representació gràfica de la velocitat que es va assolir (rpm) al test del rota-Rod de les rates control ( $n=7$ ) i les sotmeses a exercici crònic ( $n=7$ ) a l'inici de l'estudi (0) i passats 36 dies del seguiment d'exercici (36). L'estadística va ser analitzada amb un test

*T-Student entre les diferents variables i les diferències s'han considerat significatives quan  $p \leq 0,05$ . El símbol \* representa el p-valor obtingut al comparar els animals sotmesos a exercici crònic amb el respectiu control: (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ . El símbol # representa el p-valor obtingut al comparar els animals sotmesos a exercici crònic durant 36 dies amb ells mateixos el primer dia de l'experiment: (###)  $p \leq 0,001$ .*

Els animals sotmesos a exercici crònic incrementaren el temps de permanència sobre la roda en un 105,32% ( $p < 0,0001$ ) en comparació al respectiu control i també milloraren respecte a ells mateixos a l'inici del tractament en un 96,36% ( $p < 0,0001$ ). En quant a la velocitat que assoliren, les rates que havent dut a terme l'exercici estipulat, varen arribar a una velocitat un 73,81% ( $p < 0,0001$ ) major que a la que havien arribat el primer dia de l'estudi. A més, la velocitat d'aquestes rates sotmeses a exercici també va ser un 72,17% ( $p < 0,0001$ ) major que a la que arribaren les respectives control als 28 dies de l'inici de l'estudi.



## DISCUSSIÓ.

### **Efecte de l'exercici crònic sobre el sistema monoaminèrgic de l'estriat i l'hipocamp de rates velles.**

Tot i que hi ha molta polèmica en quant a com evoluciona el sistema monoaminèrgic amb l'edat i quines modificacions sofreix, es creu que hi ha un declivi dels neurotransmissors, els seus precursors i metabòlits relacionat amb l'envelliment (Moretti et al., 1987; Esteban et al., 2010a). Partint d'aquest punt, podem veure com la realització d'exercici provoca un augment significatiu dels nivells de dopamina i els seus precursors i metabòlits a l'estriat de rates velles comparant amb els animals control. A més, també a l'estriat, hi ha un augment significatiu de la serotonina i el seu precursor. El metabòlit de la serotonina també augmenta però no presenta diferències significatives. Es pot afirmar, basant-se en aquestes dades, que la realització d'un exercici continuat a edats avançades es tradueix en un a millora dels sistemes monoaminèrgics a nivell de l'estriat.

En quant a l'hipocamp, s'estudiaren els nivells de NA, 5-HT i els seus precursors i metabòlits. En tots els casos, els animals que havien estat sotmesos a exercici mostraren nivells significativament més elevats de les molècules analitzades (excepte el metabòlit de la serotonina) respecte dels animals control. En aquesta regió cerebral, la NA està relacionada amb la memòria de treball espacial (Rossetti i Carboni, 2005) i la 5-HT es troba molt lligada amb la memòria i el declivi motor relacionat amb l'edat (Buhot et al., 2003 (16); Sibille et al., 2007). Podriem dir, doncs, que l'exercici augmenta la producció d'aquests neurotransmissors a l'hipocamp i, com a conseqüència, millora la memòria dels individus durant l'envelliment. L'efecte positiu de l'exercici físic sobre el nivell de neurotransmissors ha estat reportat en altres estudis (Meeusen i De Meirleir, 1995).

S'ha de tenir present que mitja hora abans de sacrificar els animals, es va inhibir la DOPA-descarboxilasa, de manera que la quantitat de DOPA és l'acumulada durant la darrera mitja hora de vida de l'individu i, per tant, és proporcional a l'activitat de la tirosina hidroxilasa. Diversos estudis mostren que hi ha una disminució de tirosina hidroxilasa amb l'edat (McGeer et al., 1971; Esteban et al., 2010a, 2010b; Sarubbo et al., 2015). Els resultats han demostrat una major activitat d'aquest enzim a les rates obligades a realitzar exercici respecte de les control, la qual cosa implica que l'exercici modifica algun aspecte de l'efecte de l'envelliment sobre la tirosina hidroxilasa.

