

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía Humana, Medicina Legal e Historia de la Ciencia

TESIS DOCTORAL

**CAMBIOS MORFOFUNCIONALES DEL SISTEMA NERVIOSO
PRODUCIDOS POR SUPLEMENTACIÓN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
PRESENTADA POR

Ricardo González Carrascosa Latín

Director

Víctor Smith Fernández


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Ricardo Humberto González Carrascosa Latín

 <http://orcid.org/0000-0003-4076-4235>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía Humana, Medicina Legal e Historia de la Ciencia

**CAMBIOS MORFOFUNCIONALES DEL SISTEMA NERVIOSO
PRODUCIDOS POR SUPLEMENTACIÓN**

Ricardo González Carrascosa Latín

MALAGA 2016



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía Humana, Medicina Legal e Historia de la Ciencia

**CAMBIOS MORFOFUNCIONALES DEL SISTEMA NERVIOSO
PRODUCIDOS POR SUPLEMENTACIÓN**

Ricardo González Carrascosa Latín

VBº Bueno de los directores

MÁLAGA 2016





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Víctor Manuel Smith Fernández, Profesor Titular del Departamento de Anatomía Humana, Medicina Legal e Historia de la Ciencia de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA:

Que D. Ricardo González Carrascosa Latín, ha realizado bajo mi dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada: CAMBIOS FUNCIONALES DEL SISTEMA NERVIOSO PRODUCIDOS POR SUPLEMENTACIÓN CON FRESA. Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizo su presentación para optar el Grado de Doctor

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Málaga a trece de noviembre de dos mil quince.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

A mi esposa Mónica y mis hijos Humberto y Mónica por todo el tiempo que no he podido pasar junto a vosotros. Gracias porque vosotros sí que habéis estado siempre conmigo y habéis sido el motor de mi anhelo y mi corazón.

A Inés, gracias por estar siempre ahí, gracias por creer en mí y gracias por guiarme con la dulzura y la inteligencia que te caracterizan.

A Víctor, director, jefe y amigo, gracias por ser alguien con quien siempre he podido contar, con tu gran inteligencia y sencillez, por todo lo que me has enseñado como profesional y como persona.

A Javier, sin cuya incomprensible capacidad para leer datos y números nunca podríamos haber desenmarañado nuestro estudio, gracias por tu paciencia hacia nuestra ignorancia.

A las chicas del centro que lo llenan todo de jovialidad y alegría.

A Nani que me ha enseñado mucho sobre la vida y la condición humana.

Índices

Indice de Contenido

1	Introducción	3
1.1	Envejecimiento	3
1.1.1	Cambios morfológicos y estructurales.	6
1.1.2	Cambios metabólicos y bioquímicos.	10
1.1.3	Procesos inflamatorios.	14
1.1.4	Muerte celular. Apoptosis. Neuroregeneración	15
1.1.5	Alteraciones fisiológicas en el envejecimiento de carácter sistémico general.	16
1.1.6	Alteraciones funcionales y de comportamiento.	18
1.2	Preservación de las capacidades neurológicas.	22
1.2.1	El enriquecimiento ambiental y actividad intelectual.	23
1.2.2	El ejercicio.	23
1.2.3	La dieta.	23
1.3	Fresas	28
1.4	Pruebas de evaluación de envejecimiento mediante conducta.	30
1.4.1	Evaluación neurológica general.	31
1.4.2	Aprendizaje y Memoria.	32
1.4.3	Reversión de aprendizaje	34
1.4.4	Reconocimiento social y memoria social	34
1.4.5	Conducta exploratoria.	34
1.4.6	Ansiedad.	35
1.4.7	Actividad motora.	36
1.5	Modelos Animales, Envejecimiento y Suplementación.	36
2	Objetivos	40
3	Material y Métodos	44
3.1	Material	46
3.1.1	Animales	46
3.1.2	Dieta	46
3.1.3	Grupos	48
3.1.4	Análisis de grupos	50
3.1.5	Equipos	55
3.2	Método	55
3.2.1	Estrategia dietética	55
3.2.2	Programa.	56
3.2.3	Evaluación Neurológica.	56
3.2.4	Pruebas de conducta	58
3.3	Determinación del deterioro, preservación o mejora de las capacidades cognitivas y físicas.	62
3.3.1	Caracterización fenotípica de declive natural con el envejecimiento (FENOTIPADO)	62
3.3.2	Estudio del efecto dieta con fresas sobre el animal y la evolución de su envejecimiento.	64
3.4	Análisis estadístico	66
4	Resultados	67
4.1	Hallazgos en patologías asociadas al envejecimiento.	69

4.2	Dieta.	70
4.3	Determinación del deterioro relacionado con envejecimiento.	70
4.3.1	Caracterización fenotípica de declive natural con el envejecimiento.	70
4.3.2	Estudio del efecto y evolución del envejecimiento sometido a dieta con fresas.	105
5	Discusión.	205
5.1	Discusión material y método.	205
5.1.1	Animales.	205
5.1.2	Tratamiento dietético.	206
5.1.3	Programa.	207
5.1.4	Pruebas de conducta.	208
5.2	Discusión Resultados.	213
5.2.1	Generalidades caracterización del envejecimiento de la cepa.	213
5.2.2	Generalidades estudio de la suplementación con fresas.	213
5.2.3	Evaluación neurológica general.	213
5.2.4	Caracterización fenotípica de declive natural con el envejecimiento.	214
5.2.5	Estudio del efecto de la suplementación con fresas. Estudio A.	218
5.2.6	Estudio del efecto de la suplementación con fresas. Estudio B.	224
6	Conclusiones.	227
7	Bibliografía.	231

Índice de ilustraciones.

<i>Ilustración 1. Estrategias sistemáticas: al azar (RAND), círculos repetitivos (CIRC), vueltas encadenadas (CHAI), búsqueda concreta (SEAR), búsqueda focal incorrecta (SEARFI),</i>	59
<i>Ilustración 2. Estrategias espaciales: directa (SPAD), indirecta (SPAI), y focal correcta (SPAFC)</i>	60
<i>Ilustración 3. Consumo voluntario de fresa</i>	70
<i>Ilustración 4. Deterioro sensorial. Somestesis sensibilidad de la piel en distintos puntos. Caracterización</i>	71
<i>Ilustración 5. Deterioro sensorial. Olfato y Audición. Caracterización</i>	72
<i>Ilustración 6. Termalgesia. Caracterización.</i>	72
<i>Ilustración 7. Evolución del deterioro en equilibrio, propiocepción y reflejos asociados. . Caracterización.</i>	74
<i>Ilustración 8. Evolución de esfuerzo de agarre. Caracterización.</i>	75
<i>Ilustración 9. Caracterización Envejecimiento. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Latencia de escape</i>	77
<i>Ilustración 10. Caracterización Envejecimiento. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Distancia de escape</i>	78
<i>Ilustración 11. Memoria espacial. . Caracterización envejecimiento. Distancias, laberinto acuático de Morris. Curvas de aprendizaje ensayos 1 al 4.</i>	79
<i>Ilustración 12. Memoria. Porcentaje de estrategias de búsqueda, evolución del primero al cuarto días de ensayo. Caracterización en distintas edades.</i>	83
<i>Ilustración 13. Caracterización Envejecimiento. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. % Tiempo de Estancia en el cuadrante de escape.</i>	84
<i>Ilustración 14. Caracterización Envejecimiento. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. % Distancia recorrida en el cuadrante de escape.</i>	85
<i>Ilustración 15. Caracterización Envejecimiento. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Nº de Entradas en el cuadrante de escape.</i>	86
<i>Ilustración 16. Memoria social. Tiempos de conducta social. (Azul primera presentación, verde: segunda presentación mismo individuo, beige: presentación distinto individuo test contraste)</i>	87
<i>Ilustración 17. Memoria social. Tiempo de retención máxima 30', 45', 60'. Caracterización.</i>	88
<i>Ilustración 18. Capacidad de reversión. Latencia de escape día de ensayo 5 intento 4</i>	90
<i>Ilustración 19. Capacidad de reversión. Distancia de escape día de ensayo 5 intento 4.</i>	90
<i>Ilustración 20. Aprendizaje. Capacidad de reversión. Caracterización de animales mayores de 15 meses.</i>	92
<i>Ilustración 21. Capacidad de reversión. Curvas de Latencias de escape en los intentos 1-4 de día de ensayo 5.</i>	93
<i>Ilustración 22. Capacidad de reversión. Curvas de distancias de escape en los intentos 1-4 de día de ensayo 5.</i>	93
<i>Ilustración 23. Trayectorias recorridas en campo abierto. Grupo basal (4 meses)</i>	94
<i>Ilustración 24. Ansiedad. Distribución de las distancias recorridas y porcentaje de actividad en la zona periférica y central. Evolución con la edad.</i>	95
<i>Ilustración 25. Patrón de conductas en Open Field. Evolución durante el envejecimiento.</i>	96
<i>Ilustración 26. Motilidad y capacidad física. Distancia Recorrida en campo abierto.</i>	97
<i>Ilustración 27. Motilidad en campo abierto. Velocidad media de movimiento voluntario</i>	98

<i>Ilustración 28. Motilidad y capacidad física. Actividad Global en campo abierto.</i>	99
<i>Ilustración 29. Ansiedad. Permanencia en la periferia Laberinto acuático. Cuadro 1 promedio distancia recorrida. Cuadro 2 porcentaje de tiempo</i>	101
<i>Ilustración 30. Capacidad física. Velocidad media de natación en laberinto acuático.</i>	102
<i>Ilustración 31. Motilidad Capacidad física. Velocidad media de natación. Evolución envejecimiento.</i>	103
<i>Ilustración 32. Evaluación neurológica. Somestesis, sensibilidad de la piel. Estudio A</i>	107
<i>Ilustración 33. Evaluación neurológica. Olfato y oído. Estudio A</i>	108
<i>Ilustración 34. Evaluación neurológica. Termalgesia. Estudio A</i>	109
<i>Ilustración 35. Evaluación neurológica. Somestesis sensibilidad de la piel estudio del deterioro con la edad. Estudio A</i>	111
<i>Ilustración 36. Evaluación neurológica. Deterioro de los sentidos olfato y audición con la edad. Estudio A</i>	112
<i>Ilustración 37. Evaluación neurológica. Termalgesia comparación pre y postsuplementación. Estudio A</i>	113
<i>Ilustración 38. Evaluación neurológica. Deterioro sensitivo con la edad, análisis de termalgesia. Estudio A</i>	114
<i>Ilustración 39. Evaluación neurológica. Comparación pre y postsuplementación de equilibrio y reflejos relacionados con la propiocepción. Estudio A</i>	115
<i>Ilustración 40. Evaluación neurológica. Deterioro con la edad de equilibrio y reflejos relacionados con la propiocepción. Estudio A</i>	116
<i>Ilustración 41. Evaluación neurológica. Reflejos relacionados con la propiocepción. Estudio A</i>	118
<i>Ilustración 42. Evaluación neurológica. Deterioro de reflejos relacionados con la propiocepción. Estudio A</i>	119
<i>Ilustración 43. Evaluación neurológica. Esfuerzo de agarre al alambre. Estudio A</i>	120
<i>Ilustración 44. Evaluación neurológica. Deterioro de capacidad física con la edad esfuerzo e medido como tiempo de permanencia agarro al alambra. Estudio A</i>	121
<i>Ilustración 45. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Resultados basal y posterior suplementación. Latencia de escape. Estudio A. 0=Controles. 1= suplementados.</i>	122
<i>Ilustración 46. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Latencia de escape evolución de resultados basal y posterior a suplementación durante el envejecimiento. Estudio A.</i>	123
<i>Ilustración 47. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Resultados basal y posterior suplementación. Distancia de escape. Estudio A. azul=Controles. Verde= suplementados</i>	124
<i>Ilustración 48. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Distancia de escape evolución de resultados basal y posterior a suplementación durante el envejecimiento. Estudio A. azul=Controles.</i>	125
<i>Ilustración 49. Aprendizaje. Comparación de las distancias de escape recorridas entre el primer y cuarto día en las fases basal y posterior a la suplementación enfrentando animales controles y suplementados con fresa. Estudio A</i>	126
<i>Ilustración 50. Aprendizaje. Estudio de evolución con la edad de las latencias de escape recorridas entre el primer y cuarto día entre animales controles y suplementados con fresa. Estudio A</i>	127



- Ilustración 51. Aprendizaje. Estudio de evolución con la edad de las distancias de escape recorridas entre el primer y cuarto día entre animales controles y suplementados con fresa. Estudio A* 128
- Ilustración 52. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Proporción de estrategias de búsqueda animales controles. Izquierda: determinación basal, derecha posterior a suplementación. Azul= estrategias espaciales. Otros: estrategias no espaciales.* 129
- Ilustración 53. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Proporción de estrategias de búsqueda animales suplementados. Izquierda basal, derecha posterior a suplementación. Azul= estrategias espaciales. Otros: estrategias no espaciales.* 130
- Ilustración 54. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Proporción de estrategias de búsqueda en 4º día de ensayo y 4º intento. Evolución con la edad. Azul: estrategias espaciales. Otros: estrategias no espaciales.* 132
- Ilustración 55. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. % tiempo en cuadrante de escape evolución de resultados basal y posterior a suplementación durante el envejecimiento. Estudio A.* 133
- Ilustración 56. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Resultados basal y posterior suplementación. Porcentaje de distancia en cuadrante de escape. Estudio A. 0=Controles. 1= suplementados.* 134
- Ilustración 57. Memoria espacial, Laberinto acuático de Morris. % tiempo permanencia en cuadrante de escape evolución de animales controles y suplementados durante el envejecimiento. Estudio A.* 135
- Ilustración 58. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. % distancia recorrida en cuadrante de escape evolución de animales controles y suplementados durante el envejecimiento. Estudio A.* 136
- Ilustración 59. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Entradas en el cuadrante de escape.* 137
- Ilustración 60. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Nº de entradas en cuadrante de escape evolución de resultados basal y posterior a suplementación durante el envejecimiento. Estudio A* 138
- Ilustración 61. Aprendizaje. Capacidad de reversión de aprendizaje medido como latencias de escape en el último intento del quinto día de ensayo. Comparando fases basal y posterior a suplementación, animales controles y suplementados con fresa.* 140
- Ilustración 62. Aprendizaje. Capacidad de reversión de aprendizaje estudio gráficos de latencias en los intentos primeros al cuarto del quinto día de ensayo. Comparando fases basal y posterior a suplementación, animales controles y suplementados con fresa.* 141
- Ilustración 63. Capacidad de reversión. Efecto fresa determinaciones basal y posterior a la suplementación. Estudio A* 142
- Ilustración 64. Aprendizaje. Capacidad de reversión de aprendizaje estudio gráficos de distancias en los intentos primeros al cuarto del quinto día de ensayo. Comparando fases basal y posterior a suplementación, animales controles y suplementados con fresa.* 143
- Ilustración 65. Capacidad de reversión. Latencia de escape del 4º intento, 5º día de ensayo. Evolución con la edad de animales control y suplementados. Estudio A.* 144
- Ilustración 66. Capacidad de reversión. Distancia de escape del 4º intento, 5º día de ensayo. Evolución con la edad de animales control y suplementados.* 145
- Ilustración 67. Ansiedad. % tiempo de permanencia en zona periférica en campo abierto (OF), comparación entre fases basal y posterior y animales controles y suplementados con fresa. Estudio A* 146



<i>Ilustración 68. Ansiedad. % de Tiempo de permanencia en zona periférica OF Evolución con la edad de los animales controles y tratados.</i>	147
<i>Ilustración 69. Actitud y motivación exploratoria. Conductas en OF. Episodios de rearing. Estudio A.</i>	148
<i>Ilustración 70. Ansiedad y miedo. Conductas en OF. Episodios de grooming. Estudio A.</i>	149
<i>Ilustración 71. Ansiedad y miedo. Conductas en OF. Episodios de deposiciones. Estudio A.</i>	150
<i>Ilustración 72. Estudio de conductas en OF. Episodios de rearing, grooming y defecation. Estudio A.</i>	151
<i>Ilustración 73. Actitud exploratoria. Evolución de las conductas en OF con la edad. Episodios de rearing. Estudio A.</i>	152
<i>Ilustración 74. Ansiedad y miedo. Evolución de las conductas en OF con la edad. Episodios de grooming. Estudio A.</i>	153
<i>Ilustración 75. Actitud y motivación exploratoria. .Distancia recorrida voluntariamente en campo abierto. Comparación entre fases basal y posterior a la suplementación y entre animales tratados y controles. Estudio A.</i>	154
<i>Ilustración 76. Actitud exploratoria. Evolución de las distancias recorridas voluntariamente en OF con la edad. Estudio A.</i>	155
<i>Ilustración 77. Capacidad Física Velocidad media de desplazamiento voluntario en campo abierto. Cuadro 1 resultados previos y posteriores; cuadro 2 evolución durante el envejecimiento.</i>	157
<i>Ilustración 78. Capacidad Física Velocidad media de desplazamiento voluntario en campo abierto. Cuadro 1 resultados previos y posteriores; cuadro 2 evolución durante el envejecimiento.</i>	158
<i>Ilustración 79. Capacidad física. Actividad Global total (cm2/sg) en campo abierto. Comparativa entre fases basal y posterior a suplementación con fresa y animales control y suplementados con fresa. Estudio A.</i>	160
<i>Ilustración 80. Capacidad física. Actividad Global total (cm2/sg) en campo abierto. Evolución con la edad. Estudio A</i>	161
<i>Ilustración 81. Ansiedad. % Tiempo de permanencia en la periferia. Efecto de suplementación con fresas. Resultados fase basal y posterior comparación entre animales controles y suplementado con fresa. Estudio A</i>	162
<i>Ilustración 82. Ansiedad. % Distancia recorrida en la periferia laberinto acuático de Morris. Efecto de la suplementación con fresas. Resultados basales y posteriores. Estudio A</i>	163
<i>Ilustración 83. Ansiedad. % Tiempo de permanencia en la periferia de MWM. Estudio con la edad. Comparación entre animales controles y suplementado con fresa. Estudio A.</i>	164
<i>Ilustración 84. Ansiedad. % Distancia recorrida en la periferia de MWM. Estudio con la edad. Comparación entre animales controles y suplementado con fresa. Estudio A</i>	165
<i>Ilustración 85. Motilidad y capacidad física. Efecto de suplementación de fresas en la velocidad media de natación en laberinto acuático. Resultados basal y posteriores a la suplementación.</i>	166
<i>Ilustración 86. Motilidad y capacidad física. Velocidad Media Natación en Laberinto Acuático de Morris MWM. Evolución con la edad de animales controles y suplementados. Estudio A</i>	167
<i>Ilustración 87. Actividad total en laberinto acuático. Cuadro 1 resultados previos y posteriores; cuadro 2 evolución durante el envejecimiento.</i>	168
<i>Ilustración 88. Motilidad y capacidad física. Actividad global Total Laberinto Acuático de Morris. Evolución Envejecimiento Animales controles y suplementados. Estudio A</i>	169



<i>Ilustración 89. Evaluación neurológica. Estudio gráfico Somestesis, sensibilidad de la piel. Estudio B</i>	171
<i>Ilustración 90. Evaluación neurológica. Equilibrio Reflejos relacionados con la propiocepción. Estudio B.</i>	172
<i>Ilustración 91. Evaluación neurológica. Termalgesia. Tiempos de retirada en HP. Comparativa entre fases basal y posterior a la suplementación y animales controles suplementados con fresa. Estudio B</i>	173
<i>Ilustración 92. Evaluación neurológica. Capacidad física y Esfuerzo. Tiempos de permanencia agarrado al alambre. Comparativa entra fases basal y posterior a la suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B</i>	174
<i>Ilustración 93. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Latencia de escape. Estudio B.</i>	175
<i>Ilustración 94. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Distancia de escape. Estudio B.</i>	176
<i>Ilustración 95. Aprendizaje. Comparación de las latencias de escape recorridas entre el primer y cuarto día en las fases basal y posterior a la suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B.</i>	177
<i>Ilustración 96. Aprendizaje. Comparación de las distancias de escape recorridas entre el primer y cuarto día en las fases basal y posterior a la suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B</i>	178
<i>Ilustración 97. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Proporción estrategias de búsqueda. Azul estrategias espaciales.</i>	180
<i>Ilustración 98. Memoria espacial. % Tiempo permanencia en el cuadrante de escape 1º intento de 5º día de ensayo. Estudio B</i>	181
<i>Ilustración 99. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. % Distancia recorridas en el cuadrante correcto. Estudio B.</i>	182
<i>Ilustración 100. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Entradas en el cuadrante de escape.</i>	183
<i>Ilustración 101. Aprendizaje. Reversión de aprendizaje. Latencia de escape en el 4º intento 5º día de ensayo. Estudio B.</i>	185
<i>Ilustración 102. Aprendizaje. Reversión de aprendizaje. Distancia de escape en el 4º intento 5º día de ensayo. Estudio B.</i>	186
<i>Ilustración 103. Capacidad de reversión. Latencias en los intentos 1-4 del 5º día de ensayo. Animales control. Estudio B</i>	187
<i>Ilustración 104. Capacidad de reversión. Distancias recorridas en los intentos 1-4 del 5º día de ensayo. Animales suplementados con fresa. Estudio B</i>	187
<i>Ilustración 105. Ansiedad y miedo. % de Tiempo de permanencia en la zona periférica en OF. Comparación entre fases basal y posterior a suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B</i>	188
<i>Ilustración 106. Actitud y motivación exploratoria. Conductas en OF. Episodios de rearing. Comparación entre fases basal y posterior a suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B</i>	190
<i>Ilustración 107. Ansiedad y miedo. Conductas en OF. Episodios de grooming. Comparación entre fases basal y posterior a suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B</i>	191
<i>Ilustración 108. Conductas voluntarias en open Field. Estudio B</i>	192
<i>Ilustración 109. Motilidad y capacidad física. Distancia recorrida voluntariamente en OF. Comparación entre fases basal y posterior a suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B.</i>	193



<i>Ilustración 110. Motilidad y capacidad física. Velocidades medias en las zonas periférica y central de desplazamiento</i>	195
<i>Ilustración 111. Motilidad y capacidad física. Actividad global realizada voluntariamente en OF. Comparación entre fases basal y posterior a suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B.</i>	196
<i>Ilustración 112. Ansiedad y miedo. % Tiempo de permanencia en la zona periférica en MWM. Estudio B</i>	198
<i>Ilustración 113. Motilidad y capacidad física. Efecto de suplementación de fresas en la velocidad media en desplazamiento en campo abierto. Estudio B.</i>	199
<i>Ilustración 114. Motilidad y capacidad física. Efecto de suplementación de fresas en la actividad global en laberinto acuático. Estudio B.</i>	200
<i>Ilustración 115. Resultados de los tiempos de conductas de reconocimiento de un animal novedoso 24 h después, contrastados con los tiempos de aprendizaje y reconocimiento iniciales. (comparar con la gráfica de la ilustración 15)</i>	209
<i>Ilustración 116. Correlación entre distancia total recorrida voluntariamente en campo abierto y % de tiempo y distancia ocupados en la periferia (tignotaxis) como correlación entre actitud exploratoria y ansiedad.</i>	211
<i>Ilustración 117. Actitud exploratoria. Distancia recorrida voluntariamente en campo abierto el día 1 y tras habituación.</i>	212
<i>Ilustración 118. Patrón de búsqueda 4 meses. En marrón último emplazamiento plataforma de la plataforma.</i>	215
<i>Ilustración 119: Patrón de búsqueda 15 meses. En marrón último emplazamiento plataforma de la plataforma.</i>	215
<i>Ilustración 120: patrón de búsqueda típico 18 meses. En marrón último emplazamiento plataforma de la plataforma.</i>	216
<i>Ilustración 121. Patrón de búsqueda 24 meses. En marrón último emplazamiento plataforma de la plataforma.</i>	216
<i>Ilustración 122. Patrón de búsqueda 28 meses. En marrón último emplazamiento plataforma de la plataforma.</i>	216



Resumen

RESUMEN

Los condicionantes que modulan el deterioro de las capacidades físicas y cognitivas durante el envejecimiento están fuertemente influenciados por los hábitos de vida. Los efectos más relevantes son declive cognitivo, alteraciones psicoemocionales y descenso en la capacidad física y de esfuerzo. La dieta saludable es una estrategia básica de “envejecimiento saludable”. En nuestro estudio realizamos una suplementación con fresa fresca almacenada en nevera, en un grupo de animales envejecidos naturalmente para observar los efectos de ésta sobre el deterioro cognitivo y físico de los animales. Realizamos la suplementación ad libitum y adecuándose a las costumbres y condiciones habituales de la alimentación en un entorno real. Asumimos así toda la variabilidad de esta práctica sobre las concentraciones de fitoquímicos activos y la variabilidad inherente al consumo ad libitum.