En el cas de la triptòfan hidroxilasa, l'afinitat d'aquest enzim per el seu substrat es veu disminuïda comparant rates adultes amb rates velles (Esteban et al., 2010a, 2010b; Sarubbo et al., 2015; Hussain et al., 2000). Igual que amb la tirosina hidroxilasa, la triptòfan hidroxilasa ha mostrat un augment de la seva activitat en les rates sotmeses a exercici ja que s'ha acumulat més 5-HTP que no pas a les rates control. Això també implica, de qualque manera, una acció de l'exercici sobre els mecanismes d'envelliment que actuen sobre aquest enzim. Ha estat reportat que, durant l'exercici, hi ha un augment de l'entrada de triptòfan (el

precursor de la 5-HT) al SNC (Meeusen, 2014) la qual cosa podria explicar l'augment de l'activitat de la triptòfan hidroxilasa (enzim limitant de la síntesi de 5-HT) que de forma natural no està saturada pel substrat triptòfan (Esteban et al., 2004).

### **Efecte de l'exercici crònic sobre la memòria espacial, la memòria no espacial i la coordinació motora.**

El Radial maze i el Test de Barnes foren les dues proves comportamentals utilitzades per a analitzar l'efecte de l'exercici sobre la memòria espacial. En el Radial maze, els animals sotmesos a exercici milloraren significativament el temps d'execució de la prova i disminuïren el nombre d'errors comesos durant aquesta comparant amb els respectius animals control i també respecte ells mateixos a l'inici de l'estudi. Aquests resultats apunten a que la realització d'exercici es va veure implicada amb el fet de que els animals recordassin a quins braços de l'estructura del laberint radial ja havien entrat i quins eren els que encara no havien examinat.

Al Test de Barnes, tot i que a la prova 3 i al Test no hi ha diferències significatives en el temps de latència entre les rates control i les exercici (la qual cosa significa que ambdós grups aprenen a trobar el *target* al llarg dels entrenaments de la prova), a la prova 1 i a la 2 sí que n'hi ha. El fet que sí hi hagi diferències significatives a la prova 1 i no al test pot ser degut a que els animals sotmesos a exercici se'n recordaven del test del dia anterior i anaven directes (o quasi) al forat corresponent mentre que els animals control havien de realitzar les proves per saber on trobar el *target*. Aquesta hipòtesi es confirma a l'analitzar l'estratègia utilitzada per ambdós grups, ja que els animals sotmesos a exercici utilitzen l'estratègia directe (no utilitzada pels animals control). Tot i això, els animals control aprenen, passant d'una estratègia mixta a una seriada, però mai utilitzen l'estratègia d'orientació espacial més eficient: la directa.

A ambdues proves els resultats mostraren una clara millora de la memòria/aprenentatge espacial de les rates sotmeses a un mes d'exercici respecte a les rates control, amb unes diferències significatives entre elles.

Els resultats de la prova de Reconeixement d'objectes, utilitzada per mesurar la memòria episòdica, mostren que les rates obligades a fer exercici durant un mes, al final del tractament dedicaren molt més temps a l'exploració de l'objecte nou a l'hora de comparar-les amb el respectiu control i amb elles mateixes a l'inici del tractament. Per la seva capacitat intrínseca de tipus exploratori, ambdós grups visitaren més l'objecte nou que el familiar, tot i que en el cas de les sotmeses a exercici el temps dedicat a l'exploració del nou al final de l'estudi va ser molt major. Això mostra una millora significativa de la memòria de treball espacial d'aquests individus.

La coordinació motora, igual que la memòria espacial i no espacial, va millorar significativament a les rates sotmeses a exercici respecte de les control i també comparant-les amb elles mateixes a l'inici de l'estudi.

En conclusió es pot dir que tant la memòria espacial i no espacial com la coordinació motora es veuen influenciades positivament per la pràctica d'exercici crònic i progressiu a rates velles. Aquests resultats estan en la línia d'estudis que mostren que l'exercici millora la memòria i altres funcions cognitives a través de reduir l'atròfia cerebral típica de l'envelliment (Hötting et al., 2013).