78 ratas Wistar Kyoto fueron suplementadas durante una temporada a distintas edades y se les realizaron test de conducta en laberinto acuático, campo abierto y conducta social para determinar la influencia de esta suplementación sobre el envejecimiento. Realizamos un estudio de caracterización del envejecimiento de esta cepa para poder comparar con nuestro grupo experimental, también analizamos los resultados previos y posteriores a la toma de fresas sobre los mismos grupos de animales. Los animales muestran un deterioro cognitivo y físico con la edad, apreciable mediante las pruebas aplicadas en este estudio, exceptuando las pruebas de conducta social y de estado ansioso que no se modifican. Existe, en estos animales, un efecto de consolidación de la memoria procedimental en MWM que dura hasta los 2 meses. Se aprecian tendencias a detener el deterioro cognitivo y físico y no tanto a modificar la ansiedad cuando observamos la evolución del deterioro con la edad entre animales suplementados y no suplementados. La suplementación de fresas produce de manera significativa un menor grado de deterioro físico y neuromotor durante el envejecimiento en la velocidad media de natación, actividad global acuática y equilibrio, pero no en velocidad media de deambulación, o en la prueba de agarre. La inestabilidad de la expresión de conductas en esta cepa, la alta morbimortalidad en estas edades y otros factores de variabilidad propios de los principios de este estudio han condicionado la significación estadística.

Palabras clave: envejecimiento, deterioro cognitivo, dieta sana, fitoquímicos, vegetales, conducta, Wistar Kyoto.

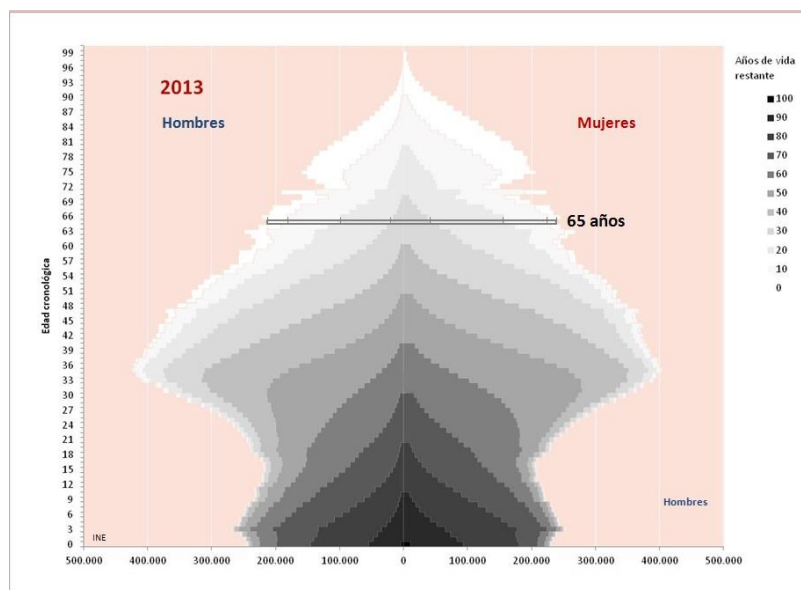
Introducción

1 Introducción

1.1 Envejecimiento

En la época actual y en la mayoría de las sociedades y culturas se produce una serie de circunstancias convergentes como: la prolongación de la esperanza de vida, el descenso de las tasas de natalidad y fecundidad que están desembocando en un notable y rápido envejecimiento de la población (1).

La población de personas de 65 años está sobrepasando por primera vez en número a las más jóvenes de 15 años por primera vez. Este dato aporta una destacada llamada de atención sobre la inversión de la pirámide poblacional de edad y el marco en el que se va a enfrentar en un porvenir próximo la humanidad. Todo el sistema económico, laboral, social y mucho más el sanitario se ve ya presionado por este hecho, necesitando adaptarse de forma más o menos dramática a la realidad de este ensanchamiento de la cúspide de la pirámide poblacional (2).



Los efectos del envejecimiento sobre la salud general de la población van a depender no solo del proceso natural y la base genética, sino, de manera muy importante de factores extrínsecos como el ámbito geográfico, la contaminación ambiental, nutrición, el estrés, y factores intrínsecos como la hábitos de vida como sedentarismo, consumo de sustancias y factores psicológicos del individuo como la personalidad individual, los objetivos vitales existenciales, etc...

La permanencia de personas mayores no tendría que ser un lastre para el conjunto de la sociedad ni para sí mismas, bajo la perspectiva de los conocimientos que se van derivando de las investigaciones al respecto. Envejecimiento desde este punto de vista es un proceso por el que se llega a viejo independientemente de la edad cronológica (3). Senectud es un término que hace referencia al estado de vejez característico de los últimos años de la vida, pero nos gustaría concienciar que no tiene porqué

correlacionarse de manera forzosa con las patologías que usualmente encontramos en este periodo.

El proceso de envejecimiento conlleva una serie de cambios en los individuos, resultado de una disputa “muy compleja” entre mecanismos degenerativos y los mecanismos reformadores y adaptativos que se producen a lo largo de la vida. Sobre estos mecanismos, además intervienen interacciones que afectan a todos los niveles, genéticos, epigenéticos, sexuales, ambientales e incluso de hábitos de vida, educativos y sociales.

Entendemos de modo amplio que el envejecimiento es el deterioro progresivo de las funciones biológicas que padece un organismo después de haber superado su periodo de capacidad reproductora. Sin embargo este concepto no recoge el fenómeno de maduración, que refiere una serie de cambios cualitativos con respecto a la juventud que se traducen en mejoría de determinadas funciones. Por lo tanto, al estudiar el fenómeno debemos distinguir aquellos aspectos positivos que ocurren durante un envejecimiento normal y sano y aquellos aspectos menos deseables que desembocan en mermas o patologías cuyo determinismo se intenta poner en suspensión mediante la investigación de los procesos que lo afectan.

El V programa Marco de Investigación, Desarrollo Tecnológico y Demostración (I+D), instrumento de la política científica y tecnológica de la unión Europea, incluyó el envejecimiento (enfermedades relacionadas con la edad avanzada; determinantes de envejecimiento; minusvalías; demografía y epidemiología; asistencia sanitaria) como una de las acciones claves a emprender en I+D y cuyo presupuesto supuso el 16,1 % del adjudicado en el quinquenio 1998-2000. El futuro del envejecimiento pasa por fomentar nuestro conocimiento para poder prevenir las enfermedades relacionadas con él. En principio todos apuntan a que lo que entendemos por “vida sana” guarda las bases de esta prevención y cada investigación en el tema dilucida qué aspectos relacionan este concepto con la prevención de enfermedades relacionadas con la vejez. Por tanto, un objetivo importante de la investigación en el ámbito del envejecimiento, va a ser descubrir los factores que contribuyan a promover el envejecimiento saludable. El buen funcionamiento cognitivo es la base de lo que se ha llamado “envejecimiento exitoso”.

En nuestra tesis nos centramos solo en el aspecto biológico del asunto dejando de lado las connotaciones sociales y culturales que oscurecen la comprensión de los principios y etiología del envejecimiento.

El concepto de envejecimiento abarca a todo el proceso biológico aparentemente programado que transforma el metabolismo y la morfología de los seres vivos hasta su incapacidad para adaptarse y sobrevivir, terminando por ende, con la muerte. El sentido evolutivo de este proceso puede entenderse como programado o como el fracaso del individuo en su intento por perdurar, en cualquiera de los casos no entendemos el beneficio evolutivo del proceso de envejecimiento. Pero posiblemente en la dinámica de poblaciones sea una apuesta por el paradigma evolutivo de la adaptación. El hecho de que el ser humano se mantenga vital tras finalizar su competencia reproductiva, es desde el punto de vista evolutivo explicable y determinante a la hora de dilucidar el éxito que sobre el planeta ha tenido la especie humana. La experiencia acumulada en la memoria individual es al final acumulada y transmitida por la comunidad siendo la base biológica evolutiva de la sociedad. Además es el sistema nervioso el centro de este paradigma de la evolución.

En la actualidad existen numerosas teorías que intentan explicar el origen de esta sucesión de cambios. Entre las más populares la programación genética y la oxidación de los radicales libres (4). Pero otras explican el asunto desde el punto de vista

inmunológico, acumulación de productos de desecho, mutación somática del ADN, teorías de fallos acumulativos en la síntesis de proteínas, deterioro endocrino, privación celular, estrés, etc. Ninguna explica de forma satisfactoria todo el asunto y todas se complementan.

A nivel tisular varios factores convergen en el envejecimiento de los distintos tejidos:

- Factores genéticos: alteraciones de los cromosomas y de las divisiones celulares.

- Factores metabólicos: síntesis de proteínas anormales y toxicidad por radicales libres.

- Factores inmunológicos: reducción de la capacidad inmunológica humoral y celular.

- Factores de riesgo sobreañadidos: tabaco, alcohol, colesterol elevado, obesidad, diabetes mellitus, hipertensión, etc.

- Factores vasculares: arterioesclerosis con disfunción sobre la microcirculación.

- Factores hormonales.

- Factores accidentales: patologías sistémicas, intervenciones quirúrgicas, traumatismos...

Desde el punto de vista teórico el programa genético de la edad puede actuar mediante cambios paulatinos de la propia estructura genética o en la ineficiencia adquirida para regular su transcripción. Este transcurso de sucesos a nivel celular, se ve abortado después de un determinado punto de irreversibilidad por el mecanismo de muerte celular programada (apoptosis) cuyo objeto es el mantenimiento de los tejidos y sistemas libres de este acúmulo de células inservibles y detritus histológico, y con ello mantenimiento del conjunto orgánico. El reemplazo de estas células y de su entorno histológico es el contrapunto del equilibrio en el que se mueve el organismo vital y sano. El desequilibrio de estos procesos, por tanto es el comienzo de la cadena de acontecimientos que desemboca en los signos de deterioro que identificamos con el envejecimiento.

Este abanico de factores que intervienen, complica el estudio del envejecimiento ya que abarca a múltiples disciplinas científicas, y dado el enorme interés que suscita para la comunidad científica actual aparecen cientos de vías de investigación sobre las causas de las patologías relacionadas con el envejecimiento y su prevención o mejora.

Es muy notable que las secuelas del envejecimiento a nivel cerebral en concreto, implica un considerable peso en consecuencias sanitarias inmediatas como son las enfermedades neurodegenerativas (demencias, Alzheimer, Parkinson etc.), además su impacto se extiende a lo social, laboral y económico, y por las dramáticas derivaciones sobre los pacientes y familiares. Es por ello uno de los aspectos más preocupantes del envejecimiento para la población occidental.

Del envejecimiento general del individuo la faceta que afecta al envejecimiento del sistema nervioso no puede desligarse del resto de la fisiología en conjunto ya que por

sentido común la interrelación entre todos los sistemas orgánicos no permite ese aislamiento en los estudios.

En resumen los mecanismos biológicos del envejecimiento nervioso se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Acumulación de alteraciones en el ADN genómico y mitocondrial.
- Depósito de proteínas insolubles.
- Exceso de radicales libres, alteraciones metabólicas.

Alteraciones en los procesos de apoptosis y regeneración neuronal relacionadas con los ciclos de producción de factores neurotróficos. La aparición de estas modificaciones afecta a la fisiología del sistema nervioso produciendo un cierto deterioro cuyo calado y efecto va a depender de la naturaleza y distribución de las modificaciones. No obstante este efecto va a variar por mecanismos incomprendidos de unos individuos a otros. De tal modo que incluso con iguales modificaciones en densidad, extensión y distribución dos individuos van a expresar un comportamiento diferente.

Las principales consecuencias de estas transformaciones sobre la vida de las personas son el declive cognitivo y neuromotor que padecen los ancianos en mayor o menor grado. En general afectan en distinto grado, cuyo estado más extremo son las patologías neurodegenerativas mencionadas: demencias seniles, enfermedad de Alzheimer, Parkinson etc.

Haciendo un repaso de los principios del envejecimiento que nos interesan en nuestro estudio, vamos a sintetizar los siguientes aspectos: cambios estructurales, cambios bioquímicos, la muerte celular y la neuroregeneración, alteraciones fisiológicas propias del sistema nervioso y de carácter general que lo afectan, alteraciones funcionales y de conducta, factores que preservan las capacidades neurológicas a lo largo del envejecimiento, el impacto de la dieta y como las fresas pueden contribuir a la mejora de la calidad de las funciones durante el envejecimiento.

1.1.1 Cambios morfológicos y estructurales.

Sobre el sistema nervioso a lo largo de la vida, se producen una serie de modificaciones estructurales, tanto micro como macroscópicas, que identifican el progreso cualitativa y cuantitativamente.

Estudio macroscópico: Descenso del peso del cerebro, disminución del volumen cerebral con aumento del tamaño de los surcos y disminución de las circunvoluciones cerebrales. Según Murphy y col. (5), la disminución ocurre tanto en hombres como mujeres. Comienza a partir de los 20 años suele ocasionar en torno a 10% (90-100 gr) a lo largo de todo el ciclo vital (6). Se apuntan cifras al respecto como que a partir de los dos años de vida, en que el ser humano tiene el máximo número de neuronas comienza a perder unas 20.000 diarias y que tras cumplir los cuarenta años la velocidad asciende a 100.000 diarias. Estimando que el número de partida es de 100.000 millones a un billón de ellas (7) el problema de cómo afecta esta realidad a la función neurológica deja a la plasticidad neuronal, a la capacidad de regeneración y al soporte de las neuronas en el punto de mira de las posibles respuestas a como se mantienen determinadas personas vitales y capaces hasta el final de sus días.

Estudio microscópico: Se observan una serie de cambios celulares en el tejido cuyo orden de aparición no es sucesivo, pudiéndose dar complejas relaciones causa



efecto que afecta a los siguientes aspectos celulares del envejecimiento. Se pueden esquematizar como siguen:

Disminución del volumen y número de células.

- A) Atrofia y muerte neuronal.
- B) Pérdida de sustancia blanca

Acumulo de pigmentos

- C) Acúmulo de lipofuscina y aparición de neuromelanina,

Depósito de proteínas del citoesqueleto.

D) Degeneración granulovacuolar y neurofibrilar con formación de placas neuríticas, gránulos agiروفílicos

Atrofia sináptica y pérdida de dendritas

- E) Distrofia en axones del sistema nervioso autónomo.
- F) Cambios en el patrón de distribución de los parámetros de la plasticidad sináptica.

Proliferación de células inflamatorias y astrocitos.

A) Atrofia y muerte neuronal. Durante el proceso de envejecimiento normal, las neuronas de la corteza cerebral mueren, pero no de un modo generalizado. En general presentan una hipertrofia y una pérdida de ramificaciones de su árbol dendrítico de forma generalizada. Sin embargo, otras neuronas (localizadas en el tronco encefálico) mueren en gran número durante la senectud. Los sistemas neuronales más afectados son los que sintetizan los neurotransmisores acetilcolina, noradrenalina y dopamina. En particular, los sistemas dopaminérgicos, es decir, las vías neuronales que liberan dopamina en áreas estratégicas del cerebro, presentan una degeneración lenta y progresiva con el envejecimiento. Son las zonas del cerebro relacionadas con el movimiento (ganglios basales), con la planificación de futuros actos de conducta (corteza prefrontal), con la interfaz interacción/acción (corteza cingulada), con la emoción (núcleo acumbens) y también con el control de la secreción de hormonas (hipotálamo). Sin embargo, estudios recientes ponen de manifiesto que, a pesar de que hay un descenso en el número de neuronas de estos y otros sistemas dopaminérgicos, a medida que se instaura el proceso de muerte neuronal emergen otros sistemas compensatorios que pueden adaptar la funcionalidad del sistema. Hasta tiempos recientes se ha pensado de forma extensa, que el empobrecimiento en rendimiento cognitivo relacionado con la edad era resultado de la inevitable **pérdida de neuronas**. Esto está basado en la extensa publicación existente, que reporta el dramático descenso del número de neuronas sobretodo dentro de la zona hipocampal y mayormente en áreas neocorticales (8–11). Este pensamiento ha ido desmontándose actualmente, debido sobre todo al desarrollo y la aplicación de técnicas más precisas de tinción, recuento y de estereología. Hoy se sabe que mientras existe un limitado descenso del número de neuronas en áreas restringidas del giro hipocampal, no hay evidencias de una pérdida generalizada de neuronas durante el envejecimiento normal y sano (12,13). También se refuerza dicha concepción debido al estudio clínico de sujetos ancianos y centenarios cuyos resultados resaltan la elevada frecuencia de estas lesiones en la

mayoría de los cerebros sin que se pudiera demostrar una correlación con la demencia clínica en vida de dichos sujetos.

B) Pérdida de sustancia blanca. Hay una pérdida de volumen en la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales conocida como leucoaraiosis (L-A) que aparece en la imagen de un cerebro debido a la **degeneración de la mielina**. La mielina, como es conocido, proporciona el aislamiento de las fibras nerviosas y permite que la información que circula a través de las dendritas neuronales no se vea interferida o alterada por otras corrientes de otras fibras nerviosas cercanas. En consecuencia, parece que el deterioro de la mielina lleva a la alteración del proceso en el que la nitidez de la comunicación neuronal y la función de circuitos corticales específicos presentan un deterioro con la edad.

C) Acúmulo de lipofuscina y aparición de neuromelanina. La acumulación de vesículas autofágicas con pigmentos de lipofuscina o neuromelanina en una característica morfológica ampliamente descrita en el cerebro de organismos superiores envejecidos. Estos orgánulos son similares a los que contienen los pigmentos ceroides asociados con trastornos neurológicos, en particular en las enfermedades causadas por la disfunción lisosomal. Estos pigmentos se originan por la degradación de proteínas y lípidos de forma incompleta. Este proceso proviene de la descomposición de las mitocondrias o productos de oxidación de las catecolaminas que termina en la acumulación de dichos derivados. Se forman con ellos vesículas autofágicas pigmentadas que pueden eventualmente ocupar una porción importante del volumen de cuerpo de la célula neuronal debido a la resistencia de los pigmentos a la degradación lisosomal o por la fusión inadecuada de las vesículas con lisosomas que los digieran. Aunque la formación de vesículas autofágicas a través de macroautofagia protege la neurona del estrés celular, la acumulación de vesículas autofágicas pigmentadas, finalmente, puede interferir con las vías degradativas normales y endocítica, tareas secretoras y respuesta apropiada a los factores de crecimiento (13).

D) Degeneración granulovacuolar y neurofibrilar con formación de placas neuríticas, gránulos agiروفílicos. Existen además, una serie de características patológicas comunes, observadas en el cerebro añoso que incluyen: placa amilácea, gránulos agiروفílicos. Estas características son observadas también, pero aumentadas, en el Alzheimer (EA). Hasta el presente poco se conocía acerca del papel de estos hallazgos en el declive del rendimiento cognitivo. Además se conoce poco sobre si estos factores pueden promover o retrasar el comienzo y progresión de los desórdenes del envejecimiento tales como la enfermedad de Alzheimer (EA) (14).. Así mismo los patrones de distribución de dichas lesiones parece afectar de forma diferencial a los afectados provocando cierta variabilidad en la presentación la severidad y la sintomatología de la enfermedad (15). **Las placas** observadas en el cerebro son una mezcla heterogénea de proteínas, péptidos, lípidos y azúcares situadas en el espacio extracelular. Las placas se derivan del complejo beta-amiloide, que es un péptido de entre 40 y 42 aminoácidos, como el principal componente de dichas placas (16). El beta-amiloide se genera como resultado de desdoblamiento proteolítico de una proteína precursora de amiloide más grande. La encima b-secretasa, es responsable de la generación de la N-terminal y la g-secretasa genera el C-terminal de dicha proteína. Hay dos formas primarias de las placas en el cerebro, placas difusas y placas neuríticas. Las placas difusas se observan en la mayoría de los pacientes de edad avanzada, las placas neuríticas, preferentemente observadas principalmente en las áreas cortical y límbica del cerebro con Alzheimer. Las placas neuríticas son patológicamente distinguibles de las placas difusas por el hecho de que contienen un núcleo esférico discreto y que es evidencia de infiltración neurítica. Otro hecho destacable es que la forma en que los distintos oligómeros interactúan para formar distintas conformaciones (de una sola capa o doble capa) en la composición de las placas parece relacionar la evolución de la

enfermedad de Párkinson hacia la demencia tipo AD (17). **Los ovillos neurofibrilares** son inclusiones proteicas intracelulares compuestos principalmente de la proteína tau citosólica. La proteína Tau está implicada en el ensamblaje de microtúbulos del citoesqueleto de la neurona. La fosforilación de esta proteína altera dramáticamente su capacidad de polimerizar y con tau hiperfosforilada, se forman las interacciones necesarias con otras proteínas del citoesqueleto (18), acumulándose como componente principal de los ovillos neurofibrilares. Mientras que las placas y los ovillos neurofibrilares son un criterio patológico necesario para el diagnóstico de la EA, es importante señalar que también se encuentran dentro personas ancianas sanas (14). (14) **Los gránulos agiروفílicos** tienen también su origen en la proteína tau, el motivo por el que esta proteína en el envejecimiento puede degenerar en el tipo de estructura ovillo o en el tipo gránulo está por determinar. Quizá la generación de gránulos agiروفílicos es mas tolerable que la patología de formación de ovillos neurofibrilares que aparecen tanto en neuronas como en la glía. Se encuentran dentro de estructuras corticales en la que la mayor densidad está en el borde de la corteza trasentorrinal y entorrinal. También en estructuras subcorticales donde la mayor densidad es en el núcleo tuberal lateral del hipotálamo. Aunque está relacionada con el envejecimiento no está clara su implicación en los procesos patológicos que lo acompañan ya que la proporción de su presencia varía igualmente en la población mayor sin alteración cognitiva como la que presenta demencia. En el caso de la enfermedad de los gránulos argiروفílicos (AGD), éstos se localizan tanto en la neurona como en los oligodendrocitos y está claro que inducen disturbios neurofisiológicos cuando está presente en altos niveles (19).

Este tipo de lesiones típicas en la vejez son cualitativamente semejantes a las de EA, sin embargo cuantitativamente y por su distribución no se puede establecer, sin riesgo a equivocarse una correlación clínico patológica entre ambas.

E) Distrofia en axones del sistema nervioso autónomo. Estudios neuropatológicos de los ganglios simpáticos de sujetos humanos y modelos roedores, demuestran que existe una distrofia neuroaxonal que afecta a los terminales axónicos y sinapsis intraganglionares y que es un inequívoco e importante hallazgo neuropatológico en el sistema nervioso simpático de hombres y animales (20).

F) Cambios en el patrón de distribución de los parámetros de la plasticidad sináptica. Se han estudiado los cambios en el patrón de distribución de los tres principales parámetros de la plasticidad sináptica para una zona dada, para determinar la evolución de este hecho a lo largo del proceso de envejecimiento: N° de uniones sinápticas, longitud media de dichas uniones y superficie de contactos sinápticos. Las uniones sinápticas en el glomérulo cerebeloso y en la lámina supragranular del giro dentado hipocámpal de ratas juveniles (3 m), adultas (12 meses) y viejas (28-30 meses). La densidad numérica (Nv) y de superficie (Sv) así como el promedio del tamaño (L) de las sinapsis teñidas de E-PTA han sido calculados por métodos morfométricos. Los resultados obtenidos por el autor mostraron una tendencia similar en ambas áreas del SNC. Nv significativamente aumentados en los animales jóvenes y adultos y significativamente disminuido en el grupo de animales mas viejos. En la Sv no pareció haber modificaciones entre los jóvenes y mas adultos mientras que estuvo significativamente reducido en el grupo de mas ancianos. Estos resultados inferían que el número (Nv) y tamaño (L) de las sinapsis mantenían una relación inversa y de forma muy estrecha con la evolución de la esperanza de vida, con el objetivo de mantener una constancia entre la superficie total de contacto en toda la red dendrítica (21).

Numerosos estudios estructurales han señalado los cambios relacionados con la edad en los ganglios basales. Los ganglios basales, como parte de los bucles cortico-corticales en el circuito sensorial-motor, están involucrados en la planificación, la iniciación y el control del movimiento voluntario (22). En las alteraciones parkinsonianas

relacionadas con la edad se observa un descenso en el número de células dopaminérgicas de la sustancia nigra pero solo una degeneración moderada la vía nigro-estriatal (15-45%). Pasado este límite, las vías dopaminérgicas alteradas durante el envejecimiento reducen la liberación de dopamina en sus dianas: los ganglios basales y el cuerpo estriado. Esta reducción se manifiesta por la incapacidad para iniciar y cesar el movimiento, la incapacidad para suprimir el movimiento involuntario, una anomalía en la velocidad y la cantidad de movimiento, y el tono muscular anormal típico, identificados con la enfermedad de Parkinson (23). Se ha relacionado la reducción de la sensibilidad de los receptores muscarínicos con el declive neurológico y el desarrollo de déficit motores en modelo inducido de ratas ancianas (24).

1.1.2 Cambios metabólicos y bioquímicos.

Existen multitud de estudios sobre las vías metabólicas que se encuentran alteradas causando los signos y cambios morfológicos y fisiológicos relacionados con el envejecimiento y la degeneración patológica del sistema nervioso.

1.1.2.1 Estrés oxidativo (EO).

En condiciones fisiológicas las células de todos los organismos aerobios generan especies reactivas de metabolitos con capacidad oxidante, potencialmente agresivas. Si se produce un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes mantenido en el tiempo aparecen manifestaciones degenerativas. El efecto de este desequilibrio oxidativo se refleja en las siguientes realidades:

La sobre expresión de los sistemas enzimáticos antioxidantes o el aporte exógeno de sustancias con esa capacidad retrasa los efectos del estrés oxidativo y amplía la expectativa de vida.

El ritmo de generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluyen aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, se relaciona con pérdida de longevidad en distintas especies.

La restricción calórica en la ingesta aminora el estrés oxidativo y se relaciona con una mayor longevidad en la mayoría de las especies.

El EO se define como el balance entre la producción de oxidantes y la actividad de antioxidantes, es una función compleja de la interacción entre multitud de vías bioquímicas que implican a agentes endógenos y exógenos, y en ambos casos promotores o inhibidores.

Está demostrado pues, que de todos los factores que afectan a la rapidez con que se establecen los signos neurológicos del envejecimiento, uno de los más importantes es el descenso en la capacidad de mitigar el efecto del estrés oxidativo (EO) a largo plazo. El EO puede ser el primer factor etiológico en enfermedades relacionadas con el envejecimiento como Alzheimer (25) y Parkinson (26). Además, sumado a este aumento de elementos prooxidantes, aparece un incremento en la vulnerabilidad al estrés oxidativo en función de la edad (27). El EO parece ser uno de los mecanismos bioquímicos de fondo sobre el que se generan la mayoría de los otros procesos observados en el proceso degenerativo del envejecimiento.

Entre las vías precisas de este fenómeno se apuntan varios eventos. Existen evidencias de una reducción de antioxidantes endógenos en el envejecimiento como por ejemplo glutatión (28), y glutamina sintetasa (29), unido a un incremento de la peroxidación lipídica (30,31). Otros procesos intrínsecos que se afectan por el EO son: daño en el ADN nuclear y mitocondrial durante el envejecimiento fisiológico (4,32,33) y

que afectan a la transcripción genética y producen alteraciones enzimáticas que a su vez afectan al metabolismo (34), y acumulación de catabolitos.

La homeostasis del Ca también parece una de las vías implicada en el proceso. Ca²⁺ induce un incremento en el metabolismo oxidativo neuronal y en la progresión de la enfermedad de Alzheimer (35).

Con estos datos, es muy plausible comprender que contrarrestar los efectos de dicha reducción antioxidante debida a la edad mediante una dieta rica en fruta y verdura con alta actividad antioxidante (36–38) sería una estrategia preventiva de primera consideración (39,40).

Tal consumo ya ha dado evidencia de reducir la incidencia de patologías asociadas al envejecimiento como cáncer (41–43) y lesiones isquémicas en corazón (44,45).

En el cerebro, el consumo de glucósidos flavonoides disminuyen el deterioro de memoria (46), y dificultades para concentrarse que aparecen con el envejecimiento (47).

Existen numerosos estudios con animales que relacionan la mejora o el retraso de deterioro cognitivo del envejecimiento con el consumo de antioxidantes o alimentos ricos en estos nutrientes y se apuntan algunas vías de cómo este efecto antioxidante surte su efecto a través de Ca²⁺ (48).

1.1.2.2 Factores neurotróficos, neurotransmisores y neuroreceptores.

Con la edad, aparece una pérdida de receptores o ineficiencia en el ligamiento a receptores y de circuitos mediados por determinados neurotransmisores, principalmente los que sintetizan acetilcolina, dopamina y noradrenalina.

Es bien conocido que existe un declive funcional de numerosas neuronas del sistema nervioso central que ocurre en el envejecimiento en ausencia de enfermedades neurodegenerativas. Estas alteraciones pueden estar manifestadas como una pérdida de la sensibilidad de los receptores de neurotransmisores, tales como : muscarínico (24,49–55) , adrenérgico (56–58), dopaminérgico (59–65), y opioide (66–68).

En concreto, relacionado con la alteración de patrones de memoria y la conducta podemos describir dos sistemas: el colinérgico (69) y serotoninérgico (70).

Durante el envejecimiento normal no se ve claramente una imagen de atrofia celular ni de la inervación colinérgica del hipocampo y la corteza. La respuesta del sistema colinérgico, sin embargo, se altera durante el envejecimiento normal en distintos niveles: la síntesis y liberación de acetilcolina (AC) y la respuesta electrofisiológica de las neuronas postsinápticas a AC. Así aunque algunas diferencias estructurales en los cambios relacionados con la edad pueden o no estar presentes, el funcionamiento del sistema colinérgico se deteriora durante el envejecimiento (71,72).

Existe una correlación significativa entre el rendimiento en las tareas en el laberinto acuático MWM y el número de células diana de acetilcolina, y aunque en menor grado también en el tamaño de esas células en grupos celulares de diversas vías y núcleos colinérgicos del prosencéfalo, con un importante papel en el desarrollo de la memoria espacial. Esos cambios aumentan su correlatividad con la edad. Los cambios morfológicos son menos severos y tienden a desarrollarse mas tarde que las alteraciones en el comportamiento (73).

Esta alteración de la captación que hemos visto en otros sistemas se produce también en la de serotonina, afectando a la situación emocional y de conducta de las personas mayores (74).

Otras rutas concernientes a la pérdida de función de receptores y que pueden influir en aspectos psicológicos asociados al envejecimiento, como la interacción social, la ansiedad y la agresividad como es el caso de los receptores hormonales estrógenos (75) o de receptores muscarínicos.(24).

Jannon Fuch estudió la relación cuantitativa entre la actividad de 5' nucleotidasa y el aumento de tamaño de células gliales y la transmisión sináptica de ratas durante el envejecimiento. La 5' nucleotidasa es una encima presente en las membranas neuronales y gliales, y que cataliza la formación de adenosina. La actividad de la encima aumenta en el periodo de vida de la rata, desde los 3 a los 18 meses no encontrándose un aumento significativo a partir de esa edad, 18 a 24 meses exceptuando la zona del cerebelo donde sí encontramos una redistribución significativa consistente en la disminución de esta actividad en la capa molecular y un aumento en la de Purkinje. Este incremento parece estar relacionado con el aumento de mielina (la mielina parece ser importante fuente de 5-nucleotidasa) y con el aumento de la masa de glía. Por tanto es bastante específico como indicador de "madurez" del sistema nervioso, y en el caso del cerebelo del envejecimiento de este. (76)

La disminución de factores neurotróficos así como el aumento de mediadores inflamatorios se relacionan con el estrés oxidativo y afecta directamente al declive en la memoria de ratas viejas. Un tratamiento con eritropoyetina sintética ha demostrado ser eficaz en el retraso del declive en la memoria de ratas mayores. Su acción parece estar vinculada a la reducción del estrés oxidativo, a la disminución de los mediadores de la inflamación y a la restauración de los niveles de expresión de ARNm y el factor neurotrófico BDNF, crítico para la plasticidad sináptica.(77).

1.1.2.3 Mecanismos genéticos y epigenéticos

Los mecanismos de origen genético de las alteraciones nerviosas, como son la expresión o sobreexpresión de algunos genes, están detrás de algunos de los cambios estructurales y fisiológicos que se presentan en patologías seniles. Durante el transcurso de la vida se van acumulando mutaciones y defectos funcionales genómicos que se terminan por reflejar en la función general. Los mecanismos compensatorios de todos los niveles desde la reparación de genes, hasta la apoptosis o la actividad del sistema inmune, contienen el efecto de estos errores del ADN.

La investigación sobre el componente genético del envejecimiento demuestra la importancia primordial que tiene sobre el desarrollo de enfermedades o su protección ante estas. Se encuentran variantes de genes, directa o indirectamente, causantes de enfermedades y otros involucrados en la protección ante ellas, o asociados a una tasa de longevidad: Sirtuina 1 (SIRT1) (78) Apolipoproteína (APOE) encima convertidora de angiotensina (ECA), HLDA-DR y diversos genotipos de ADN mitocondrial.

Entre los genes implicados en enfermedades neurológicas en la senectud, encontramos aquellos cuya mutación es causa directa de enfermedad: Gen de la proteína precursora de amiloide APP (79,80), gen tau (81), presenilina 1 (82), presenilina 2 (83,84), APOE (85) (86)

En otras ocasiones es la expresión insuficiente de un gen la que provoca las manifestaciones indeseables como genes de los actores tróficos GDNF, Gli-3 Hox1,4 y 3,5

La mutación de algunos genes introduce un factor de riesgo importante en el proceso de enfermedades neurodegenerativas de desarrollo precoz, si afecta a una mayor extensión y porción mas sensible del genoma; y posiblemente de alteraciones neurodegenerativas de la vejez cuando presenta una penetrancia de las mutaciones mas baja: mutaciones del gen de la enzima superóxidodismutasa SOD, proteínas de la inflamación (C4, lys C, Icam2, Cox1), proteínas de estrés (GFAP, apopolino D, Catesinas, c-Fos) encimas del metabolismo energético CPK, fructosa 1,6 fosfato, aldolasa, fructosa 1,6 dismutasa, encimas relacionadas con la división y diferenciación celular p53 (87). En el caso del gen APOE, el alelo 4 se comporta como factor de riesgo en el desarrollo de la EA, mientras que el alelo 2 parece comportarse como protector al encontrarse incrementado en grupos de personas que superan los 90 años de edad.

Dentro de los mecanismos mas destacados de alteración del ADN durante el envejecimiento se encuentran la acetilación de histonas y la metilación de histonas y del ADN que comprometen la expresión genética. Los defectos del ADN son reparados por sistemas diversos mas o menos eficientes, que actúan en distintos niveles como reparación de bases (BER), de nucleótidos (NER). Las rupturas de doble hebra no reparadas son uno de los daños de ADN mas tóxicos, que dan como resultado interrupción del ciclo celular muerte celular y senescencia y si se trasladan tras la mitosis pueden producir translocaciones cromosómicas que terminan provocando cáncer y otros procesos de envejecimiento (88). El equilibrio entre los mecanismos que deterioran el ADN o su transcripción y los mecanismos reparadores se va perdiendo a lo largo del envejecimiento produciendo el efecto de inestabilidad genómica. El estrés oxidativo está detrás tanto de la producción de errores en la cadena de ADN relacionados con enfermedades degenerativas, cáncer y con el envejecimiento como por ejemplo la generación de 8-oxoguanina (89), altamente mutagénicas, como defectos en la sirtuina 1 (SIRT1) o sirtuina 6 (SIRT6) proteína implicadas en el proceso de desacetilación de histonas dependiente de NAD+(90–92), la expansión del gen de la huntingtina relacionada con la generación de la enfermedad de Huntington etc.

Un mecanismo genético es el del papel de la telomerasa; la telomerasa es una encima transcriptasa inversa que repara en sus extremos las secuencias de ADN llamadas telómeros compuestos por la repetición de la secuencia TTAGGG que se puede extender por encima de los 10 kb, tras repetidas mitosis. Se produce un descenso en su función que se manifiesta en el tejido nervioso tras la madurez debido a que no es necesaria, porque las neuronas dejan de dividirse. Esta circunstancia hace que la función reparadora de la misma sobre el acortamiento de telómeros deje de producirse y por tanto aparezca la inestabilidad genómica antes mencionada con el efecto degenerativo de este ADN y las consecuencias en envejecimiento y enfermedades afines (93–97).

La técnica de análisis de microarrays detecta la expresión diferencial de genes permitiendo relacionar la sobreexpresión o infraexpresión de estos con enfermedades degenerativas. Va a ser una herramienta fundamental en el conocimiento de las causas y efectos genéticos de las enfermedades neurológicas, su monitorización en el tiempo y es una puerta abierta a la identificación de dianas terapéuticas.

1.1.2.4 Otros.

Homeostasis del colesterol y lípidos El cerebro contiene el 23 % del colesterol de todo el organismo (98) . El colesterol es componente importante de las membranas celulares y precursor de las hormonas esteroideas, tiene las funciones de regulación de la permeabilidad a los iones, la forma celular, la interacción célula-célula, y la señalización transmembrana. Cuando su concentración y tipo, se ve afectado por enfermedades hereditarias que afectan genes relacionados con el colesterol

observamos que la función cerebral se ve alterada ya durante la vida temprana (86). Los defectos en el metabolismo del colesterol del cerebro pueden contribuir a síndromes neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) (99,100), enfermedad de Huntington (HD), y la enfermedad de Parkinson (PD), y cuando envejecemos, incluso a los déficits cognitivos típicos de la vejez. En estos casos, el aumento de colesterol sistémico parece estar implicado en alteraciones cerebrovasculares tipo ateromatosas, con hipoperfusión e inflamación del tejido nervioso. Las células del cerebro requieren mecanismos específicos de regulación en la producción y eliminación de lipoproteínas y colesterol, la disminución del metabolismo del colesterol en el tejido nervioso tras la barrera hematoencefálica está involucrada en la alteración de las funciones neurológicas de enfermedades como AD HD (101,102) o PD así como en el envejecimiento. En estas condiciones es secuestrado en las placas, o se produce una inhibición de captación de derivados de colesterol ApoE por astrocitos y / o por los cambios directos en el contenido de lípidos de la membrana plasmática quedando su disponibilidad restringida en diversas funciones (103–107). La ruptura de la homeostasis del colesterol afecta a la transmisión sináptica posiblemente por mecanismos como inhibición de la fusión de vesículas presinápticas con la membrana citoplasmática para la liberación de neurotransmisores, en la desestabilización e inmovilización de la superficie del receptor, (108)

Metabolismo energético, la concentración de adenosina en muchas áreas del cerebro, como el hipocampo y el córtex límbico está significativamente incrementada en ratas viejas, en parte por una más eficiente formación de adenosina desde el ATP, y por el descenso de la adenosina extracelular. Además algunos autores han demostrado alteraciones relacionadas con el envejecimiento en el balance de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} en favor del segundo relacionando esta circunstancia con la pérdida de facultades cognitivas (109).

La homeostasis del calcio afecta a multitud de procesos alterados en la vejez. desde la coagulación, la contracción muscular la transmisión, la respuesta inmune (110), y en concreto en el sistema nervioso aspectos relacionados con el metabolismo energético producción de neurotransmisores funcionamiento de canales iónicos y en consecuencia neurotransmisión plasticidad sináptica y neurodegeneración (111)

1.1.3 Procesos inflamatorios.

Activación microglial e inflamación. La inflamación y su regulación por citoquinas ha sido asociada a diversos aspectos del envejecimiento del sistema nervioso. Se ha documentado ampliamente el impacto de los mecanismos de inflamación en enfermedades degenerativas del sistema nervioso (112,113). La microglía puede tener un papel patogénico en enfermedades neurodegenerativas. El descubrimiento de mutaciones genéticas en CD33 y TREM2 que afectan a estas células, están asociadas con el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (114,115) ha aumentado el interés en la definición de la fisiología y patología microglial en el contexto de la enfermedad. La morfología de la microglía se modifica ante patologías del sistema nervioso central (SNC) con el fin de poder migrar y fagocitar (116). El proceso por el cual el cambio de la firma molecular, la forma y fisiología celular de la microglía, se define como la activación de la microglía, puede observarse en el cerebro con patologías relacionadas con el envejecimiento. Muchas de estas modificaciones en el patrón fisiológico de activación de la microglía se asocia a una distrofia en la misma que promueve la neuroinflamación (117–119). Este tipo de microglía distrófica se ha descrito en personas ancianas sin demencia pero en mayor proporción en las que sí presentan demencia (120).

Ante los procesos inflamatorios crónicos, altos niveles de glucocorticoides mantenidos de forma sostenida comprometen la capacidad de superar el declive de neuronal y funcional inducido por la isquemia. Los cambios fisiológicos que involucran al eje HPA pueden explicar en parte la amplia variabilidad que encontramos en la recuperación del accidente cerebrovascular en individuos mayores (121,122). Sin embargo, algunos autores afirman que no se puede confirmar que la inflamación por sí misma, tenga efectivamente un papel específico en el envejecimiento (123).

1.1.4 Muerte celular. Apoptosis. Neuroregeneración

Las células pueden morir por dos mecanismos: necrosis y apoptosis. La necrosis es un proceso más violento y desordenado, debido a la pérdida de la capacidad de la célula para transformar la energía externa. La apoptosis es un fenómeno muy ordenado y regulado por el que la célula se suicida a través de un estímulo que puede ser una señal fisiológica o una agresión muy leve. Este proceso es esencial para el desarrollo y remodelación normales.

En la primera se produce una rotura de los elementos citoplasmáticos y la membrana incompleta hace que todo el material citoplasmático y nuclear queda disgregado por el espacio extracelular activando los precursores de la inflamación provocando una reacción inflamatoria. En la apoptosis por el contrario, la activación secuencial de las enzimas caspasas actúa sobre sus dianas de forma precisa resultando en cortes regulares de ADN. No se destruye en el proceso la membrana citoplasmática y no hay respuesta inflamatoria. Este mecanismo es necesario para la regulación del número de neuronas durante el desarrollo, como parte del proceso de evolución y adaptación neuronal. No obstante puede ser respuesta a injurias tisulares de baja intensidad. La liberación del citocromo C de las mitocondrias es uno de los desencadenantes del proceso. Por tanto las anomalías que lo provocan como neurotóxicos ambientales (124), desajustes en la expresión de ADN o el EO, podrían disparar el proceso de muerte celular. No obstante este proceso podría no ser una causa principal sino simplemente reflejar un daño neuronal que aumenta la observación de apoptosis, siendo las lesiones inflamatorias y la necrosis celular la causa primaria.

Como ya se ha referido el equilibrio o desequilibrio entre muerte celular por apoptosis (125) o por fenómenos patológicos y la reposición celular marca, en gran medida, los efectos tisulares del envejecimiento. En el caso del tejido nervioso este recambio no se puede producir sin perder la identidad funcional del sistema nervioso. Se sabe desde hace 100 años que hay proliferación celular en el cerebro adulto, mas se pensaba que esta proliferación solo daba lugar a células de la glía, no a neuronas.

No obstante el cerebro de los mamíferos adultos produce continuamente nuevas neuronas en dos regiones reconocidas de este, la zona subventricular (SVZ), envoltura entre los ventrículos y el giro dentado (DG) del hipocampo. Las regiones clásicamente afectadas por esta característica son el giro dentado del hipocampo y el bulbo olfatorio (126).

En roedores la neurogénesis hipocampal se ve aumentada por factores externos incluyendo el enriquecimiento ambiental o social (127) (128), el ejercicio (129) (130) , y mediado por hormonas (corticoides, h. sexuales) , es una capacidad que acompaña al individuo durante la mayor parte de su vida. Podría ser un signo de preservación de las funciones cognitivas y anímicas de la persona mayor.

Si la disminución de la neurogénesis hipocampal se produce con la edad, puede ser la base de las alteraciones de procesos cognitivos y del estado de ánimo asociados con el envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer (131) (132).

En definitiva fenómeno de neurogénesis, podría ser un signo de preservación de las funciones neurológicas. En determinadas circunstancias, aplicando estímulos externos como el enriquecimiento ambiental o social y mediado por hormonas (corticoides, hormonas sexuales), nos ofrece la capacidad de mantener esta función durante un largo periodo de vida. Las regiones clásicamente afectadas por esta característica son el giro dentado del hipocampo y el bulbo olfatorio (133) pero demuestra un mecanismo de preservación de las capacidades neurológicas en el envejecimiento.

1.1.5 Alteraciones fisiológicas en el envejecimiento de carácter sistémico general.

En todas las alteraciones que se observan, se produce un equilibrio entre la aparición de estas y la capacidad de compensación o reparación. Cuando estos mecanismos de equilibrio fracasan o se desnivelan y aparecen las alteraciones con implicaciones mas o menos patológicas.

Describir una cronología donde estos acontecimientos se producen de manera general entre la población es un proyecto sumamente arduo, pero no por ello menos perseguido (134).

Desde el punto de vista fisiológico, la base de los procesos que prescriben el resultado final de envejecimiento saludable o no saludable es la homeostasis. Los mecanismos que mantienen la homeostasis, es decir, los que aseguran la constancia del medio interno a pesar de la variabilidad del externo están desplegados a lo largo de todas las etapas y circunstancias de la vida. El envejecimiento representa, por lo tanto, una disminución en la capacidad de adaptación debida a una reducción de la flexibilidad de los mecanismos fisiológicos que regulan el equilibrio necesario para mantener constante el medio interno. El control de la homeostasis requiere que se mantenga intacta la función integrada de órganos y sistemas para una correcta actuación biológica del organismo.

Procesos asociados al envejecimiento de carácter sistémico general afectan al rendimiento neuronal. La interacción entre todos los sistemas orgánicos, lleva a la obligación de tratar las afecciones relacionadas con el envejecimiento del sistema nervioso en conjunto con todos los demás. El sistema nervioso como integrador de todas las funciones fisiológicas tiene una influencia fundamental en actividad correcta de todas ellas. Así mismo cualquier anomalía funcional de un órgano afecta al correcto funcionamiento de su metabolismo.

Todos los sistemas pues, son susceptibles de afectar al sistema nervioso cuando no funcionan correctamente: vascular, digestivo, hepático, renal y endocrino.

Entre ellos estudiamos las alteraciones cardiovasculares y hepáticas por su importancia y relación estrecha e inmediata con la neurodegeneración y enfermedades afines.