### **Reciprocitat entre els resultats de les proves comportamentals i els anàlisis neuroquímics de les rates sotmeses a exercici crònic.**

Les dades de les proves comportamentals, com bé s'ha dit, mostren millores en la memòria espacial i no espacial de les rates, així com de la seva coordinació motora. Per altra banda, els resultats dels anàlisis neuroquímics mitjançant HPLC conclouen que els nivells de les monoamines estudiades i els seus precursors i metabòlits augmenten amb l'exercici. Aquesta correlació positiva entre els resultats es pot explicar, almenys en part, per l'important paper que juguen les monoamines en els processos de memòria i l'activitat locomotora (Esteban et al., 2010a, 2010b; Sarubbo et al., 2015).

La 5-HT està implicada en moltes funcions neuronals com per exemple l'alimentació, la son, el comportament sexual, el dolor, la cognició i la regulació cardíaca (McEntee et al., 1991). A més a més, aquest neurotransmissor està relacionat amb l'aprenentatge (Harvey, 1996) i, juntament amb la norepinefrina, altera el rendiment en tasques que requereixen la memòria recent (Ricaurte et al., 1993).

L'activació de la DA assegura una major persistència temporal de la memòria a l'hipocamp (Bethus et al., 2010). Aquesta monoamina també està implicada en el procés cognitiu de la memòria de treball (Williams et al., 1995) i en l'activitat locomotora a nivell de l'estriat (Berke et al., 2000). Per altra banda, s'ha vist també que alguns receptors de la DA estan relacionats amb les funcions mnemotècniques del còrtex prefrontal de primats (Sawaguchi et al., 1991).

Per últim, es sap que la NA, a nivells moderats, facilita la memòria de treball a l'escorça prefrontal i influeix en la memòria emocional a través de la modulació de l'amígdala en humans (Chamberlain, et al., 2006; van Stegeren, 2008).

En conjunt, els resultats demostren que la pràctica d'exercici al llarg de l'edat pot retardar el procés d'envelliment a nivell cerebral. Probablement, augmentant la plasticitat neuronal com ha estat suggerit en diversos estudis (Erickson et al., 2012; Yau et al., 2014; Meeusen, 2014).

## CONCLUSIONS.

Els estudis en quant als efectes de l'exercici físic sobre l'envelliment cerebral realitzats en humans són pocs i les conclusions que se'n poden treure no són clares ja que s'han de tenir en compte molts factors com el sexe, l'edat, la dieta o l'educació de l'individu. El present estudi ha estat realitzat amb animals, de manera que hem pogut controlar tots aquests factors i, a més, s'han pogut dur a terme estudis cerebrals després de sacrificar-los.

Amb els resultats obtinguts després de sotmetre a les rates velles a un programa d'exercici físic diari durant un més, es pot concloure que:

1. L'exercici millora les capacitats cognitives i la coordinació motora de rates velles mesurades a través de diverses proves comportamentals, frenant o ralentint els efectes negatius associats a l'edat.
2. L'exercici físic diari durant un mes implica un augment significatiu de la síntesi i metabolisme de la DA a l'estriat en base a l'augment d'acumulació de DOPA, DA i dels metabòlits HVA i DOPAC.
3. L'exercici físic diari durant un mes evidencia un increment significatiu de la síntesi i metabolisme de NA en base a l'augment d'acumulació de DOPA i del contingut de NA a l'hipocamp.
4. L'exercici físic diari durant un mes mostra un augment significatiu de la síntesi de 5-HT a l'hipocamp i estriat en base a l'augment d'acumulació de 5-HTP i dels contingut total de 5-HT.
5. Existeix una correlació positiva entre l'efecte que exerceix l'exercici físic sobre la memòria i sobre els nivells de les monoamines estudiades a l'estriat i l'hipocamp.

El recent increment del coneixement sobre els efectes positius de l'exercici físic proporciona una base per considerar-lo com a teràpia per retardar els mecanismes d'envelliment cerebral i també es podria tenir en compte a l'hora de tractar certes malalties neurodegeneratives en les quals els nivells de monoamines (DA, NA i 5-HT) es veuen reduïts.