El esencial papel del sistema vascular en el mantenimiento de las funciones generales del organismo a través del aporte y retirada eficaz de nutrientes y metabolitos, implica que las transformaciones lesivas de éste, afecten a otros sistemas orgánicos, siendo el mas sensible el sistema nervioso. La isquemia, la anoxia, y la perfusión ineficiente, producen en el cerebro efectos dramáticos a corto y largo plazo. La

acumulación de proteínas en el parénquima cerebral, tales como la proteína β amiloide, o derivados del colesterol producidos por un reducido aclaramiento en el espacio extracelular de estos productos, es consecuencia directa de la reducción en el flujo sanguíneo por enfermedades que producen diversas vasculopatías, (infartos, alteraciones en capilares, arteriosclerosis de pequeños y grandes vasos, lipohialinosis, angiopatía amiloide cerebral (135), angiopatía congófila etc.) mas o menos extensas u otros trastornos que afectan a tal flujo sanguíneo. Algunas enfermedades afectan al flujo sanguíneo del cerebro pero desde fuera del sistema vascular en sí como son: accidente cerebrovascular, hipertensión arterial (136), episodios frecuentes de hipotensión, diabetes mellitus, enfermedad cardiaca, ateromatosis carotidea (136),

Las alteraciones vasculares son mucho mas frecuentes en los ancianos y sus repercusiones sobre el cerebro pueden ser muy graves, estando detrás de muchos cuadros demenciales (137). La correlación entre la sintomatología clínica y las imágenes de resonancia magnética que descubre estas anomalías no es todavía clara. Sin embargo se puede ver que las lesiones vasculares que provocan trastornos cognitivos graves se suelen localizar en el tálamo, el cuerpo caudado y las vías de asociación en la sustancia blanca que conectan estos núcleos de la base con la corteza frontal. (138). La enfermedad cerebrovascular, está detrás, de manera difusa o focalizada de la mayoría de las consecuencias neurodegenerativas que se producen en el envejecimiento patológico incluido la EA.

Toda medida higiénica dietética y de estilo de vida que influya en el mantenimiento de la integridad vascular durante las distintas fases vitales reducirá el riesgo de padecer en la vejez enfermedades neurodegenerativas.

El hígado disminuye de tamaño y de peso a partir de los 50 años. El tejido hepático ve alterado su flujo (35% entre los 40 y 65 años) por disminución del flujo de la arteria hepática. Esta disminución junto con el menor peso explica la peor capacidad metabólica (eliminación hepática de algunos fármacos, por ejemplo). En el anciano encontramos, con mayor frecuencia, la existencia de litiasis biliar (30% de las mujeres y 20% de los hombres a los 70 años de edad y del 40% en las mujeres de 80 años). Este fenómeno se puede explicar por la mayor precipitación en la vesícula de determinados componentes del jugo biliar, como son el colesterol y el bilirrubinato cálcico. Las concentraciones basales y tras estímulo de colcistoquinina son más elevadas en la vejez. La mayoría de los varones no sigue acumulando cálculos después de los 65 años.

La vejez no altera, sin embargo, los resultados de las pruebas de función hepática ni tampoco la síntesis de factores de la coagulación. La síntesis de proteínas sí que desciende con la edad, si bien este descenso varía de forma amplia entre los distintos individuos. La degradación de sustancias (incluyendo la de algunas enzimas) también disminuye con la edad. Sin embargo no existen cambios en las concentraciones sanguíneas de las enzimas hepáticas. Así mismo, se producen cambios metabólicos en los procesos funcionales como reducción de la oxidación, aunque se mantiene la vía de la acetilación. La acumulación de lípidos en el hepatocito es una degeneración que altera la funcionalidad del hígado y es una secuela ineludiblemente ligada al envejecimiento

El metabolismo hepático en su papel de detoxificador de sustancias procedentes de metabolismo general y de sustancias externas, juega un papel primordial en el mantenimiento de las funciones neurológicas y su fracaso afecta irremediablemente a la función y estructura del sistema nervioso. Una colección de alteraciones en este órgano conducen a problemas neurofisiológicos que afectan la memoria, el aprendizaje, la atención y la orientación, conocido en conjunto como encefalopatía hepática. Existen numerosos estudios de alteraciones que terminan deteriorando las funciones del

cerebro en distintos aspectos cognitivos o funcionales, tanto clínicos (139) (140,141), como en modelos animales. La hipertensión portal se ha relacionado con déficits de memoria a corto plazo y de referencia espacial y la actividad metabólica de ciertas áreas del cerebro de ratas adultas (142).

En estudios con animales, se ha relacionado mediante un modelo tóxico de insuficiencia hepática por tratamiento con tioacetamida, la disfunción hepática con déficit de flexibilidad cognitiva. Algunos autores argumentan que el trastorno de memoria no es un síntoma importante de la encefalopatía hepática (EH) en los seres humanos, mientras que otros autores afirman que los pacientes con cirrosis presentan un peor rendimiento en varias pruebas de memoria. Un estudio ha conectado deterioro de la memoria en un modelo EH con administración de tioacetamida con el metabolismo oxidativo (143). Otros estudios han informado que es la acción directa del metabolismo oxidativo sobre el cerebro, la que se asocia a alteraciones de comportamiento en modelo de shunt portocava, o de la atrofia alcohólica del hígado en ratas.

El sistema vegetativo y endocrino como gran integrador de las funciones de todos los sistemas es un gran consignatario de alteraciones neurológicas cuando se ve alterado.

Muchos son los estudios que relacionan disfunciones hormonales con déficits neurológicos donde podríamos destacar:

Expresión disminuida de receptores de oxitocina en el bulbo olfatorio y en el núcleo hipotalámico ventromedial, influenciados por el descenso de los niveles de testosterona en ratas de 20 meses (144). Estos receptores juegan un importante papel en la modificación de conducta asociada a la edad.

Los niveles reducidos de estrógeno alteran la densidad de botones sinápticos y el aprendizaje espacial (145,146) está detrás de la disfunción cognitiva de mujeres ancianas (147). Concomitantemente se produce una elevación de los niveles de la hormona luteinizante. La inhibición de la expresión y bloqueo de ligamiento al receptor mejoran la cognición y la densidad de las espinas sinápticas (148).

1.1.6 Alteraciones funcionales y de comportamiento.

En el anciano se producen una serie de alteraciones que se traducen en trastornos motores, cognitivos, sensoriales y sensitivos. Estos declives funcionales interactúan unos con otros conduciendo a un descenso general de las capacidades de desarrollar tareas que impliquen atención, aprendizaje (149) (150) y el desenvolvimiento motor y pueden actuar sobre los individuos de forma separada o conjuntamente de tal manera que influyen el desempeño de sus ocupaciones cotidianas en mayor o menor grado.

El aspecto emocional también afecta en este desenvolvimiento malogrado de manera sinérgica. Está regido por muchos de los factores fisiológicos que hemos ido describiendo, dando como resultado estados de aprensión exacerbada, ansiedad y depresión.

Existen una serie de factores que deberían ser considerados antes de afirmar el declive de las capacidades cognitivas de los mayores:

- Las personas mayores aprenden peor cuando el material elegido carece de sentido para ellos. Cuando se presenta una conexión significativa en dicho material para el individuo los resultados son equiparables al de los jóvenes.
- La existencia de técnicas de aprendizaje pueden compensar ciertos déficits de aprendizaje relacionados con la codificación de la información.

- La velocidad de presentación del material influye de manera clara en la capacidad de los ancianos para procesar la información, cuando esta velocidad se reduce, los rendimientos de personas mayores y jóvenes tienden a igualarse.
- Lo mismo pasa con el número de repeticiones que necesita una tarea para ser aprendida. Los mayores necesitan mas repeticiones para alcanzar el mismo nivel.
- El factor emocional, la inseguridad que aporta en la reproducción de lo aprendido afecta al rendimiento sin que ello signifique una merma en la capacidad de aprendizaje.
- Presentar las tareas de aprendizaje en un entorno conocido y poco estresante así como la ordenación lógica de dichas tareas aumenta el rendimiento.
- El aprendizaje por secciones es mas favorable a los jóvenes pero la visión global y la síntesis se ve mas facilitada en los mayores.
- Las dotes iniciales para un tipo de aprendizaje son mucho mas predominantes que la edad a la hora de abordar con éxito cierto tipo de aprendizaje.
- El entrenamiento en todo tipo de tareas intelectuales durante la adultez, mantiene las capacidades de las personas mayores preservadas a nivel casi de los jóvenes.
- Los factores motivacionales son de mayor influencia en el éxito de la realización de la tarea que en individuos mas jóvenes (151).
- El estado físico y psíquico saludable favorece la capacidad de aprendizaje.

En definitiva se puede ver que incluso los parámetros cognitivos que la mayoría de las personas mayores tienden a presentar y que los relegan como desadaptaciones a su desempeño, son modificaciones en la forma de relacionarse con el medio y las tareas cotidianas o novedosas, mas que defectos que obstaculicen de manera absoluta el desarrollo de tales capacidades funcionales.

También en animales de laboratorio, este escenario de deterioro funcional se ve acentuado por la tendencia a desarrollar un estatus de ansiedad y depresión en el impedimento para realizar tareas que combinen proceso cognitivos, aprendizaje y memoria con actividad motora, en un ambiente poco familiar para el individuo.

Las principales funciones que vamos a considerar afectadas por el envejecimiento son:

1.1.6.1 Memoria.

Uno de las alteraciones mas notorias del envejecimiento cognitivo es la pérdida de memoria. Sin embargo, dentro de cierta extensión, todos asumimos como normal ciertos episodios o lagunas de memoria que vamos padeciendo a lo largo de los años. Para que se produzcan defectos de memoria la degeneración progresiva del sistema nervioso va penetrando a distintas regiones funcionales del cerebro, antes de verse percibida.

Percepción, memoria sensitiva a corto plazo, memoria a medio plazo y memoria a largo plazo son aspectos de la memoria que se van deteriorando en el transcurso del envejecimiento. Estas partes de la memoria se ven compuestas por regiones distintas y afectadas en sus vías de relación y su integración, inhibición y excitación, por lo tanto el estudio de los efectos del envejecimiento sobre los distintos aspectos o tipos de memoria obliga a ensayar test morfofuncionales muy complejos. Se puede observar que la presentación de los defectos de memoria en las enfermedades relacionadas con el envejecimiento, es secuencial y comienza por determinados aspectos y prosigue afectando a los siguientes. Este desarrollo secuencial indica la compleja relación entre las lesiones y alteraciones fisiológicas del sistema nervioso con la memoria.

La memoria sensorial y de fijación disminuyen, pero se mantienen la inmediata y de evocación. Se reduce la capacidad de integración visuoespacial y aumenta el tiempo de reacción. La inteligencia cristalizada no se modifica, mientras que sí lo hace la inteligencia fluida.

Evidencias recolectadas en años anteriores (109) sugieren que áreas en el sistema nervioso central que procesan información olfatoria se encuentran afectadas en estadios tempranos de las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad (Alzheimer, Parkinson y la enfermedad de Huntington) y lo hace incluso antes del desarrollo de los síntomas clásicos de estas enfermedades, tal como el declive cognitivo o la disrupción motora. Consecuentemente la disfunción olfatoria podría ser un indicador temprano de estos desórdenes relacionados con el envejecimiento.

Los estudios realizados hasta ahora han demostrado que los humanos, así como los primates no humanos exhiben un declive en el razonamiento fluido, en la rapidez mental, en la memoria y la habilidad espacial (152–156). Estudios adicionales en envejecimiento en cánidos y roedores han corroborado también la presencia de estos problemas relacionados con la edad tal como lo hacen en humanos y primates no humanos. (157–159,12,160).

1.1.6.2 Alteraciones motoras

En cuanto a la actividad motora aparecen deficiencias en el rendimiento motor. Los movimientos de las personas mayores son considerablemente más lentos y toscos que los de personas más jóvenes y su capacidad para repetir o mantener un movimiento o postura se suelen ver mermados.

Las manifestaciones motoras de las personas mayores pueden verse afectadas por un rendimiento muscular disminuido o por déficits neuromotores, y/o propioceptivos.

Aparece un ligero debilitamiento muscular que se traduce en una postura encorvada y una ligera inestabilidad, pasos cortos y en ocasiones un temblor que afecta a las extremidades superiores y cabeza. Estos signos involucran tanto al sistema neuromotor, neurosensorio como al propio músculo.

A partir de los 30 años y, debido a una disminución de la actividad física, existe una pérdida progresiva y lenta de la masa muscular esquelética (sarcopenia) que se reemplaza por tejido conectivo fibroso y tejido adiposo. Existe una disminución de fuerza, enlentecimiento de los reflejos musculares y pérdida de la flexibilidad.

Desde el punto de vista histológico a nivel muscular encontramos un aumento de depósito de lipofuscina, una reducción del número de miofibrillas y una marcada disminución en el sistema de actividad enzimática glucolítica oxidativa.

Estudios en animales avalan esta aparición del decaimiento en cuanto a la capacidad motora. Aparecen descubrimientos en estudios experimentales mostrando una mayor reducción en la actividad motora y disminución del rendimiento de tareas motoras que requieren entrenamiento en ratas viejas (161) (162).

Las personas muy ancianas a menudo manifiestan cortos movimientos correctivos durante la implementación motora. Esto sugiere que tienen cierta incapacidad para integrar las unidades motoras individuales para realizar el movimiento de forma rápida y coordinada. El control postural estático en una plataforma móvil es también muy deficitario en personas por encima de los 60 años. Las diferencias relacionadas con el

envejecimiento fueron más marcadas cuando los participantes realizaron simultáneamente tanto el control postural y tareas cognitivas en comparación con cuando se llevan a cabo sólo las pruebas posturales. Esto indicaría que las personas mayores requieren mayor implicación cognitiva en tareas motoras que los más jóvenes.

Entre los cambios estructurales del sistema nervioso que hemos comentado, recordamos la disminución en el volumen de sustancia blanca. Esto explica que la ejecución motora en cuanto a rapidez y coordinación sean las funciones que más precozmente se deterioran.

La liberación de acetilcolina y el número de sus receptores disminuye, por lo que la capacidad para mantener la transmisión del impulso nervioso desde el axón a la fibra muscular está alterada. Se produce atrofia de las fibras musculares de tipo I o de contracción rápida.

Es por ello que el complejo paso al envejecimiento y su declive cognitivo puede afectarse de factores colaterales al propio sistema nervioso, como el déficit sensorial o la falta de fuerza muscular, dando el mismo resultado.

No obstante, la incoordinación, la falta de fuerza, la incontinencia, signos de temblor serán los signos más relevantes del deterioro neuromuscular relativo al envejecimiento que podamos observar, por tanto su frecuencia e intensidad serán un parámetro de reconocimiento de la degeneración o preservación/regeneración de capacidades neuromotoras.

1.1.6.3 Déficit sensitivo.

Las deficiencias sensoriales que aquejamos a lo largo de la edad son simultáneas a los déficits nerviosos estudiados.

Las carencias en la vista, audición, gusto y olfato causan un problema de percepción del entorno que muchas veces puede confundirse con decline cognitivo o de memoria.

Dentro de los cambios que se producen en la vista se destaca, por su importancia, el deterioro de la visión nocturna y en la discriminación de colores que lleva a una visión borrosa. Se suele observar una opacificación del cristalino que, en último lugar, provocará catarata. Aún en ausencia de esa alteración, la cantidad de luz que llega a la retina a los 80 años es un tercio inferior que la que se alcanza en la edad adulta.

Disminuye la fuerza de los músculos orbiculares (responsables del cierre palpebral), además se da una progresiva flaccidez de los párpados (sobre todo el inferior). La presencia de lagrimeo espontáneo (epífora) se facilita por el paulatino fracaso en la función de la bomba lacrimal y por el desplazamiento del punto lacrimal. Se reduce la función secretora de los sacos lacrimales y el líquido lacrimal se vuelve más hipertónico.

La conjuntiva se hace más delgada y se torna más friable adquiriendo un tinte amarillento.

Aparece el arco corneano senil (gerontoxon) que traduce el acúmulo patológico de lípidos en forma anular.

El tamaño de las pupilas disminuye con la edad. El deslumbramiento ante el exceso de luz es muy común en el anciano y se debe a la lentitud en la respuesta del reflejo de constricción pupilar.

En el humor vítreo, a partir de los 40 años, se sustituye el tejido gelatinoso que posee por otro más líquido, merced al colapso parcial de su red de fibras colágenas, lo que favorece la aparición de cuerpos flotantes sin apenas repercusión funcional.

La retina se va haciendo cada vez más fina por la pérdida de células nerviosas y en su periferia pueden aparecer quistes periféricos degenerativos. También disminuyen las células fotorreceptoras (bastones y conos) lo que explica la dificultad para ver en situaciones de penumbra y para procesar y transmitir con rapidez toda la información visual al nervio óptico.

Se da una pérdida progresiva de audición (presbiacusia) bilateral. Hay una pérdida de la audición para los tonos de alta frecuencia, lo que va a dificultar la comunicación. La presbiacusia se asocia a una dificultad adicional para la comprensión del lenguaje hablado (que traduce un defecto de integración a nivel del sistema nervioso central).

La pérdida del sentido del olfato (anosmia) es poco común como fenómeno ligado al envejecimiento. Lo que más se ve es la “hiposmia” o disminución de la intensidad olorosa. Se dan escasas modificaciones en el número y distribución de las papilas gustativas. Se pierde un cierto grado de capacidad gustativa global o, al menos, para la discriminación entre los cuatro tipos clásicos de gusto (amargo, ácido, salado y dulce). El uso crónico de ciertos medicamentos altera la sensibilidad al gusto.

La forma en que se percibe el entorno fija de manera fundamental el modo y en que se desarrollan los procesos de interacción con el mundo y como consecuencia, un retraso en el desarrollo cognitivo y el aprendizaje (163).

En definitiva el problema añadido que aparece relacionado con la edad y que complica su estudio es la pérdida de facultades sensoriales. En el proceso de aprendizaje y memorización la captación de los estímulos en cuanto a su nitidez, velocidad etc. van a afectar al producto general del proceso. La pérdida de visión, tacto y sobretodo olfato van a determinar un menor rendimiento en la realización de tareas de aprendizaje y memorización, causando en algunos casos o agravando en otros este menor rendimiento de las mismas (164,165).

1.1.6.4 Ansiedad.

Como ya hemos visto, las modificaciones en expresión de transmisores y receptores y/o la ineficiencia en el sistema de transmisión o acoplamiento entre ambos es una cuestión frecuentemente implicada en los procesos de déficit neurológico. Cuando implica al sistema serotoninérgico se producen complicaciones derivadas del funcionamiento anómalo de las neuronas que afectan a los sistemas que controlan la gestión psicológica de las emociones, la adaptación a los impulsos y la relación se trastorna, dando como resultado estados de aprensión exacerbada, ansiedad y depresión (166)(74). La caracterización de algunos modelos animales de envejecimiento como el ratón 3xTgAD corroboran el aumento de los niveles de ansiedad y miedo con la edad (167).

1.2 Preservación de las capacidades neurológicas.

Dentro de la involución normal esperada del sistema nervioso durante el envejecimiento se puede encontrar una gran variedad en cuanto a la gravedad y precocidad de presentación de su efecto. Esta variabilidad está influenciada por multitud de factores intrínsecos como la genética y enfermedades sistémicas, sobre los que es difícil actuar, pero también de forma determinante factores extrínsecos como hábitos, dieta, ejercicio, actividad intelectual etc.



Este conocimiento es fundamental para justificar el estudio de aquellos elementos que durante el envejecimiento pueden aportar un estado de vejez saludable y que sean realmente eficaces a la vez que asequibles.

Esta breve revisión además, confirma que el rendimiento de muchas estrategias de prevención, en cuanto a resultados beneficiosos, es muy alto comparado con el coste que supone un pequeño cambio de hábitos, sin necesidad de recurrir a costosas estrategias terapéuticas que llegarán mas tarde que pronto y que tendrán una difusión dudosa entre la población.

Los tres pilares básicos bajo los que sustenta la preservación de las capacidades cognitivas del envejecimiento saludable y capacitado, son el mantenimiento de la actividad intelectual, el ejercicio y la dieta. Contando por supuesto con que descartamos el abuso de drogas, alcohol o tabaco, la exposición a tóxicos así como a otras injurias como traumatismos.

La búsqueda del papel que juegan estos aspectos sobre los cambios neurológicos y la velocidad con que se presentan, nos deja una gran cantidad de estudios centrados en cada uno de estos aspectos de preservación. De estos estudios, podemos sacar algunas conclusiones que pueden ser ventajosas a la hora interpretar nuestros resultados.

1.2.1 El enriquecimiento ambiental y actividad intelectual.

Tanto en investigación clínica como en modelos animales se reseñan pruebas que corroboran que la atrofia de la función cognitiva se produce en ambientes estresantes, monotonía, circunstancias de falta de motivación o de objetivos vitales. El entrenamiento de las capacidades intelectuales y desarrollo de actividades nuevas, las disciplinas de ejercicio mental (168), los ambientes novedosos y estimulantes (169,170), y las relaciones con los congéneres en ambiente pacífico y alegre, son prácticas y condiciones que afectan a la preservación de las funciones cognitivas y al desarrollo de modificaciones potencialmente preventivas sobre los efectos neurodegenerativos del envejecimiento. Se establecen mecanismos epigenéticos reguladores que fomentan la expresión de factores neurotróficos y disminuye la aparición de marcadores de neurodegeneración incluido la proteína amiloide (171), o bloqueando la formación de hidroximetil-citosina (172), marcador de metilación del ADN que se ha relacionado con la envejecimiento neuronal en determinadas zonas del cerebro (173). Estos efectos se traducen en transformaciones morfológicas y fisiológicas del sistema nervioso que pasan por el freno de la atrofia neurológica, la activación de los procesos de neurodegeneración, la potenciación del sistema inmune, aumentar la neurogénesis y la angiogénesis etc. Esto se traduce en una mejora del aprendizaje y la memoria (174,175), y potencialmente retardar el progreso de envejecimiento cerebral en roedores (167,176)

1.2.2 El ejercicio.

Dentro del concepto de envejecimiento bajo hábitos sanos, el mantenimiento de las funciones cognitivas a lo largo de toda la vida está claramente beneficiado por el ejercicio físico. Las pruebas que lo confirman a través de estudios de población (177) así como los realizados en el laboratorio son numerosas (178,174,129,179).

1.2.3 La dieta.

La dieta como veremos en el siguiente punto es uno de los pilares de la preservación de las capacidades neurológicas durante el envejecimiento. Los hábitos dietéticos que afectan a la cantidad, variedad y calidad de los alimentos que

consumimos marcan una diferencia muy significativa con la forma sana o menos sana en que envejecemos. Vemos los mecanismos intrínsecos de cómo la dieta influye en el retraso de los fenómenos adversos del envejecimiento.

Existen gran cantidad de publicaciones que sugieren que la importancia de los hábitos dietéticos de las personas sobre el proceso de envejecimiento es muy grande, en concreto de la dieta mediterránea (180,181). Esta relación afecta a diversos aspectos como el origen, cantidad, variedad, concentración energética y de los compuestos dietéticos que se incorporan a esta.

De estos aspectos primordiales de la dieta, fundamentalmente cantidad, la concentración energética y variedad de micronutrientes, están demostrando ser elementos de prevención y mejora de la mayoría de las alteraciones relacionadas con el envejecimiento que hemos ido describiendo. Esta acción se realiza a distintos niveles bioquímicos y metabólicos, aunque fundamentalmente aparece en el centro de los mecanismos involucrados contrarrestar el estrés oxidativo.

La restricción calórica.

La restricción calórica es uno de los aspectos dietéticos que tienen efecto sobre la conservación de capacidades y retrasa la aparición de efectos adversos (182). Varios mecanismos son los que producen este efecto: modificaciones epigenéticas, sobre la cromatina, las histonas, así como el control sobre la expresión de genes (183), el efecto directo sobre el metabolismo neuronal, susceptibilidad a neurotoxicidad y deficiencias en la expresión de RNA –m, la bioquímica cerebral como el aumento de la densidad de receptores colinérgicos muscarínicos, de la actividad de la colina acetiltransferasa (ChAT) y de L-Acido Glutámico decarboxilasa (GAD) y disminución de la actividad de tiroxin-hidrosilasa (TH) (184). Concomitantemente se relaciona con reducción de enfermedades sistémicas asociadas al envejecimiento y que alteran de forma secundaria el sistema nervioso, como hipertensión, enfermedades cardiovasculares y cáncer (185).

Composición de la dieta.

Las frutas y verduras poseen cualidades extraordinarias en cuanto a su composición: una baja concentración calórica, alto contenido en fibra, gran riqueza en vitaminas y minerales y además otros componentes bioactivos que, aunque en bajísima concentración y no siendo considerados tradicionalmente como nutrientes, están demostrando poseer una capacidad sorprendente en la mejora de la salud y la prevención de enfermedades. Todas las plantas, incluidas las frutas, sintetizan una vasta colección de compuestos químicos que no están necesariamente involucrados en el metabolismo de la planta y a pesar de ello, estos compuestos secundarios sirven a una variedad de funciones que aumentan la supervivencia de la planta. Estos compuestos pueden ser responsables de multitud de efectos adaptativos beneficiosos para la salud de la propia planta y la producción de su fruta o verdura.

Muchos estudios demuestran que los compuestos polifenólicos que contienen las frutas y verduras con colores intensos pueden tener una potente actividad antioxidante y antiinflamatoria. Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo de las plantas que actúan en parte de estas funciones de la planta como, la supervivencia, la defensa, la reproducción etc. y han demostrado tener una potente capacidad bioactiva para animales y el ser humano cuando los integran a su dieta. Además la combinación de mixturas vegetales o de los componentes intrínsecos a estos proporciona beneficios a través de la combinación aditiva y/o sinérgica de sus efectos. Los estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de frutas y verduras se asocia con un

menor riesgo de enfermedades crónicas. Por lo tanto el aumento del consumo de frutas y verduras que contienen altos niveles de fitoquímicos ha sido recomendado para prevenir las enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo en el cuerpo humano.

Como referencia de esta composición en un estudio (186), se seleccionaron 10 hortalizas comunes en la base del consumo de datos per cápita en los Estados Unidos con un perfil completo de las distribuciones de compuestos fenólicos, incluyendo compuestos fenólicos libres y ligados en estos vegetales. Las observaciones más relevantes fueron que el brócoli posee el contenido fenólico total más alto, seguido de la espinaca, cebolla amarilla, pimiento rojo, zanahoria, repollo, patata, lechuga, apio y pepino. El pimiento rojo tiene la mayor actividad antioxidante total, seguida por el brócoli, la zanahoria, la espinaca, la col, la cebolla amarilla, apio, patata, lechuga, y el pepino. Se propuso el índice antioxidante (PAI) para evaluar la calidad / cantidad de contenidos fenólicos en estas verduras y se calculó a partir de las actividades antioxidantes total corregida, mediante la eliminación de las contribuciones de vitamina C.

Se ha estudiado la actividad antiproliferativa in vitro de la dieta vegetal, usando HepG, células de cáncer de hígado humano. Las espinacas mostraron el mayor efecto inhibitorio, seguido de la col, pimiento rojo, cebolla y brócoli. Sobre la base de estos resultados, se propone el índice de bioactividad (BI) para la prevención del cáncer en la dieta para proporcionar una referencia sencilla para los consumidores a elegir verduras de acuerdo con sus actividades beneficiosas. El BI podría ser un biomarcador para futuros estudios epidemiológicos en la prevención del cáncer en la dieta y la promoción de la salud (187).

Se han recabado también suficientes evidencias de que la correcta alimentación e incluso la suplementación con micronutrientes puede ser una alternativa viable para el retraso de los factores del declive relacionado con la edad en general, incluso en una población de riesgo como los que han alcanzado el grado de ancianos, la protección contra patologías cardiovasculares, degenerativas como EA (188,189), e incluido el cáncer (41). La recomendación de multitud de instituciones de salud de ingerir vegetales y fruta al menos 5 veces al día está amparada en toda la variedad de estudios epidemiológicos que apuntan en ese orden (41,43,190).

Así pues, una atractiva estrategia para contrarrestar los efectos del envejecimiento es recurrir a complementos dietéticos que demuestren sus propiedades en la prevención de diversas afecciones relacionadas con el envejecimiento. La literatura ofrece renovados estudios con sustancias que parecen satisfacer estas expectativas como por ejemplo los efectos del ácido docosahexaenoico (DHA) en la función mitocondrial (191), la cafeína (192), y micronutrientes como la familia de la vitamina B, y vitaminas E, C y D, ácido araquidónico (193), ácidos grasos omega (194) 6 o flavonoides (42,195) en la prevención de alteraciones cardio-vasculares, el ácido fólico en la acumulación de placa amiloide (196), el oleocanthal (OC) del aceite de oliva en la degradación de la placa amiloide en AD (197), la metionina y la mejora del metabolismo hepático, las fresas en la agregación plaquetaria (198) y muchos otros.

Los compuestos fenólicos, cuya estructura se compone por uno o más anillos aromáticos que cargan con uno o más grupos hidroxilo, se encuentran en los alimentos en un gran rango de tamaños moleculares, desde simples moléculas hasta grandes oligómeros. Con frecuencia, los compuestos fenólicos en los alimentos se producen como glucósidos. Los azúcares unidos a estos compuestos hacen que sean más hidrosolubles. Sin embargo, los oligómeros de muy alto peso molecular son generalmente insolubles. Hay cientos de diferentes compuestos fenólicos en los

alimentos vegetales, pero dos tercios de ellos son flavonoides y un tercio son ácidos fenólicos.

Los flavonoides son conocidos como potentes antioxidantes. Su capacidad de limpiar radicales hidróxido y peróxido se ha demostrado repetidamente *in vitro*. Entre los efectos de los flavonoides sobre el organismo, los beneficios más importantes en los que están involucrados son las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (199)(199–202), la mejora de la función mitocondrial (203), de modular la expresión de genes involucrados en el metabolismo, supervivencia y proliferación celular, protección y reparación de ADN (204,205), activando la autofagia y actividad de la actividad lisosomal de la microglía (206) o también actuando por sí mismos como señales moleculares involucrando a vías que pueden ser beneficiosas contra el cáncer, enfermedades proliferativas, la inflamación y neurodegeneración (207), regulando la expresión de receptor PPAR α (208).

Sobre las funciones cognitivas tienen un impacto demostrado (209–212,197,188,200,213,202). Un estudio comprueba que el consumo de arándanos ricos en flavonoides tiene un impacto epigenético positivo en el rendimiento de aprendizaje espacial en animales jóvenes y sanos, y estas mejoras están vinculadas a la activación ERK-CREB- BDNF que involucra a la vía de síntesis de ARN-m a través de receptores de quinasa extracelular (ERK), de la proteína CREB (cAMP-response element-binding protein) implicada en cambios a largo plazo de la memoria o la plasticidad sináptica y expresión de ciertos genes como los precursores del factor neurotrófico BDNF, factor de crecimiento, que a su vez interviene la supervivencia y función neuronal (214).

Los flavonoides y sus metabolitos han demostrado que, actuando sobre la cascada de señales de protección génica: fosfoinosítide 3-quinasa (PI 3-quinasa), Akt/protein quinasa B (Akt/PKB), tirosina kinasas, protein quinasa C (PKC), protein quinasa (MAP kinase), además de sobre mutaciones en APP/PS1 (proteína precursora de amiloide/presenilin-1), pueden prevenir los déficits de conducta en ratones transgénicos (usados como modelo murino de AD), cuando se alimentan con arándanos, comparado con ratones transgénicos no suplementados. Se señala el incremento de niveles de señal extracelular de kinasas (ERK) y protein kinase C (PKC) en hipocampo como vía de actuación (215).

Los suplementos de bayas rojas tienen efectos sobre el deterioro motor y el deterioro cognitivo relacionados con la edad y enfermedades asociadas; este hecho se ha confirmado consistentemente en estudios con animales (209,216,212,217).

También los polifenoles de los arándanos han demostrado su poder de atenuar directamente la activación de la microglía *in vitro*, lo que lleva a una disminución en la cantidad de productos intermedios citotóxicos liberados por estas células (218). Efecto positivo en la activación sobre la microglía aparece en animales alimentados con las dietas arándanos, tanto en el cuerpo estriado como en el globo pálido después de provocar lesiones tóxicas (219).

Por último se ha descrito el efecto producido sobre la neuroregeneración hipocampal en ratas envejecidas (211).

Los ácidos fenólicos también son buenos antioxidantes dependiendo de su estructura, trabajan sinérgicamente con otros antioxidantes como ascorbato y tocoferol para aumentar su actividad. Otra vía por la que los flavonoides realizan su efecto antioxidante es la quelación de metales disminuyendo la producción de radicales libres. Esta actividad antioxidante de los compuestos fenólicos reduce el estrés oxidativo



durante el envejecimiento y es gran parte de la reducción de riesgo de padecer enfermedades crónicas en el envejecimiento (220).

La capacidad antioxidante de los alimentos se determina mediante la Capacidad de absorción de Radicales libres de Oxígeno (ORAC) que es una prueba estandarizada adoptada por el Departamento Federal de Agricultura de Norteamérica para medir el Potencial Antioxidante total de alimentos y suplementos nutricionales. Esta prueba estandarizada se desarrolló por el Dr. Guohua Cao, médico y químico del Instituto Nacional de Envejecimiento en Baltimore, Maryland (USA). Nos proporciona una manera bastante precisa de determinar el poder de un alimento o fruto en particular para destruir o neutralizar los radicales libres en el organismo (37,221).

Tabla 1. Valores ORAC de algunas frutas (Using AAPH as a Peroxyl Radical Generatora total ORAC)

Fruto	% materia seca	Total ORAC	ORAC MS	Extracto Zumo
Fresa	10.0	15.36±2,38	153,6±7,5	12,44
Ciruela	12.0	9.49 ± 0.67	79.1 ±1.9 8	8.35
Naranja	14.5	7.50 ± 1.01	51.7 ± 2.7	6.82
Uva negra	20.5	7.39 ± 0.48	36.0 ± 1.1	3.99
Kiwi	16.5	6.02 ± 0.52	36.5 ± 1.3	5.54
Pomelo	10.0	4.83 ± 0.18	48.3 ± 0.6	4.54
Uva blanca	17.0	4.46 ± 1.06	26.2 ± 2.6	2.89
Banana	24.5	2.21 ± 0.19	9.0 ± 0.4	2.10
Manzana	16.5	2.18 ± 0.35	13.2 ± 0.9	1.92
Tomate	5.0	1.89 ± 0.12	37.8 ± 0.5	1.57
Pera	14.0	1.34 ± 0.06	9.6 ± 0.2	1.23
Melón	7.5	0.97 ± 0.15	12.9 ± 0.5	0.88

En cuanto a la prevención del cáncer, algunos de los agentes quimiopreventivos conocidos presentes en las bayas incluyen vitaminas (vitaminas A, C y E y ácido fólico), minerales tales como calcio y selenio, fibra dietética, carotenoides, fitoesteroles tales como β -sitosterol y estigmasterol, ésteres triterpénicos y los compuestos fenólicos tales como antocianos, flavonoles, flavanoles; taninos hidrolizable como proantocianidinas, ellagitaninas, y ácidos fenólicos como ácido hidroxibenzóico e hidroxicinámico (222,223).

Otra actividad que muestran los polifenoles es la antiinflamatoria. Existen en la bibliografía numerosos ejemplos de este proceso y sus posibles vías. El efecto del extracto de cianidina de cerezas y bayas sobre la inhibición de las ciclooxigenasa (COX) in vitro (224). Además el extracto de fresas exhibe una moderada eficacia en la inhibición de la isomolécula COX-1 (relacionada con el metabolismo de las prostaglandinas gastroprotectoras) mientras que son potentes inhibidores de COX-2 que es el principal promotor de las prostaglandinas del proceso inflamatorio. Este descubrimiento tiene gran importancia ya que el proceso inflamatorio está involucrado en la etiología de un amplio grupo de enfermedades como el cáncer, enfermedades del corazón y la enfermedad de Alzheimer.

En diversos estudios publicados (209,188), el zumo de uvas negras, o arándanos, o extracto de fresas atenúan significativamente los déficits motores y cognitivos relacionados con el envejecimiento. Además de la reducción en el estrés oxidativo (EO) (balance entre la producción de oxidantes y la actividad de antioxidantes), también parece que hay una mejora en otras variables relacionadas con el envejecimiento concernientes a la comunicación neuronal como por ejemplo la sensibilidad de los

receptores o los déficits en la transducción de la señal, los cuales podrían explicar la reducción en anomalías del comportamiento.

1.3 Fresas

La fresa o *Fragaria ananassa* Duch, es una fruta incluida dentro de los denominados berries, sin embargo este grupo se conforma por una mezcla no homogénea de familias, a destacar: ericácea (arándanos) y rosácea con los géneros *rubus* (moras) y *fragaria ananassa* (fresas). Existen bastantes estudios de complementación tanto en humanos como en animales de experimentación, realizados con berries sin embargo, son menos los estudios específicos para cada una de ellas, incluida la fresa, fruta con una extraordinaria actividad sobre la salud.

La composición de la fresa.

Esta posible actividad sería consecuencia de su baja concentración calórica 32 Kcal/ 100 g presencia de fibra dietética y fructosa, o de sus altos niveles en vitaminas hidrosolubles (C y folato) o liposolubles (A y tocoferol), o minerales como manganeso, sino sobre todo al contenido en compuestos fenólicos, los cuales han demostrado una gran capacidad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los fitoquímicos de la fresa que han sido más ampliamente estudiados son los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos son productos de metabolismo de la planta que sirven para muchas funciones esenciales para el crecimiento y la supervivencia de la planta y está claro que estos compuestos también son bioactivos en los animales y los seres humanos que los consumen. Existen cientos de compuestos fenólicos, pero cerca de dos tercios son flavonoides y un tercio son ácidos fenólicos

Los compuestos fenólicos se encuentran en la fresa en proporciones que varía con el genotipo del fruto, la forma y las condiciones de cultivo, grado de madurez, y la manipulación después de la cosecha, del almacenamiento post cosecha (si no son frescas) (225) y otros factores no tenidos en cuenta hasta hace poco como es el contenido en antioxidantes de los aquenios o verdaderos frutos donde encontramos el 11% de los fenólicos totales de cada infrutescencia sin embargo tienen el 14% de la actividad antioxidante total (226). La variabilidad en los datos también se debe a diferencias metodológicas, ya que existe una falta de acuerdo sobre el método adecuado para analizar estos compuestos. Todos estos factores hacen que sea difícil comparar los resultados de diferentes estudios de determinación (227–229). Por lo tanto es importante a la hora de centrar el estudio de sus beneficios tener en cuenta además, las importantes discrepancias encontradas en las concentraciones por ejemplo de compuestos fenólicos encontradas por los distintos autores. A pesar de estas circunstancias parece ser que los niveles que permanecen tras los tratamientos industriales habituales son todavía muy altos y por lo tanto continúa siendo una fuente de nutraceuticos o antioxidantes naturales de calidad excelente para la salud independientemente de la posibilidad de estandarizarlos.

En las fresas encontramos algunas subclases de flavonoides como antocianinas, catequinas y flavonoles como quercetin y kaempferol y de ácidos fenólicos como el ácido elágico.

Los flavonoides mas abundantes son las antocianinas. Las antocianinas son generalmente responsables de los llamativos colores de los frutos, el color rojo de la fresa en concreto es debido a un pH por debajo de 2 sobre este elemento. Es un compuesto muy inestable y su concentración en la fresa varía desde 2 a 389 µg/g de peso fresco. Después son abundantes los flavanoles como las catequinas y flavonoles

como quercetin y kaempferol (11%). Todos ellos con una gran variabilidad en sus concentraciones debida a los factores anteriormente mencionados y difíciles de cuantificar.

Además, las fresas son extremadamente ricas en el ácido fenólico, ácido elágico (63 $\mu\text{g/g}$ en fresco), aunque se describe una gran variabilidad en esta concentración entre 43 y 464 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco (230); el 95,7 % de ácido elágico se localiza en la pulpa lo que le proporciona en la fresa una alta biodisponibilidad (231).

Bioactividad de los compuestos fenólicos.

Los flavonoides, como ya se ha apuntado, son conocidos por ser potentes antioxidantes. Su capacidad para eliminar los radicales hidroxilo y peroxilo se ha demostrado repetidamente *in vitro*. Los ácidos fenólicos también pueden ser bastante buenos antioxidantes, dependiendo de sus estructuras. Ambos, flavonoides y ácidos fenólicos puede trabajar sinérgicamente con otros antioxidantes, tales como ascorbato y tocoferol. Otra forma en la que los flavonoides ejercen un efecto antioxidante es la quelación de metales y por lo tanto la inhibición de la producción de radicales libres.

La actividad antioxidante de estos compuestos fenólicos dietéticos sugiere que pueden reducir el estrés oxidativo en los seres humanos y por lo tanto puede reducir el riesgo de varias enfermedades originadas en EO. Se ha demostrado una asociación positiva entre el consumo de flavonoides y un menor riesgo de enfermedad coronaria. También se sugiere una acción preventiva en ciertos tipos de cáncer y diabetes tipo II y obesidad, la mejora de la función endotelial, la inhibición de la agregación plaquetaria, lo que mejora el perfil de lípidos en plasma, modulando el metabolismo de eicosanoides, los radicales libres y el aumento de resistencia de la LDL a la oxidación (232,233). Evidencia proporcionada por estudios *in vitro* muestran que los compuestos fenólicos de las fresas pueden tener efectos anti-inflamatorios (234,235) y suprimir mutagénesis a través de su propiedad antioxidante y genoprotectiva (236). Extractos de fresa también parecen modular la señalización celular en las células cancerosas al inhibir la proliferación de varios tipos de estas células (237), que induce así la detención del ciclo celular y la apoptosis (224,238), y la supresión de la angiogénesis tumoral (239). Sin embargo, la mayoría de estos hallazgos provienen de estudios *in vitro*, por lo que nuevas investigaciones se deben centrar sobre todo en pacientes con condiciones precancerosas observando si es posible la confirmación de su efecto.

Los mecanismos por los que las fresas ejercen estas capacidades son muy variables y en muchos casos desconocidos. Ciertamente, la anti-oxidación es un mecanismo reconocido, ya que la administración de suplementos de fresa disminuye significativamente el estrés oxidativo, por la disminución de la formación de malondialdehído, la protección de LDL de la oxidación y protección de las células mononucleares de la sangre contra el aumento de daño en el ADN (239,240). Junto a los efectos antioxidantes, estos otros mecanismos también podrían estar involucrados en los efectos de las fresas que promueven la salud. De hecho, se ha encontrado que el consumo a largo plazo de cantidades moderadas de una mezcla de bayas y fresa aumenta el colesterol HDL, disminución de la presión arterial y da lugar a cambios favorables en función de las plaquetas, lo que indica que algunos de los constituyentes de las fresas, solos o en combinación, desempeñan un cierto papel en la reducción de las enfermedades cardiovasculares (204,241). También parecen exhibir un potencial inhibidor bastante uniforme contra la α -glucosidasa, una acción variable contra la enzima la convertidora angiotensina-1 (242,243), o protección contra la úlcera gástrica

producida por etanol (240). La actividad biológica de la fresa también se extiende a vías directamente involucradas en el metabolismo y la supervivencia celular (244).

En cuanto al efecto protector de las distintas variedades de esta fruta, Diamanti investigó los efectos de dos tipos de fresa diferentes, Adria y Sveva, frente a toxicidad inducida en ratas con doxorubicina (DOX). Realizó una intervención dietética controlada durante 16 semanas, verificando que la variedad Sveva presentaba mayor valor de la capacidad antioxidante total y los niveles de fenoles y vitamina C que Adria, que a su vez presenta contenido de antocianina superior. La DOX aumentó drásticamente el daño del ADN de linfocitos; los biomarcadores de proteínas del hígado y la oxidación de lípidos a nivel plasmático aparecen marcadamente disminuidos, el contenido de especímenes oxígeno reactivos (ROS) mitocondriales, de retinol, de enzimas antioxidantes del hígado, y la funcionalidad mitocondrial quedaba muy mermada en animales controles. Después de 2 meses de suplementación de la fresa, las ratas presentaron una reducción significativa del daño en el ADN y la concentración de ROS y una mejora significativa de los biomarcadores de estrés oxidativo, las actividades enzimáticas antioxidantes, y el rendimiento mitocondrial. Estos resultados sugieren que la suplementación de la fresa puede contrarrestar la toxicidad de la DOX, lo que confirma el potencial beneficio para la salud de la fresa en vivo contra el estrés oxidativo (245).

La biodisponibilidad de sus distintos componentes en las condiciones de consumo es muy variable y por ello se describen variaciones en las propiedades nutricionales de unos estudios a otros. Como ya hemos introducido además de la influencia del genotipo, la maduración y la estacionalidad que afectan a las propiedades organolépticas como el color, la firmeza, la acidez, el contenido de sólidos solubles, así como a sus proporciones de sus distintos componentes bioactivos (225), también su interrelación con el consumidor afecta, por tanto a sus propiedades bioactivas (246).

En efecto, otro de los factores de variabilidad en su biodisponibilidad, que diferencia los resultados in vivo de los obtenidos in vitro, de elementos como las antocianinas de la fresa en los seres humanos, es la absorción intestinal. Algunos estudios (247,248) han demostrado que las antocianinas intactas se absorben muy mal. En general, menos del 2% de las antocianinas ingeridas a través de un consumo moderado de fresa se excreta en la orina durante las 24 horas después de la ingestión, aunque se ha observado una fuerte relación lineal entre la dosis oral y la excreción de antocianina. Incluso concentraciones inferiores han sido recuperados en plasma (248).

La exposición a la población microbiana del intestino grueso parece ser sustancial ya que es capaz de modificar fuertemente su estructura molecular (249). En el futuro, la identificación de los metabolitos fenólicos microbianos de antocianinas de fresa en los seres humanos será de vital importancia, ya que podría abrir otra vía en la que el consumo de fresas puede influir en la salud. Por lo que a las proantocianidinas y ácidos elágicos se refiere, pocas investigaciones se han centrado específicamente en la biodisponibilidad de éstos provenientes de fresas enteras.

1.4 Pruebas de evaluación de envejecimiento mediante conducta.

En la evaluación del progreso de déficit neurológico que el envejecimiento imprime sobre el organismo, podemos encontrar que existen multitud de propuestas sobre qué parámetros, señales o estructuras pueden ser susceptibles de considerarse indicadores manejables que ofrezcan un buen reflejo de la situación real de los individuos mayores. Estos biomarcadores del envejecimiento y su interpretación nos permiten evaluar la progresión de la senescencia en un individuo o población.

En geriatría existen muchos test con criterios consensuados que se utilizan como diagnóstico de demencia (250,251). Se pueden basar en aspectos cognitivos, del lenguaje, de memoria, pruebas de coordinación, fuerza muscular, percepción de los sentidos etc. (252). Otros lo hacen utilizando criterios morfológicos que utilizan técnicas de imagen como PET o RMI o en biomarcadores del líquido cefalorraquídeo como proteínas β Amiloide o Tau, o incluso utilizan éstos como biomarcadores sanguíneos (253).

El resultado final de todos los procesos neurológicos descritos hasta ahora es que las personas mayores perciben peor, olvidan con facilidad, piensan con dificultad, se mueven con lentitud e inseguridad y sienten y actúan de forma alterada, lo que dificulta su relación con el medio y la comunidad.