## AGRAÏMENTS.

La realització d'aquest treball de fi de grau ha estat possible gràcies al suport tècnic i material del Laboratori de Fisiologia de la UIB. Voldria agrair especialment l'ajuda i el suport que m'han ofert na Margarita Ramis i na Susana Esteban al llarg del treball i també la seva amabilitat, disponibilitat i paciència.

## REFERÈNCIES.

- Anekonda TS. 2006. Resveratrol—A boon for treating Alzheimer's disease?. *Brain Research Reviews*. **52**(2): 316-326.
- Bäckman L, Nyberg L, Lindenberger U, Li SC, Frade L. 2006. The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: Current status and future prospects. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **30**(6): 791-807.
- Barnes DE, Yaffe K, Satariano WA, Tager IB. 2003. A longitudinal study of cardiorespiratory fitness and cognitive function in healthy older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*. **51**: 459-465.
- Berke JD, Hyman SE. 2000. Addiction, Dopamine, and the Molecular Mechanisms of Memory. *Neuron*. **25**(3): 515-532.
- Bethus I, Tse D, Morris RGM. 2010. Dopamine and Memory: Modulation of the Persistence of Memory for Novel Hippocampal NMDA Receptor-Dependent Paired Associates. *The Journal of Neuroscience*. **30**(5): 1610-1618.
- Buhot MC, Wolff M, Benhassine N, Costet P, Hen R, Segu L. 2003. Spatial Learning in the 5-HT1B Receptor Knockout Mouse: Selective Facilitation/Impairment Depending on the Cognitive Demand. *Learning & Memory*. **10**: 466-477.
- Chamberlain SR, Müller U, Blackwell AD, Robbins TW, Sahakian BJ. 2006. Noradrenergic modulation of working memory and emotional memory in humans. *Psychopharmacology*. **188**: 397-407.
- Chang RC, So K. 2008. Use of Anti-aging Herbal Medicine, Lycium barbarum, Against Aging-associated Diseases. What Do We Know So Far?. *Cellular and Molecular Neurobiology*. **28**(5): 643-652.
- De la Lastra CA, Villegas I. 2005. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Molecular Nutrition & Food Research*. **49**(5): 405-430.
- Erickson KI, Weinstein AM, Lopez OL. 2012. Physical Activity, Brain Plasticity and Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research*. **43**: 615-621.
- Esteban S, Garau C, Aparicio S, Moranta D, Barceló P, Ramis M, Tresguerres JAF, Rial RV. 2010a. Improving effects of long-term growth hormone treatment on monoaminergic neurotransmission and related behavioral tests in aged rats. *Rejuvenation Research*. **13**(6), 707-716.
- Esteban S, Garau C, Aparicio S, Moranta D, Barceló P, Fiol M.A., Rial RV. 2010b. Chronic melatonin treatment and its precursor L-tryptophan improve the monoaminergic neurotransmission and related behavior in the aged rat brain. *Journal of Pineal Research*. **48**: 170-177.
- Esteban S, Nicolaus C, Garmundi A, Rial RV, Rodríguez AB, Ortega E, Ibars CB. 2004. Effect of orally administered L-tryptophan on serotonin, melatonin, and the innate immune response in the rat. *Mol Cell Biochem*. **267**(1-2): 39-46.