Los marcadores de estas disfunciones nos pueden proporcionar las herramientas para evaluar la amplitud del déficit y en nuestro caso la mejora o preservación de las capacidades neurológicas, mediante una intervención dietética.

El sistema de cognición en general se compone de procesos de funcionalidad, de aprendizaje y memoria.

En el ámbito de la investigación neurológica con modelos animales, existen una serie de pruebas de conducta muy estandarizadas que ofrecen datos muy valiosos sobre el estado cognitivo y físico de los animales y de las que pueden derivarse estos marcadores de envejecimiento.

Nosotros nos vamos a centrar en aquellos marcadores que se pueden desprender de modelos animales de conducta.

Los test de comportamiento son nuestra herramienta de evaluación del deterioro y efecto preventivo o terapéutico de la suplementación con fresas (254).

Estos nos evalúan aquellas alteraciones funcionales más características de envejecimiento que ya hemos distinguido y que van a ser nuestros marcadores de envejecimiento:

- Déficit sensitivo.
- Aprendizaje y Memoria.
- Alteraciones motoras, provenientes de degeneración neuromotora o de capacidad física general.
- Tendencia a la ansiedad y depresión.

Las pruebas de conducta que se realizan para evaluar estas categorías del proceso de envejecimiento y su posible mejora con el tratamiento son:

1.4.1 Evaluación neurológica general.

El primer peldaño del programa para la valoración del déficit neurológico en animales y seres humanos, ya sea con criterios clínicos de diagnóstico, como experimentales es un examen neurológico previo que detecte los rasgos más evidentes de la función o disfunción neurológica. En el envejecimiento, como hemos visto, se van a ver perjudicadas funciones sensoriales y motoras. Estas se pueden ver afectadas en tanto en los órganos sensoriales como en las vías de conducción, integración o motoras, dando como resultado el retraso de diversos reflejos.

En la literatura se pueden encontrar protocolos de evaluación neurológica mas o menos amplios destinados a valorar desde la condición de daño neurológico principalmente en pruebas de toxicidad (255), drogadicción o riesgos ambientales.

Mediante una batería sistemática de pruebas observacionales sencillas descrita por Marshall y Titelbaum (256), modificada por Bjorklund et al. (257), y ampliada con una valoración de reflejos adicionales aplicada por Bures et al. (1983), se puede conocer el estado de la función neurológica general evaluando parámetros como la percepción sensorial, la coordinación de las extremidades y la orientación sensitivomotora de los animales, determinando la condición neurológica de los animales de experimentación.

A este test se le aporta una puntuación que nos permite cuantificar la correcta actividad o el deterioro de estos signos, comparar entre los grupos de animales y lo que es muy importante para observar la relación entre éstas y alteraciones que aparezcan en las pruebas de conducta que permitan descartar los animales o estudiarlas mas detenidamente.

En esta evaluación podemos detectar principalmente déficit sensitivo, reflejos, coordinación, y capacidad física.

1.4.2 Aprendizaje y Memoria.

La neurociencia cognitiva del envejecimiento estudia los cambios que se producen en el cerebro humano durante el proceso de envejecimiento y las repercusiones de estos cambios en los procesos cognitivos, especialmente en la memoria. El aprendizaje es el proceso de adquisición de conocimientos y conductas nuevas y la memoria es el proceso que permite que se almacene y se reproduzca la información aprendida.

El estudio de la memoria es un punto esencial en la valoración de decline neurológico asociado a la edad. Como hemos visto es una de las principales consecuencias de los trastornos funcionales estudiados y siempre acaba siendo el signo más aparente y temido del envejecimiento y de las enfermedades que lo acompañan.

La memoria es una cualidad que afecta a distintas actividades neurológicas y varias regiones cerebrales y se clasifica en memoria implícita (no declarativa) y memoria explícita (declarativa) atendiendo a los contenidos de la información o los estímulos.

En la primera se incluirían los procesos de habituación, sensibilización, condicionamiento clásico y memoria incidental o primado (priming) y no depende del hipocampo.

En el segundo se distingue la memoria semántica y episódica. Requiere un acto voluntario con un proceso mas o menos esforzado dividido en tres etapas: codificación o captación de los estímulos en sus detalles y el entorno; almacenamiento con la retención de la memoria a largo plazo, y recuperación de la información conservada al plano consciente.

Se describen modelos animales para el estudio de muchos de estos niveles y fases del proceso de la memoria de forma específica. Muchos de ellos provocan lesiones en el sustrato neurológico de los sistemas de memoria, imitando lesiones en patologías humanas evaluando su efecto, y detectando los sistemas y sus relaciones en el almacenamiento de distintos tipos de información. En un clásico modelo animal de amnesia desarrollado por Mishkin se lesionaba el hipocampo, la amígdala y la corteza circundante a ambas estructuras. Por ejemplo, la lesión exclusiva del hipocampo (258) afecta diversas tareas de memoria como la discriminación simple, la discriminación concurrente y respuestas retardadas con intervalos superiores a 30 segundos. Como es

esperable, esta misma lesión no afecta el rendimiento en tareas dependientes de destrezas o hábitos adquiridos (259). Otros estudios con lesiones exclusivas de la amígdala, revelan que si bien esta no produce amnesia directa, si acervaría los déficits de memoria asociados a daño hipocampal (260). Lesiones de la corteza peririnal muestran un retraso en el almacenamiento o recuperación de la información no espacial y afección no determinante en la representación espacial de la memoria (261,262).

En los estudios animales, atendiendo al nivel de procesamiento de aprendizaje, vemos que se consideran dos tipos fundamentales de memoria:

- Memoria de trabajo u operativa (working memory) que es la que retiene un estímulo y secuencia de relaciones solo para la ejecución de una tarea y solo el tiempo necesario, por lo que tiene muy poca duración. Involucra principalmente al núcleo estriado.

- Memoria de referencia que es de largo plazo, la memoria de trabajo se inscribe en base a esta. Está principalmente regida por el hipocampo.

Los modelos animales se adecúan para el estudio del proceso de la memoria entre los que evalúan la atención, la memoria a corto plazo o la memoria procedimental, la memoria declarativa a largo plazo, episódica (263) y semántica.

Encontramos estudios mas generalizados, atendiendo también a la primeras fases de captación, el aprendizaje, la memoria no espacial (264) y espacial (265).

Laberinto acuático de Morris.

En consonancia con dos tipos de memoria descritos en humanos, la memoria de trabajo (working memory) y la de referencia (reference memory), el uso del laberinto acuático permite, en función del procedimiento empleado durante la fase de entrenamiento, detectar alteraciones en uno u otro de aquellos dos procesos durante el envejecimiento (266).

El rendimiento en el laberinto acuático de Morris, ha mostrado estar deteriorado con el envejecimiento (267–272), por causa de un déficit específico en la habilidad de las ratas viejas de usar la información espacial (272,273).

Fischer et al. (73) en un interesante estudio asoció, los cambios morfológicos producidos en los cuatro principales núcleos del sistema colinérgico del prosencéfalo (tabique medial, MS; extremidades vertical de la banda diagonal de Broca, VDB, núcleo basal magnocelular, NBM; y estriado) de ratas con el deterioro en el aprendizaje y la memoria correlacionándolo con cinco grupos diferentes de edad, 3, 12, 18, 24 y 30 meses, y su capacidad de aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris MWM. Utilizando marcadores para colina acetiltransferasa (ChAT) y el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR) mapeó el deterioro en la actividad colinérgica de estas zonas mediante histoquímica. En sus resultados comprobó que el grado de deficiencias de navegación se correlacionó con los cambios morfológicos en estos cuatro grandes núcleos celulares del cerebro. Encontró una correlación con deficiencias de navegación desarrolladas progresivamente con la edad, de tal manera que el rendimiento bajaba un 8% a los 12 meses de edad, el 45% a los 18 meses de edad, el 53% a los 24 meses de edad, y más del 90% a los 30 meses en estas ratas,. Sus resultados, pues, indicaban que los cambios degenerativos y / o atróficos en el sistema colinérgico del cerebro anterior y el declive en la capacidad de aprendizaje espacial son procesos paralelos durante el envejecimiento. Aunque la magnitud de los cambios morfológicos no parece ser sustancialmente suficientes, por sí mismo, para explicar las graves deficiencias de aprendizaje espacial que se desarrollan en los animales más

viejos, los datos son consistentes con la opinión de que el deterioro de la función en el sistema colinérgico del cerebro anterior puede contribuir al deterioro cognitivo dependiente de la edad en los roedores (73).

La memoria y el aprendizaje espacial así como el reconocimiento visual de señales son tareas que se ponen a prueba en este test. Las estructuras cerebrales relacionadas son el córtex prefrontal y el hipocampo, ambos conectados con los núcleos hipotalámicos mamilar medial y supramamilar, también involucrados en procesos de memoria espacial.

1.4.3 Reversión de aprendizaje

Relacionado con el déficit en el córtex prefrontal medial cuya principal manifestación es la flexibilidad cognitiva (274), es decir la capacidad de inhibir respuestas aprendidas previamente (275). Actúa involucrando a sus centros de las regiones prelímbicas e infralímbicas (276,277) el córtex prefrontal y el hipocampo (278), cuerpo estriado y área ventral tegmental parte de sistema dopaminérgico.

1.4.4 Reconocimiento social y memoria social

Prueba de reconocimiento social. El procedimiento del reconocimiento social lo introdujeron Holloway y Thor (279) y posteriormente fue desarrollado por Robert Dantzer et al (280) para estudiar la regulación de neuropéptidos sobre el comportamiento y la memoria en ratas (109,281,282) y ratones. La prueba de reconocimiento social se centra en el grado de familiaridad entre dos individuos. Involucra principalmente a la memoria olfativa además de la visual y táctil.

El sistema olfatorio en los animales como la rata, lejos de ser un sistema primitivo de relación, se revela como un sistema funcional complejo con conexiones muy directas con áreas cerebrales como estructuras límbicas y el córtex prefrontal. Estudios funcionales muestran como las ratas muestran una gran eficiencia en el aprendizaje cuando el estímulo es olfatorio rivalizando incluso con primates en complejidad de tareas (283). Lo consideramos por tanto una herramienta importante en el desarrollo de nuestra investigación ya que se trata de una prueba con alto componente motivacional para los animales, de tal modo que incluso con la apatía propia de los animales viejos que les desanima a realizar cualquier tarea, realizan esta con gran porcentaje de superación.

Esta prueba detectar alteraciones en la memoria para las que otras pruebas serían insensibles (279).

1.4.5 Conducta exploratoria.

La conducta exploratoria de los animales es una conducta no aprendida y espontánea e instintiva. Se alcanza evolutivamente por la selección natural al favorecerse la búsqueda de alimento, cobijo, congéneres y detección de peligros etc. Es por tanto una conducta deseable que no obstante debe estar equilibrada con las conductas de prudencia y de miedo que les permite desenvolverse como presa en el medio natural.

En el envejecimiento con declive cognitivo desaparece la motivación por lo novedoso y además aparece una exacerbación de la ansiedad que se opone a su manifestación. Por tanto los parámetros que cuantifiquen esta conducta nos dan una aproximación del declive neurológico. No obstante debe ser considerado junto con los parámetros que valoran la ansiedad y la capacidad locomotora, ya que en nuestros test, su expresión interrelaciona unas con otras.

Así los datos extraídos del campo abierto principalmente se pueden analizar para estudiar este parámetro (284).

Los valores que mejor se pueden utilizar como referentes de la conducta exploratoria son:

La distancia recorrida en un periodo de tiempo establecido que dará una medida comparativa de la actitud exploratoria normal y deteriorada de los animales.

Conductas que se interpretan como normales en animales sin deterioro físico ni cognitivo. Consideramos y cuantificamos el número de incorporaciones (rearing) que realizan durante la prueba.

1.4.6 Ansiedad.

Existen numerosas pruebas específicas para evaluar la ansiedad en modelos animales. Se utilizan en farmacología y toxicología y se basan en la capacidad de los animales a presentar determinadas conductas en estado de miedo o sin él. Pueden ser situaciones o contextos como por ej. Laberinto elevado en cruz, Interacción social, Caja I/O, o Natación forzada u otros que involucran conflicto condicionado, como por ejemplo el Test de conflicto de Geller-Seifter o el Test de conflicto de Vogel. Todos ellos son muy sensibles y específicos y distinguen entre fármacos ansiolíticos o alteraciones nerviosas provocadas con un nivel de confianza muy estandarizado.

Las alteraciones en el comportamiento espontáneo incondicionado en respuesta a un estímulo aversivo puede sugerir alteraciones funcionales y / o estructurales en el sistema nervioso central, el sistema nervioso autónomo, eje hipotálamo-pituitario-adrenal, y / o cambios en los órganos efectores como el sistema cardiovascular, digestivo o el músculo esquelético.

Por lo tanto, evaluando determinados parámetros conductuales en test orientados hacia otros factores cognitivos como hemos visto podemos recolectar datos que nos permiten ilustrar el efecto del envejecimiento sobre la adaptación emocional a distintas situaciones y con ello la ansiedad. Se puede inferir con las pruebas del campo abierto y laberinto de Morris, la tendencia a los estados de ansiedad que se manifiesta mediante parámetros medibles extensamente estandarizados (285). Del campo abierto se pueden extraer reflejos de respuesta incondicionada (conducta motora y/o exploratoria en situaciones no familiares) (286,287,284).

Los parámetros que se pueden a evaluar son:

- La permanencia insistente en las zonas periféricas que ofrecen sensación de resguardo es un signo de estado ansioso cuantificable.
- El signo de tigmotaxis entendido como el contacto físico permanente con las paredes del laberinto.
- El espacio recorrido voluntariamente descenderá cuando la motivación exploratoria se ve coartada por estados de ansiedad por lo tanto será una medida que vincule los dos parámetros.
- La inmovilidad es otro signo de estados de miedo y ansiedad. Pero se puede combinar y confundir con un estado de baja capacidad física. Por ello mediremos las conductas como el acalamiento como signo de tranquilidad, el acalamiento puede, no obstante ser una conducta estereotipada signo de todo lo contrario ansiedad por lo que debe ser descartado cuando su número supera en mucho a la media.

Estos signos están contrapuestos a la actitud exploratoria que incitaría a los animales a desplazarse sondeando el espacio y averiguando la forma de realizar las distintas tareas (288).

Otras conductas que pueden ser interpretadas como signos de ansiedad como las deposiciones y micciones, el bloqueo motor o el intentar aislarse, poniendo la cabeza hacia una esquina o la pared y permanecer allí quieta.

1.4.7 Actividad motora.

Existen multitud de pruebas que extraen datos sobre este parámetro en la investigación del trauma espinal o esquelético, enfermedades esqueléticas o neuromotoras y su rehabilitación como son el Rotarod, Treadmill Body weight-supported treadmill, robotic assisted treadmill, voluntary wheel running, environmental enrichment, Swimming, Cycling (289,290) .

Sin embargo se puede extraer también información relevante en este aspecto mediante la observación directa de signos neuromotores anómalos así como la cuantificación de parámetros derivados de la realización de otras tareas:

- Velocidad media de natación en el laberinto acuático de Morris MWM
- Velocidad media de desplazamiento en el campo abierto OF
- Actividad global total en MWM
- Actividad global total en OF.

1.5 Modelos Animales, Envejecimiento y Suplementación.

En el estudio de las bases biológicas del envejecimiento es esencial utilizar modelos animales para determinar la multitud de procesos específicos que lo ocasionan. De ahí que existan numerosos modelos animales de envejecimiento: los que reproducen lesiones relacionadas mediante alteraciones en sus genes en modelos de Alzheimer (modelos de ratón SAM y transgénicos APP/PS1 y Thy-tau) o mediante procesos radiactivos (27).

En nuestro estudio vamos utilizar los marcadores de envejecimiento relativos a su declive neurológico: aprendizaje y memoria, conductas de ansiedad y de exploración y la capacidad física mediante su actividad motora. Utilizamos un modelo de animales naturalmente envejecidos, aunque con deterioro acelerado de las capacidades cognitivas y emocionales, para ver el efecto de la ingesta de fresas sobre estos parámetros. El modelo natural de envejecimiento nos implica la dificultad de acomodar las fases de edad en el animal a las del ser humano y sus patrones de enfermedad durante el envejecimiento (291) (292).

Existen multitud de modelos animales para el estudio de las alteraciones cognitivas desarrolladas durante el envejecimiento como ya hemos referido en capítulos anteriores (287,293,279,272,159,264,294,266,295–298,126,161,288,278,74).

Los modelos animales nos permiten evaluar los efectos y la sintomatología de las alteraciones motoras. La rata presenta una buena homología en el desarrollo de patrones motores alterados (299).

Podemos encontrar modelos de envejecimiento inducido por radiación para estudiar la prevención de efectos neurológicos del EO producido por la radiación en ratas (300). También se ha probado en ratas el efecto de la radiación a modo de proceso de envejecimiento acelerado viendo cómo afecta la dieta con fenoles (301)

Existen estudios en modelos animales que están orientados a comprender los mecanismos que combinan el envejecimiento y el efecto de la dieta sobre el rendimiento

cognitivo y su prevención mediante extractos vegetales y antioxidantes, demostrando la eficacia de la estrategia dietética en animales de hasta 18 meses (37,302,303), relacionado con su capacidad de absorción de radicales libres (ORAC), en animales de hasta 21 meses (304)

La mayoría de los estudios que inciden sobre la capacidad cognitiva, se realizan en términos de eficiencia sobre memoria espacial utilizando una evaluación de desenvolvimiento de los animales en laberintos como el laberinto acuático de Morris y el laberinto acuático de brazo radial. Ambos laberintos son paradigmas de aprendizaje espacial mediante el cual los animales están entrenados para asociar claves espaciales con la ubicación de una plataforma oculta para escapar del laberinto

Williams et al (305) reveló que el grado de rendimiento en el laberinto de acuático de Morris presentaba una buena correlación con los cambios bioquímicos y celulares producidos en el hipocampo de los animales alimentados con arándanos. Además de mejorar los déficits de memoria en los animales ancianos, tanto la suplementación con arándanos como la suplementación con fresa fueron capaces de mejorar la función cognitiva en los animales jóvenes que había sido objeto de exposición a la radiación ionizante, un método que como ya hemos visto, induce alteraciones inflamatorias y estrés oxidativo y en el cerebro de animales jóvenes, dando lugar a déficits cognitivos.

Rata Wistar Kyoto

Tradicionalmente se ha usado la cepa de rata Wistar Kyoto como control de la rata hipertensa espontánea SHR en modelos de hipertensión humana. Ambas se desarrollaron a partir de una misma cepa no consanguínea de un grupo de ratas Wistar en la universidad de Kyoto 1971. Esta relación de origen entre ambas ha justificado que se utilicen bajo el principio de estandarización y mínima variabilidad experimental; sin embargo se han publicado numerosos artículos señalando la divergencia cada vez mayor entre estas cepas debido a mutaciones, la deriva genética o causas desconocidas (306,307).

Esta cepa presenta déficits en las tareas de memoria de trabajo (working memory) espacial reflejado en un bajo rendimiento el laberinto acuático de manera que se sugiere como modelo animal de disfunción de la memoria (308).

El modelo SHR se deriva a modelo de déficit de atención y desorden de hiperactividad (309), mientras que la Wistar Kyoto expresa fenotípicamente características de conducta muy peculiares y está considerado actualmente como un modelo referente en el estudio de la depresión y la ansiedad:

Estos animales muestran especial sensibilidad al estrés manifestado respuestas de evitación pasiva rápidas, aumentadas y persistentes. Una reducida actividad de campo abierto (310), rápido desarrollo de indefensión aprendida y evitación social manifestando una inmovilidad basal temprana en el test de natación forzada, además estas conductas no mejoran con la habituación y el manejo continuado desde la infancia como ocurre con otras cepas (311).

También aparecen anomalías hormonales asociadas con las de conducta como unas glándulas adrenales aumentadas y una tendencia a producir elevados

niveles de cortisol plasmático, mas elevados cuanto más intensa es la manifestación de la conducta ansiosa.

Al estudiar los parámetros de ansiedad llevados a cabo para la caracterización de la cepa con objeto de obtener un buen modelo animal de estrés y ansiedad, han revelado una variabilidad intrínseca muy importante hasta tal punto que se pueden describir subcepas en base a la respuesta ansiosa ante los distintos test y la respuesta a los medicamentos antidepresivos (312).

Esta mayor y especial sensibilidad de rata Wistar Kyoto al estrés parece estar relacionada con una mayor actividad acetilcolinesterasa en el núcleo basal magnocelular (NBM) y el córtex prefrontal sugiriendo un sistema colinérgico anormal en esa cepa. Esto se traduce en la expresión de un comportamiento ansioso y estado de hipervigilancia (313) característico de determinadas formas de ansiedad y esquizofrenia (314). Se observa inhibición de conductas naturales consistente en descenso de la actividad e inactividad ante desafíos nuevos, sociales o no sociales. (313), indefensión aprendida y evitación social (311) y rápido condicionamiento clásico e instrumental (315).

Existen pruebas bastante contrastadas de diferencias en el declive cognitivo relacionado con la edad entre distintas cepas de ratas (316).

Todas las ratas muestran un déficit en el aprendizaje y la memoria cuando envejecen, sin embargo unos pocos estudios han examinado esta evolución en múltiples cepas y comprobar sus diferencias. Al contrastar el aprendizaje de la tarea en el laberinto acuático de Morris, comparando 3 cepas diferentes: Sprague.Dawley (SD), ratas hipertensivas espontaneas (SHR) y Wistar Kyoto (WKY) se verifico que la evolución del empeoramiento difería entre ellas. SHR mostraba un deterioro significativo mas precoz (12 meses) que las otras dos, SHR junto con WKY mostraron una tendencia al déficit ya a los 3 meses, que no fue alcanzada por las SD hasta los 12 meses Aunque todas estaban moderadamente perjudicadas a los 18 y severamente a los 24 meses la cepa SD siempre obtenía mejor rendimiento de memoria que la WKY (316).

Objetivos

2 Objetivos

Este estudio tiene como objetivo principal analizar el efecto de la suplementación con fresas de la variedad camarosa, sobre los cambios neurodegenerativos relacionados con el envejecimiento y se encuentra asociado a un estudio de evaluación hepática con la que compartimos sus grupos experimentales y modelo dietético, con el objetivo de correlacionar ambos estudios y determinar la influencia hepática en el envejecimiento del sistema nervioso.

Caracterizar esta cepa, para los parámetros de envejecimiento propuestos y con las pruebas propuestas, para lo que se va a realizar un estudio evolutivo para esta especie y cepa que nos indique como varían los resultados obtenidos a lo largo de las distintas edades.

Determinar si la suplementación con fresa bajo las condiciones del experimento principal produce mejoras en el deterioro cognitivo y físico de este grupo experimental.

Analizar el efecto de suplementación dietética, reproduciendo los hábitos alimenticios de la población media, admitiendo la variabilidad propia de este principio; la debida tanto a las circunstancias propias de fruto, variabilidad por la estacionalidad, procesos de cosecha, distribución y almacenaje, como a la variabilidad de las actitudes individuales ante ingesta, la regularidad y la cantidad que se toma voluntariamente, y la variabilidad genética e individual de las ratas sujetos de estudio.

Compararemos los animales con sus propios resultados antes y después de la dieta suplementada con fresa y compararemos cómo evoluciona el declive propio del envejecimiento de animales que se han suplementado con fresa y los que no.

Como principales marcadores de envejecimiento, estudiamos:

El grado de déficit cognitivo incluyendo, memoria, la capacidad adaptación desde el punto de vista emocional o resistencia al estrés.

La motilidad y capacidad física motora.

Para ello realizamos una batería de pruebas general pero extensa que intentará captar de manera general cualquier aspecto que pueda verse influenciado por la ingesta de fresas durante el envejecimiento a modo de estudio piloto.

Material y métodos

3 Material y Métodos

3.1 Material

3.1.1 Animales

Se utilizan dos lotes de ratas de la cepa Wistar Kyoto. Merced al principio de reducción que compromete a la ética en experimentación animal, se aprovechan los animales de otro estudio morfológico y metabólico que relaciona la suplementación con fresas con la mejora morfofuncional del hígado, para adquirir los datos necesarios de este estudio.

El estudio hepático original se divide en dos partes distintas.

El primero, realizado con 63 animales al que denominaremos Estudio A, de edades comprendidas entre 15 y 28 meses; son un grupo experimental diseñado para un estudio del efecto de la dieta con fresas sobre el metabolismo hepático y regeneración hepáticas en animales ya envejecidos.

Se utilizan estos animales, en este estudio de comportamiento complementario, adaptándose al diseño y los lotes de la experimentación principal, por ello se agrupan como se describe mas abajo.

En este grupo los animales están divididos en subgrupos de animales con la misma edad. La diferencia de edades entre los subgrupos es de aproximadamente 1 mes.

El segundo lote, al que denominaremos Estudio B de unos 15 animales se aprovechan también de otro estudio de degeneración hepática con otro diseño experimental en el que cambian los lotes y otros plazos de tratamiento. En este grupo todos los animales tienen la misma edad, comienzan el experimento desde jóvenes (4 meses) y se les mantiene hasta la vejez (24 meses) cuando se analizan sus parámetros morfológicos y bioquímicos hepáticos. Nuestro análisis sobre conducta termina a la edad de 15 meses.

Se estabula a los animales individualmente durante el periodo de tratamiento y evaluación, su régimen de luz oscuridad es 12/12 h. Se les proporciona dieta ad libitum.

Todos los procedimientos se realizan bajo las directrices de la legislación vigente y con el informe favorable del Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga.

Debido a la avanzada edad y las afecciones de la cepa utilizada se aplica un protocolo de supervisión con el que se asegura la detección temprana de signos de envejecimiento graves e incompatibles con el bienestar de los animales. Durante el periodo de experimentación se descartan aquellos animales que manifiestan alguna alteración que sea considerada incompatible con las tareas que deben realizar.

3.1.2 Dieta

Dieta habitual

La dieta es de composición estándar para mantenimiento de animales de estas características (Safe A04). El nombre y composición quedan reflejados en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición dieta

SAFE A04			
COMPOSICIÓN	(en %)	PROMEDIO	SD
Agua	(en %)	11,9	0,9
Proteínas	(en %)	16,1	0,6
Lípidos	(en %)	3,1	0,3
Glúcidos E.N.A	(en %)	60	1,3
Parte de almidón	(en %)	45,8	3,6
Parte de azúcares totales		2	0,6
Celulosa (WEENDE)	(en %)	3,9	0,5
Hemicelulosa	(en %)		
Celulosa verdadera	(en %)		
Lignina	(en %)		
Minerales totales	(en%)	5,1	0,4
Parte de calcio	(en mg/kg)	8400	800
Parte de fósforo	(en mg/kg)	5700	400
Parte de sodio	(en mg/kg)	2500	300
Parte de potasio	(en mg/kg)	6400	600
Parte de manganeso	(en mg/kg)	70	9
Parte de cobre	(en mg/kg)	17	3
Vitamina A	(en UI/kg)	6600	1100
Vitamina D3	(en UI/kg)	1000	400
Vitamina E	(en mg/kg)	30	10
Vitamina B1	(en mg/kg)	7	
Vitamina B2	(en mg/kg)	6,5	
Vitamina B6	(en mg/kg)	2,6	
Vitamina B12	(en mg/kg)	0,02	
Vitamina K3	(en mg/kg)	2,5	
Vitamina PP	(en mg/kg)	75	
Ácido Fólico	(en mg/kg)	0,5	
Biotina	(en mg/kg)	0,04	
Colina	(en mg/kg)	1600	
Arginina	(en mg/kg)	9800	
Cistina	(en mg/kg)	2300	
Lisina	(en mg/kg)	7700	
Metionina	(en mg/kg)	2800	
Triptófano	(en mg/kg)	1900	
Glicina	(en mg/kg)	8100	

Suplementación dietética.

Sometemos a los animales a un periodo de ayunas no superior a 6 h tras lo cual se ofrece a los animales fresa fresca almacenada en nevera de 2 a 7 días, en cantidades que oscilan entre 4 y 15 gramos. La ingesta es voluntaria y después de un periodo de 30 minutos se retira y pesa la cantidad sobrante. De estudios anteriores se conoce que suelen ingerir voluntariamente un promedio de 6,55 g de fresa por animal y día.

A esta cantidad de fresas se le puede calcular un equivalente promedio de actividad antioxidante ORAC de 100,06 mmol equivalentes Trolox

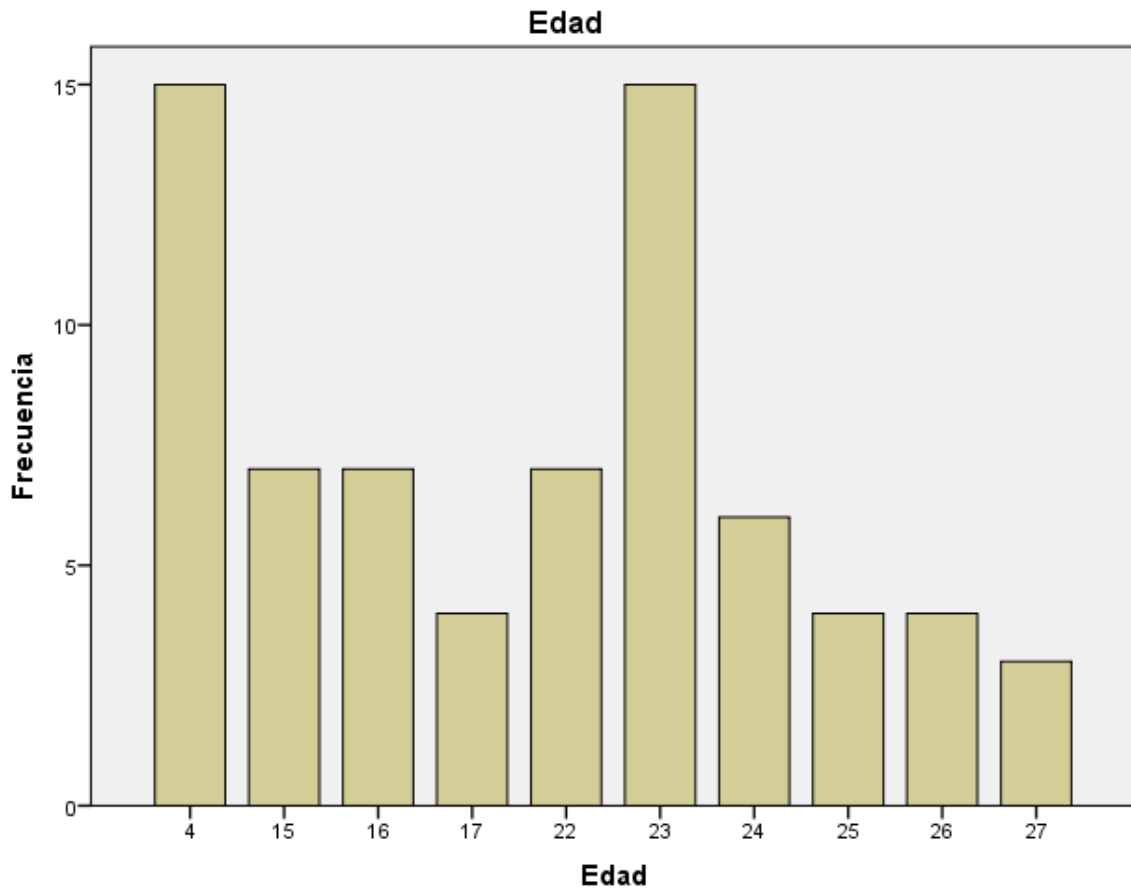
3.1.3 Grupos

Estudio A. En este estudio utilizamos un lote de 63 animales de distintas edades aproximadamente correlativas existen entre 4 y 9 animales por grupo y entre ellos se mantienen entre uno y tres animales (entre un 25% y 33%) que serán controles, a los que no se le aplica tratamiento.

Los animales están divididos por lotes que corresponden a los rangos de edad en los que empezaron el experimento entre 15 y 28 meses.

Tabla 3. Grupos Estudio A

GRUPO	Nº de animales	Nº de animales control	Edad MESES	Periodo entre pruebas
G1	9	2	15	2 meses
G2	8	2	16	2 meses
G3	4	1	17	2 meses
G4	9	2	22	2 meses
G5	15	6	23	2 meses
G6	6	1	25	2 meses
G7	8	2	26	2 meses
G8	4	1	28	2 meses



Estudio B. Este grupo consta de 15 animales, que comienzan el ensayo a la edad de 4 meses. Los datos obtenidos de este grupo a esta edad de 4 meses, mediante todas las mismas pruebas que se realizaron en el grupo A, se consideran como valores referencia de animales con déficit neurológico cero; nos servirá de referencia en la caracterización del envejecimiento de la cepa.

Se les aplicó el tratamiento con el suplemento de dieta con fresas durante una temporada de cosecha; 2 meses en total. Este grupo se analizó después de 1 año.

Tabla 4. Grupos Estudio B

GRUPO	N ^a	Rango	Edad comienzo (meses)	Tiempo de experimentación
BASAL tratado	8	4-15	4	12 meses
BASAL control	7	4-15	4	12 meses

3.1.4 Análisis de grupos

3.1.4.1 Estudio de Caracterización

Se realiza un estudio para caracterizar (fenotipado) el declive cognitivo natural con el envejecimiento en esta cepa, en el que se registra y analiza cómo se van modificando los resultados obtenidos en las pruebas en las distintas edades de los lotes sometidos a estudio. Los resultados de todas las pruebas realizadas a los animales en la fase previa a la suplementación nos van a ofrecer una idea de cómo va evolucionando el estado cognitivo, físico y emocional a lo largo del envejecimiento en esta cepa en concreto.

Para este estudio utilizamos todos los resultados, previos al tratamiento con fresas, obtenidos en todos los animales de todos los grupos.

El criterio de agrupación es animales que coincidan en la misma edad en el momento del ensayo.

Podemos determinar una medida de declive por envejecimiento al comparar los resultados de todos los rangos de edad con el obtenido por el grupo de animales de 4 meses, al que consideramos grupo basal con déficit 0.

3.1.4.2 Estudio A

Los lotes de distintas edades en el momento de los ensayos se coordinan para que los valores presuplementación, y que vamos a denominar basales de cada animal, sirvan como valor control para esa franja de edad, comparado con el lote de menor edad. Luego se realiza una valoración postratamiento. Con esta estrategia se pretende enfrentar estadísticamente las evoluciones de las poblaciones y de los individuos para potenciar la significación de las posibles variaciones o mejoras de la dieta en la población tratada sobre la no tratada y en el individuo antes del tratamiento y después de éste:

1 Los resultados post dieta de cada grupo se enfrentan a los resultados obtenidos sobre sus propios valores medios, previos a la toma de dieta.

Estas comparaciones deben ser evaluadas con prudencia para sacar conclusiones, pues si se detecta una mejora en la realización de las tareas enfrentando estos datos no significa efectividad del tratamiento, si no del proceso de la habituación y recuerdo del animal de la realización de la tarea en un momento anterior.

2 Los resultados post dieta de cada grupo se enfrentan a los resultados de los animales controles de la misma franja de edad que no han recibido dieta, con la intención de comprobar la existencia y en su caso, el valor del perfeccionamiento en la realización de la tarea que, como consecuencia del manejo más prolongado y la repetición de las pruebas por parte de los animales puede proporcionar a los datos. Esta mejora como se ha apuntado antes, no está relacionada con el tratamiento en sí, sino con el proceso de aprendizaje y habituación de los animales, pero nos da idea de si el grupo tratado aprende más o menos que el control al repetirle la prueba.

3 Los resultados en la fase post dieta de los animales controles y suplementados con fresa se analizan mediante regresión a través de todas las edades de los animales del estudio estudiando la evolución de estos. Esta estrategia nos permite una visión mas amplia del envejecimiento con la suplementación de fresas y detectar algún deterioro consecuencia del envejecimiento que pueda manifestar irreversibilidad.



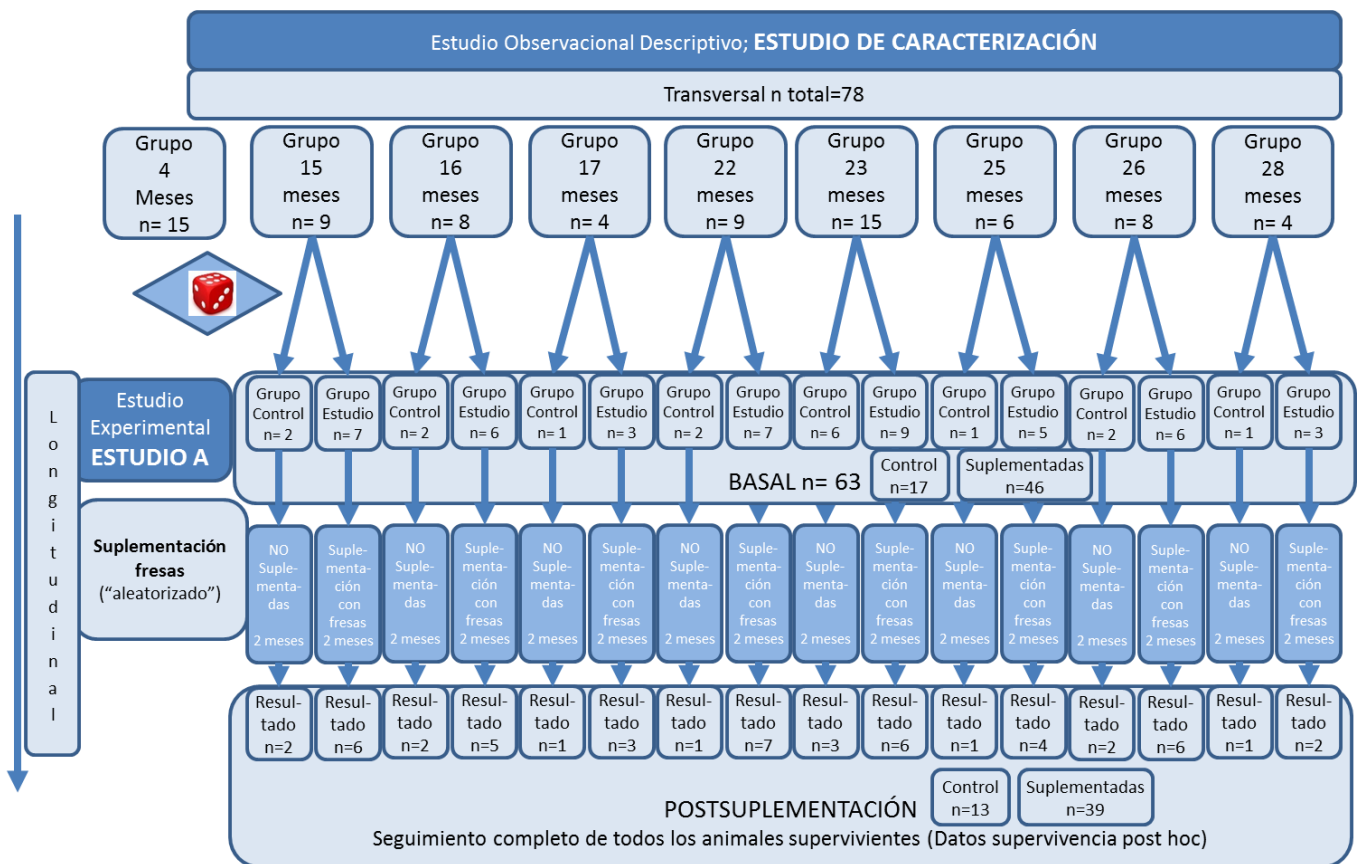


Tabla 5. Enfrentamiento datos entre grupos (ejemplo)

GRUPO	NUMERO de animales	RANGO DE EDAD (meses)	TIPO TRATAMIENTO	Enfrentamiento Postsuplementación	Resultados previstos.
G7	6 sup 2 control	26-28	Dieta con fresa	ANOVA multivariante Animales control del G7	MEJORIAS POSTRATAMIENTO (o mantenimiento de los mismos rendimientos previos)
				ANOVA multivariante Sobre sí mismo PRETRATAMIENTO	MEJORIA DEL RENDIMIENTO
G6	5 sup 1 control	25-27	Dieta con fresa	ANOVA multivariante Animales control del G6	MEJORIAS POSTRATAMIENTO (o mantenimiento de los mismos rendimientos previos)
				ANOVA multivariante Sobre sí mismo PRETRATAMIENTO	MEJORIA DEL RENDIMIENTO

Grupo	Área de observación	Fase de observación	Enfrentamiento de datos Vs	
Todos	Momento anterior y posterior a la suplementación de cada grupo de edad.	Basal Caracterización	Animales de distintas edades	Animales de edades mayores y menores
		Postsuplementación	Animales antes de suplementación.	Animales suplementados
		Postsuplementación	Animales control.	Animales suplementados

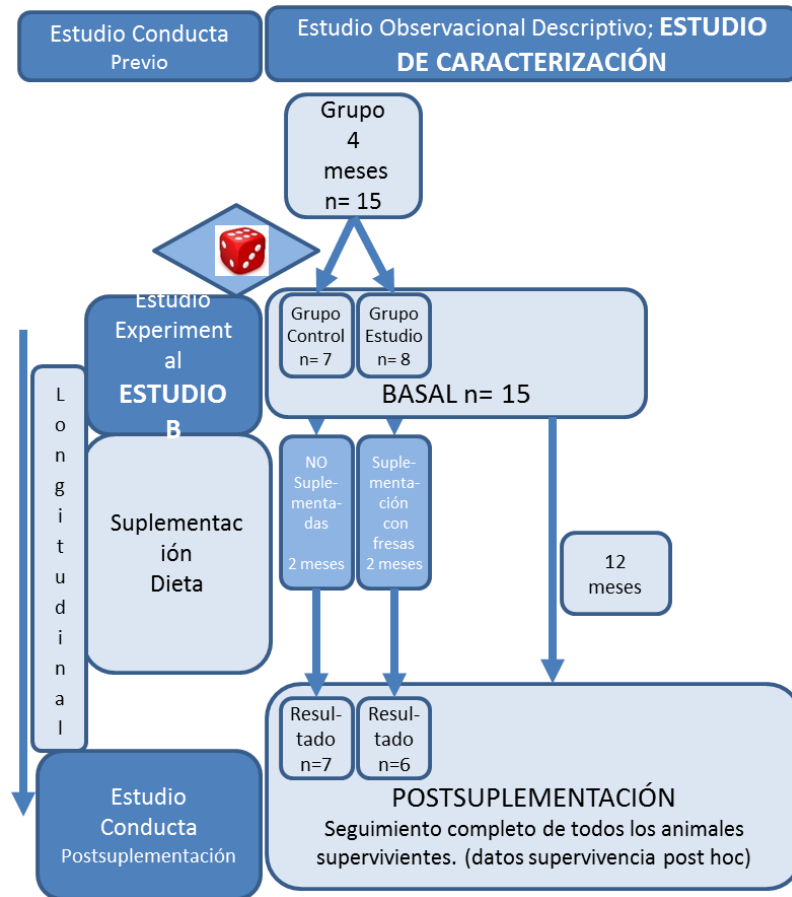
Evolución con la edad.

Grupo	Área de observación	Fase de observación	Enfrentamiento Vs	
Todos	Momento posterior a la suplementación. Rango de edad	Postsuplementación	Animales no suplementados.	Animales suplementados

GRUPO	NUMERO animales	RANGO EDAD (meses)	TIPO TRATAMIENTO	Enfrentamiento Vs	Resultados previstos
Todos	46	17-30	Suplementados Dieta con fresa	Suplementados * Edad Regresión	Mantenimiento de las capacidades.
Todos	17	17-30	CONTROL	Controles * Edad Regresión	Declive general
Todos	63	17-30	Suplementados + CONTROL	Suplementados *Controles * Edad Regresión	Mejora de los animales suplementados sobre los controles.

3.1.4.3 Estudio B

Los animales de este grupo comienzan el estudio en edad muy temprana 4 meses, toman el tratamiento mas jóvenes y se comparan los resultados obtenidos en las pruebas antes y después de la toma de fresas los sin implementación dietética con los tratados.



GRUPO	NUMERO animales	RANGO DE EDAD (meses)	TIPO TRATAMIENTO	Enfrentamiento 1 Pretratamiento	Resultados previstos (H1)	Enfrentamiento 2 Postratamiento	Resultados previstos (H1)
Basal tratado	8	4-15	Dieta con fresa	Grupo BASAL (fenotipado)	Sin declive	BASAL CONTROL	MEJORIAS POSTRATAMIENTO (mantenimiento de los mismos rendimientos previos que no deben aparecer en control)
Basal control	7	4-15	Sin dieta	Grupo BASAL (fenotipado)	Sin declive	BASAL TRATADOS	Declive cognitivo y físico acorde con la edad



3.1.5 Equipos

Campo abierto consistente en una estructura cuadrada de 104 x104 cm de suelo cerrada por paredes de 90 cm de alto. Realizado en madera forrada e impermeabilizada con formica de color gris.

Laberinto acuático de Morris, consistente en una piscina circular de 104 cm de diámetro y 60 cm de profundidad. El nivel de agua llega hasta 10 cm del borde. La plataforma de escape tiene 11 cm de diámetro.

Jaula de estabulación para estudio de conducta social; 1354G Eurostandard tipo IV de Tecniplast. De medidas 595 x 380 x 200 mm con una superficie de suelo 1820 cm² fabricada en policarbonato.

Sistema de análisis de actividad conductas y recorridos de animales de experimentación, Smart 3.0.

Kit de evaluación neurológica: pincel suave, palillos, bastoncillos de algodón, soplador canulado, solución de amoníaco, tabla inclinable con superficie porosa de corcho para el test de equilibrio, plataforma estrecha (10 cm x 60 cm) de madera para el test 2 de equilibrio, alambre de 2 mm para test de agarre y agarre forzado, "Plantar test" de Ugo Basile® para la prueba de hot plate.

3.2 Método

3.2.1 Estrategia dietética

El protocolo de suplementación dietética se ha diseñado en base a cómo se puede instaurar la misma, por una persona media como hábito alimenticio que requiera pocas modificaciones. De tal manera que sea fácilmente asequible facilitando su difusión por la población. Por tanto contempla todas las variaciones que se pueden dar en la vida real conforme a las costumbres y recursos alimenticios al alcance del ciudadano medio: estacionalidad, variación en el suministro, consumos regulares pero dentro de un margen de error, variaciones en la concentración de nutrientes debidas a factores del producto como cosecha, y almacenamiento, etc.

Este estudio se fundamenta en los resultados previos obtenidos de estudios con humanos (datos no publicados). En la metodología de dichos estudios se intenta beneficiar de las particulares condiciones digestivas del periodo de ayuno vigilia posterior al sueño donde el pH y la absorción exclusiva, permiten una mejor extracción y disposición de los elementos nutrientes de los que buscamos su efecto.

Por tanto se ofrece en ayunas con el fin de aprovechar la máxima acción de los ácidos sobre todos los elementos de la fruta para conseguir la liberación completa de todos ellos, también consigue de forma paralela una predisposición a tomar una mayor cantidad de fresa por la ausencia de alimento durante las horas previas.

En el caso de los roedores nos encontramos que tienen un ciclo circadiano opuesto al nuestro, con el periodo de actividad, y por tanto la mayor parte de la ingesta en la escotofase (periodo de oscuridad) mientras que el periodo de descanso, con una menor ingesta se produce en la fotofase (periodo de luz).