- Etgen T, Sander D, Huntgeburth U, Poppert H, Forstl H, Bickel H. 2010. Physical activity and incident cognitive impairment in elderly persons: the INVADE study. *Archives of Internal Medicine*. **170**: 186-193.
- Fleischman DA, Yang J, Arfanakis K, Arvanitakis Z, Leurgans SE, Turner AD, Barnes LL, Bennett DA, Buchman AS. 2015. Physical activity, motor function, and white matter hyperintensity burden in healthy older adults. *Neurology*. **84**(13):1294-300.
- Foster TC. 2007. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell*. **6**(3): 319-325.
- Glorioso C, Sibille E. 2011. Between destiny and disease: genetics and molecular pathways of human central nervous System aging. *Progress in Neurobiology*. **93**(2): 165-181.
- Harvey JA. 1996. Serotonergic regulation of associative learning. *Behavioral Brain Research*. **73**: 47-50.
- Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. 2003. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of Neurology*. **60**: 1119-1122.
- Ho YS, So KF, Chang RC. 2010. Anti-aging herbal medicine—How and why can they be used in aging-associated neurodegenerative diseases?. *Ageing Research Reviews*. **9**(3): 354-362.
- Hötting, K, Roder B. 2013. Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **37**(9): 2243-2257.
- Hussain AM, Mitra AK. 2000. Effect of aging on tryptophan hydroxylase in rat brain: implications on serotonin level. *Drug Metabolism and Disposition*. **28**(9): 1038-1042.
- Masoro EJ. 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. **126**(9): 913-922.
- Mattson MP. 2008. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Annals of the New York Academy Sciences*. **1144**: 97-112.
- McEntee WJ, Crook TH. 1991. Serotonin, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*. **103**(2): 143-149.
- McGeer EG, Fibiger HC, McGeer PL, Wickson V. 1971. Aging and brain enzymes. *Experimental Gerontology*. **6**(6): 391-396.
- Meeusen R. 2014. Exercise, Nutrition and the Brain. *Sports Medicine*. **44**(Suppl 1): 47-57.
- Meeusen R. 2005. Exercise and the brain: insight in new therapeutic modalities. *Annals of transplantation*. **10**(4): 49-51.
- Meeusen R, De Meirleir K. 1995. Exercise and the brain neurotransmission. *Sports medicine*. **20**(3): 160-188.
- Moretti A, Carfagna N, Trunzo F. 1987. Effect of aging on monoamines and their metabolites in the rat brain. *Neurochemical Research*. **12**(11): 1035-1039.

- Park DC, Reuter-Lorenz P. 2009. The Adaptive Brain: Aging and Neurocognitive Scaffolding. *Annual Review of Psychology*. **60**: 173-196.
- Ramis MR, Esteban S, Miralles A, Tan D, Reiter R. 2015. Caloric restriction, resveratrol and melatonin: Role of SirT1 and implications for aging and related-diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*. **146-148**: 28-41.
- Ricaurte GA, Markowska AL, Wenk GL, Hatzidimitriou G, Wlos J, Olton DS. 1993. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, serotonin and memory. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **266**(2): 1097-1105.
- Rossetti ZL, Carboni S. 2005. Noradrenaline and Dopamine Elevations in the Rat Prefrontal Cortex in Spatial Working Memory. *The Journal of Neuroscience*. **25**(9): 2322-2329.
- Sarubbo F, Ramis M, Aparicio S, Ruiz L, Esteban S, Miralles A, Moranta D. 2015. Improving effect of long-term resveratrol treatment on central monoamines synthesis and cognition in aged rats. *Age*. **37**(3):9777. doi: 10.1007/s11357-015-9777-x.
- Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS. 1991. D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science*. **251**(4996): 947-950.
- Sergieiev PV, Dontsova OA, Berezkin GV. 2015. Theories of Aging: An Ever-Evolving Field. *Acta naturae*. **7**(1): 9-18.
- Sibille E, Su J, Leman S, Le Guisquet AM, Ibarguen-Vargas Y, Joeyen-Waldorf J, Glorioso C, Tseng GC, Pezzone M, Hen R, Belzung C. 2007. Lack of serotonin<sub>1B</sub> receptor expression leads to age-related motor dysfunction, early onset of brain molecular aging and reduced longevity. *Molecular Psychiatry*. **12**(11): 1042-1056.
- Van Stegeren AH. 2008. The role of the noradrenergic system in emotional memory. *Acta Psychologica*. **127**(3): 532-541.
- WHO, World Health Organisation. 2010. Global recommendations on physical activity for health. WHO Press, Geneva (2010): pàgs 52-53.
- Williams GV, Goldman-Rakic PS. 1995. Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature*. **376**: 572-575.
- Yankner BA, Lu T, Lorech P. 2008. The aging brain. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. **3**: 41-66.
- Yau S, Gil-Mohapel J, Christie BR, So K. 2014. Physical Exercise-Induced Adult Neurogenesis: A Good Strategy to Prevent Cognitive Decline in Neurodegenerative Diseases?. *BioMed Research International*. **2014**: 403120. doi: 10.1155/2014/403120.