Bronson demostró que la mayor parte de la comida ingerida durante la noche se vaciaba del estómago entre 6 h posteriores de ayuno en la fotofase y del intestino delgado en 14 h después (317)

Además por sus características metabólicas son animales muy sensibles a sufrir malestar o incluso alteraciones metabólicas, de conducta u hormonales tras periodos prolongados de ayuno. Por lo tanto ha sido necesario adaptar el protocolo a estas características de los animales, las premisas son principalmente conseguir un vaciamiento máximo del contenido estomacal para no mezclar la fresa con la dieta habitual, conseguir una máxima acidificación durante la digestión intestinal de la fresa, no alterar el bienestar ni provocar cambios en los parámetros metabólicos que pudieran afectar los resultados científicos.

La práctica de proporcionar la suplementación ad libitum tiene la ventaja de no provocar estrés al animal y consigue, gracias a la palatabilidad del alimento consumos aceptables, para estudiar el efecto producido.

Por lo tanto el protocolo consiste en someter a los animales a un periodo de ayuno de entre 5 y 7 horas en la fase de luz y por tanto en el periodo de menor ingesta tras lo cual se les ofrece a los animales de 4 a 15 g de fresa fresca, se pesa la cantidad ingerida y se registra, se les deja 45 minutos tras lo cual se pone al alcance su dieta habitual hasta 24 h mas tarde incluido el periodo nocturno.

3.2.2 Programa.

Cada animal realiza la batería de pruebas de conducta después de un periodo de adaptación a las condiciones de estabulación de al menos 15 días. Tras ello se comienza con la suplementación de fresa del modo referido en el punto anterior durante un periodo de 60 días. A partir del periodo de 2 meses durante el cual los animales han sido suplementados con la fresa, se vuelven a repetir las pruebas y se procesan los animales para obtención y análisis de tejidos.

Las pruebas son realizadas en batería continua empezando por las consideradas menos aversivas a las que suponen mayor desgaste físico y emocional. Se procede a una fase previa de habituación, primero al experimentador, segundo a la sala y por último al equipo antes de cada lote de ensayos. Los ensayos tienen lugar entre las 12:00 y las 18:00. Se realizan las dos baterías de pruebas antes del tratamiento, según los distintos grupos se analizan 8, 13 y 51 semanas después de comenzar el tratamiento con suplementación de fresa.

Se comparan los resultados previos y posteriores del mismo grupo de animales y sobre un pequeño grupo control, con lo que detecta y podemos discriminar el efecto de mejora en la realización de las tareas enfrentando estos datos que no significa efectividad del tratamiento si no debido a la habituación y recuerdo del animal de la realización de la tarea en un momento anterior (318).

3.2.3 Evaluación Neurológica.

Para evaluar la función neurológica, la coordinación de las extremidades y la orientación sensitivomotora de los animales, se someten a una batería de pruebas tomadas de Marshall y Teitelbaum (1974) (256), modificada por Bjorklund et al. (1980) (257), y le sumamos una a una valoración de reflejos adicionales por Bures et al. (1983). Todas las ratas se habitúan a la sala donde se realizan las pruebas al menos una hora previa. Todos los resultados de las pruebas se valoran de la siguiente forma: 0 sin deterioro, 1 deterioro medio y 2 deterioro grave.

Los reflejos sensoriales que se evalúan son los siguientes:

Somestesis, en la que se aplica un pinchazo suave en seis sitios de la superficie lateral del cuerpo del animal, la combinación de niveles dorsal y ventral y colocaciones en rostral, media y caudal. Se considera positivo el reflejo del músculo cutáneo, reacciones de dolor o vocalizaciones.

Tocar las vibrisas con un cepillo de dientes que se acerca al animal desde inferior trasera para evitar el campo visual, y se roza ligeramente en contra de las vibrisas. Se considera positivo señales de reconocimiento táctil como pueden ser repliegue hacia atrás de las vibrisas, movimientos de la cabeza hacia el lado testado.

Hocico, en el que un palillo de dientes se toca con el hocico del animal; la reacción es retracción de la cabeza.

Sacudido de la cabeza, donde se coloca la rata sobre una pequeña plataforma elevada y se observa la reacción a una impulso de aire suavemente lanzado a través de un tubo de plástico delgado (diámetro interno de 1 mm) al pabellón auricular. Debe sacudir la oreja y la cabeza, no basta con que se aparte debe realizar el reflejo completo.

Reflejo corneal, en el que se sujeta al animal con una mano mientras que la córnea se estimula superficialmente con un pincel. Debe asegurarse que no se tocan las pestañas pues sería un reflejo de vía diferente y hay que distinguirlos.

Olfato, donde un pequeño hisopo de algodón humedecido en la solución de amoníaco se lleva lentamente cerca de la nariz del ratón en dirección lateral-medial; o anterior-posterior, el animal debe estar tranquilo y ausente del proceso. La reacción es sacudir la cabeza o retirarla con violencia. A veces tarda un poco más pero también lo hacen los animales mas jóvenes.

Audición o sobresalto auditivo, en el que se aplica un estímulo acústico inesperado, consiste en chascar los dedos o dar una palmada fuera del alcance visual. Si oye el chasquido de dedos no se considera dañado (0) si no oye estos y si una palmada se considera levemente perjudicado (1).

Reflejos motores y coordinación:

El reflejo de enderezamiento, en la que el animal se coloca sobre el dorso en una superficie plana, y se mide el tiempo que el animal se pone derecho. Debe ser inmediato.

Prueba de agarre (grasping), en la que la rata se mantiene en posición vertical y las palmas de las patas delanteras se tocan ligeramente con un alambre rígido (diámetro de 2 mm); es positivo el agarre rápido, si alguna de las extremidades tarda en agarrar o no lo hace tras varios intentos se considera negativo.

Pruebas de equilibrio, en la que la rata se coloca hacia abajo sobre una plataforma inclinada 30°, se considera positivo dirigirse hacia arriba, se puede hacer inclinación paulatina de la tabla para provocar el reflejo. La segunda parte se coloca finalmente en una barra de madera horizontal (diámetro: 10 cm, longitud: 60 cm) suspendida 50 cm por encima del piso, y se evalúa su capacidad de permanecer y caminar por la barra; se puede empujar levemente en los dos sentidos para ver la capacidad de reacción. Las caídas se consideran como negativo.

Reflejos posturales o reacciones de colocación, el animal se restringe en el borde de la mesa con una extremidad libre sobre este borde, se evalúa la capacidad de las cuatro patas, delanteras y traseras de detectar su posición sin ver y ser capaz de colocarla encima de la mesa.

La fortaleza neuromuscular se evalúa con la prueba de agarre forzado, en el que se deja al animal que se agarre a un alambre horizontal a cierta altura con sus patas delanteras y se cronometra el tiempo que tarda en soltarse.

La sensibilidad nociceptiva se evalúa con la prueba hot plate, en la que se sitúa el animal en reposo sobre una superficie transparente y bajo ella a la altura plantar de sus extremidades anteriores y luego posteriores se aplica una fuente de calor infrarrojo. Se cronometra el tiempo que el animal tarda en retirar cada una de las patas (se realiza la prueba dos veces: una delantera y una trasera).

3.2.4 Pruebas de conducta

3.2.4.1 Laberinto acuático

En esta prueba evaluamos tanto la **memoria espacial como la capacidad motora** de los individuos.

Nuestro laberinto consiste en una piscina circular de 149 cm de diámetro que contiene agua a 21-22° C. La altura hasta el borde del tanque de agua es de 10 cm. La iluminación de la habitación en la zona del laberinto Morris es 20 a 25 lux de forma indirecta y se mantiene un ruido ambiente blanco de fondo (radio sin sintonizar) de 60 db. En las paredes de la habitación se mantienen señales extralaberínticas durante todo el grupo de ensayos.

Se introduce el animal en el agua en 7 días sucesivos en los que tendrá que realizar la tarea de búsqueda y de memorización de la situación de una plataforma sumergida a 4 cm y de 11 cm de diámetro.

El día 1 de habituación. Se habitúa al animal al ambiente de la habitación durante 4 h de permanencia y al baño en la piscina durante dos baños libres de 60 segundos.

El 2º día se introduce la plataforma de escape en los cuatro cuadrantes y a la vista por encima del nivel del agua con el objeto de comprobar la capacidad visual del animal y que aprenda el mecanismo de la tarea que va a tener que desarrollar en días sucesivos.

El 3º al 6º días se realiza el proceso de aprendizaje 4 ensayos en los que cada día se ejecutan 4 intentos en los que se introduce al animal en un cuadrante distinto como posición de salida y se le deja buscar la plataforma durante un minuto. Se determina el tiempo o latencia de escape en el momento que encuentra la plataforma. Si no la encuentra en este tiempo se lo dirige hacia ella y se lo mantiene allí subido por espacio de 15 segundos.

El último día se cambia la plataforma de cuadrante y se realizan los cuatro intentos más como prueba de la capacidad de reversión de la tarea aprendida y la capacidad de reubicar la nueva situación de la plataforma, prueba de extinción.

Mediante el sistema de registro de movimientos Smart®, se van a registrar los siguientes parámetros:

Memoria espacial.

- Latencia de escape o tiempo empleado por los animales en encontrar la plataforma en los cuatro intentos del último día de ensayo (ensayo 4). Se utiliza las medianas de estos tiempos.

- Espacio recorrido hasta escapar en el último día de ensayo (ensayo 4). Se utiliza las medianas de estos tiempos.

• Estrategia de búsqueda de la plataforma de escape. Se registra en los cuatro ensayos y se estudia la evolución durante el aprendizaje. Establecemos dos tipos de estrategia extraído de Janus, Brodi y Holtzman (296,319):

A) Estrategias sistemáticas, pero no espaciales. Búsqueda al azar que implica a los animales que recorren el laberinto sin un patrón intentando encontrar la plataforma abarcando el mayor espacio posible con trayectorias al azar (RAND) o en pequeños círculos repetitivos muy cerrados cambiando cada vez de dirección para encontrar la plataforma de escape (CIRC), o trayectos encadenados paralelos al borde, a una distancia superior a 15 cm de la periferia. (CHAI). También podemos observar búsqueda mas selectiva sobre una zona mas o menos concreta pero abarcando mas de un cuadrante (SEAR), focal incorrecta en la que el animal se centra en una zona o cuadrante donde no está la plataforma (SEARFI). Son las estrategias que deben ejecutar en los primeros ensayos cuando no han completado el proceso de aprendizaje Estas estrategias debe hacerse cada vez menos frecuentes durante el proceso de aprendizaje

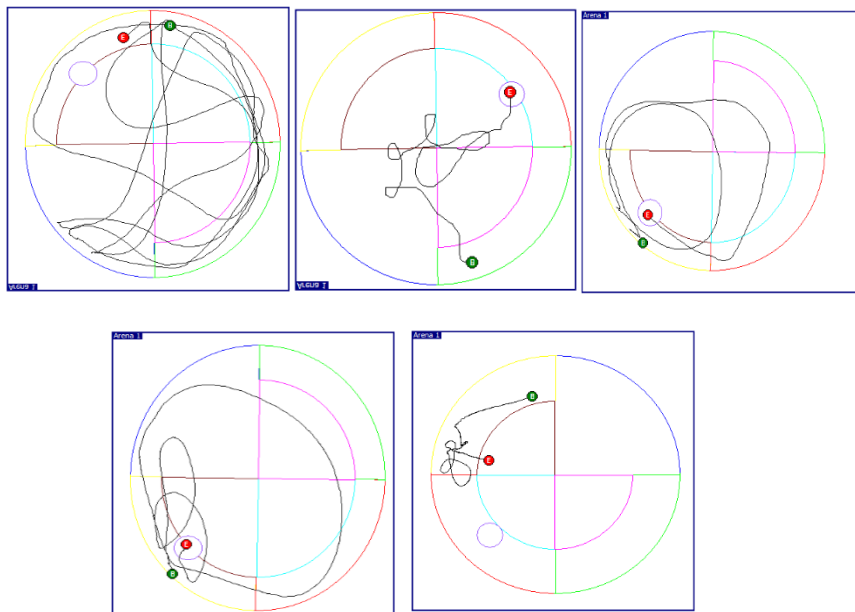


Ilustración 1. Estrategias sistemáticas: al azar (RAND), círculos repetitivos (CIRC), vueltas encadenadas (CHAI), búsqueda concreta (SEAR), búsqueda focal incorrecta (SEARFI),

También veremos estrategias mas repetitivas de patrón circular: trayectorias periféricas (PERI) siempre cercano a la periferia inferior a 15 cm o insistentemente pegados al borde de la piscina lo que interpretaremos como un signo de tigmotaxis, que relacionaremos con un estado de ansiedad.

B) Estrategias memorísticas o espaciales donde el animal utiliza la memoria espacial con apoyo de las señales extra laberínticas para encontrar la salida. Pueden describir: un trayecto directo (SPAD) si el animal se dirige directamente a la plataforma o indirecto (SPAI), si toma otra dirección antes de situarse. Estrategia focal correcta

(SPAFC) es también considerada espacial, el animal describe círculos en busca sobre el cuadrante donde está la plataforma.

Para concluir que se produce un aprendizaje, la evolución de estas estrategias durante el aprendizaje debe ajustarse al siguiente patrón. Todos estos animales en los primeros trayectos del ensayo de extinción insisten en recorrer el cuadrante donde estaba la plataforma dando trayectos circulares en esa zona. Por lo tanto mediremos el porcentaje tiempo y la distancia que transcurren en el cuadrante de escape como otra orientación a conocer el estado de su memoria espacial.

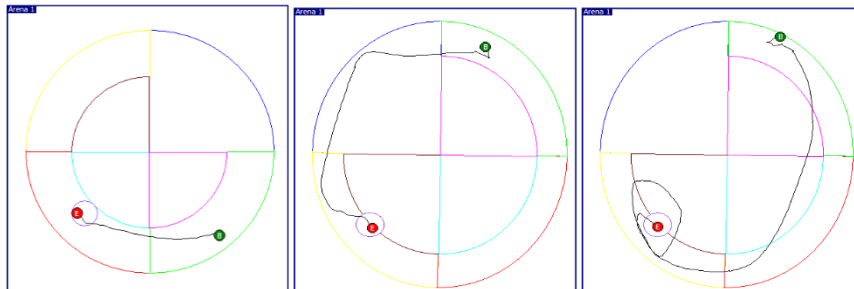


Ilustración 2. Estrategias espaciales: directa (SPAD), indirecta (SPAI), y focal correcta (SPAFC)

- El número de veces que el animal cruza el cuadrante de escape. Se registra en el primer intento del ensayo N°5.
- El tiempo que se encuentra en el cuadrante donde está la plataforma como porcentaje del tiempo total del primer intento en el ensayo N°5 o de extinción.
- El espacio recorrido en el cuadrante donde se encuentra la plataforma como porcentaje de espacio total recorrido en el primer intento del ensayo N°5 o de extinción.

Capacidad de reversión.

- En el laberinto acuático de Morris, durante el ensayo N° 5 de extinción medimos cómo evolucionan la latencia y la distancia de escape desde el primer al cuarto intento. El animal, en el primer intento busca insistentemente la plataforma de escape en el lugar aprendido, ante el error debe buscarlo nuevamente como referencia de su capacidad de revertir la tarea aprendida. Por lo tanto los tiempos y distancias de los siguientes trayectos deben disminuir. Utilizamos el tiempo del cuarto intento como medida de contraste y estudiamos la curva de tiempos en los 4 intentos.

Ansiedad.

- Permanencia en la periferia en segundos.
- Signo de tigmotaxis

Motilidad y capacidad física.

- Mediremos parámetros como velocidad media de natación, tiempo de inmovilidad (resting) y actividad total en todos los ensayos.

3.2.4.2 Prueba de reconocimiento social

En esta prueba se va a analizar la **retención de memoria a medio plazo**. Esta memoria se adquiere tanto por estímulos olfatorios como visuales, estando implicados sistemas complejos de percepción y almacenamiento. Se realiza una adaptación del test de reconocimiento social descrito por Dantzer et al. (320).

Los animales se habitúan a la habitación de pruebas durante 3 h, luego se introducen en una caja enrejada de 595 x 380 x 200 mm con su propio lecho a fin de que mantenga el mayor número de elementos familiares en su entorno. Se mantienen en este nuevo ambiente 1 h más, y después se realiza la prueba.

Durante la prueba se introduce un animal desconocido. Se trata de una hembra a la que se le ha realizado una medida de la impedancia vaginal ese mismo día para asegurar que no está en celo, por lo que no hay una motivación sexual en el comportamiento de reconocimiento y aseguramos que siempre va a adoptar una actitud sumisa, así tampoco aparecen conductas agresivas ni de dominancia. Se mantienen juntos durante 3 minutos.

Estudio de la conducta social.

Medimos el tiempo que expresa conducta social explorando al nuevo individuo hasta que lo reconoce y lo ignora. Solo se admite el tiempo que está con el hocico pegado a cualquier parte del cuerpo del individuo desconocido, no se miden las conductas de sometimiento o de lucha ni si se producen o el seguimiento del rastro por la superficie de la caja.

Hacemos otra prueba igual con el mismo individuo en los tiempos que queremos estudiar: 45 minutos, 30 minutos y 60 minutos. Medimos el tiempo de conducta exploratoria como la primera vez. El tiempo que tarda en reconocer al animal y por tanto en abandonar la conducta social debe ser inferior al anterior. Si lo iguala o supera concluimos que no recuerda al individuo.

Después de 60 minutos se vuelve a introducir un animal, en este caso distinto y nuevamente desconocido para el con idea de contrastar que repite el mismo patrón y tiempo de comportamiento que en la primera exposición novedosa.

Retención máxima de memoria social.

Todos hacen la prueba con 45 minutos de tiempo entre aprendizaje y reconocimiento; los que superen el test según los datos obtenidos pasarán a realizar la prueba de tiempo superior (60 min), y los que no la superen realizarán la prueba con un tiempo inferior. Se considerará superada (reconocimiento positivo del individuo) aquellos ensayos en los que la diferencia se tiempo manifestando la conducta exploratoria sea inferior a un – 15% del tiempo de la primera prueba. Esta segunda prueba la realizan 1 día después de la primera. Nos queda así una sucesión de pruebas en las que registramos los tiempos en los que los distintos animales recuerdan. Utilizamos el valor del máximo tiempo que el animal retiene en la memoria al individuo como valor de la prueba.

3.2.4.3 Campo abierto

En esta prueba se pretende analizar como signo conductual de envejecimiento la **capacidad motora, actitud exploratoria y la ansiedad**. Puntos íntimamente mezclados en el resultado de esta prueba, pues tanto el descenso de la capacidad neuromuscular, como de la motivación por la exploración, como un aumento de la sensibilidad ante el estrés producido por la introducción en un ambiente desconocido, van a influir por igual en los datos obtenidos de la prueba, dejando la evaluación conjunta con el resto de la pruebas para la determinación del deterioro cognitivo.

La arena es un campo cuadrado de 104 x 104 cm con paredes de 45 cm, fabricado de madera cubierta de calamina de color gris, el sonido ambiente de entre 45-50 db, y la luminosidad es de 25-30 lux de media en el centro de la arena.

Se somete a los animales a un periodo de habituación, primero a la sala 3 h el primer día, luego al campo abierto 10 m el segundo día y luego se realizan dos registros en días sucesivos de 3 m cada uno. Después de completar cada sesión individual se limpia toda la superficie del laberinto con un papel empapado en solución alcohólica al 70% y se deja secar antes del siguiente test. Los registros se realizan con el sistema informatizado de movimiento Smart® con una división virtual de la arena en 1 cuadrante periférico y uno central.

En los días de la prueba, Se introduce al animal en la caja de campo abierto, se sitúa al animal en la parte central de uno de los lados de la arena mirando hacia el panel y se le deja recorrer voluntariamente su superficie. Se registran los parámetros de interés para determinar los distintos aspectos de conducta.

Vamos a valorar los siguientes aspectos mediante los parámetros relacionados:

Capacidad motora

- Espacio recorrido en cm
- Velocidad media en cm/s
- Actividad total en durante la prueba.
- Tiempo que está en el cuadrante central.
- Signos neuromotores anómalos. Temblor en el movimiento, incoordinación al desplazarse etc.

Ansiedad:

- Número de veces que cruza al cuadrante central al menos ½ del cuerpo.
- Conductas específicas que orienten sobre el estado de ansiedad/serenidad.
- Permanencia en la zona periférica en segundos. Signos de tigmotaxis.
- N° de deyecciones.
- Episodios de aseo de la cara, del tercio posterior del cuerpo u otros (grooming).

Episodios de bloqueo en los que el animal se intenta aislar poniendo la cabeza hacia la pared o una esquina y la agacha, serán considerados de ansiedad o miedo extremo.

Actitud exploratoria:

- Espacio recorrido voluntariamente por la superficie del campo abierto.
- Episodios de incorporaciones sobre las patas traseras (rearing).

3.3 Determinación del deterioro, preservación o mejora de las capacidades cognitivas y físicas.

3.3.1 Caracterización fenotípica de declive natural con el envejecimiento (FENOTIPADO)

3.3.1.1 Declive cognitivo

Realizamos un estudio de cómo varían los parámetros asociados al declive cognitivo que vamos a medir y determinamos la correlación con la edad.

3.3.1.1.1 *Memoria:*

Realizamos un estudio de cómo evoluciona el rendimiento en las distintas pruebas a lo largo del periodo de envejecimiento en el rango de edades y periodo de tiempo en que se desarrolla la investigación. Comparamos también estos rendimientos con el valor basal de los animales más jóvenes. Obtenemos así una correlación de cómo afecta el declive cognitivo y físico al rendimiento, cuantificable en las distintas pruebas en los rangos de edad que tenemos. Para ello utilizamos las siguientes pruebas y parámetros.

- Laberinto acuático:
 - La latencia de escape de los animales en encontrar la plataforma.
 - Distancia recorrida de escape antes de encontrar la plataforma.
 - Estrategias de búsqueda de la plataforma, los animales deben utilizar las estrategias que implican memoria espacial. Se consideran animales con déficit en la memoria espacial aquellos que utilizan estrategia de búsqueda no espacial en el 4 día de ensayo. Se estudia si hay evolución en este tipo de conducta, los animales cambian su estrategia de azar a las memorísticas tras el tratamiento o las mantienen o viceversa.
 - Número de veces que cruza al cuadrante de escape
 - Porcentaje de tiempo que transcurren en el cuadrante de escape en el primer intento de la prueba de extinción (Nº 5).
 - Porcentaje de distancia que recorre en el cuadrante de escape en el primer intento de la prueba de extinción (Nº5).

- Prueba de reconocimiento social:
 - Tiempo que un animal manifiesta conducta exploratoria entre un periodo de aprendizaje y reconocimiento de 45 minutos. Si esta media excede el valor de la desviación estándar del grupo consideramos que tiene un deterioro de memoria y le repetimos la prueba con menos tiempo (30'). Si no lo hace consideramos que recuerda y lo repetimos con más tiempo (60')
 - El tiempo máximo que un animal recuerda a un nuevo compañero debe mantenerse o mejorar, mediremos la media de este tiempo en los distintos grupos.
 - Estudiamos cómo evoluciona la conducta exploratoria entre el periodo de investigación o aprendizaje del individuo y el segundo periodo en el que se le presenta el mismo animal.

3.3.1.1.2 *Capacidad de reversión.*

Consideramos que la capacidad de reversión del aprendizaje se ve afectada con el envejecimiento. Por lo tanto los tiempos y distancias de los siguientes trayectos deben disminuir de forma correlativa a la edad. Mostrarán por tanto un patrón de tiempos cada vez menos diferenciados entre el primer intento y el cuarto del ensayo de extinción los animales más viejos que los más jóvenes.

3.3.1.1.3 *Ansiedad:*

Criterios de ansiedad serán determinados por todos aquellos parámetros y todos los casos en que los animales muestren conductas propias de este estado, como por ejemplo signo de tigmotaxis en el campo abierto o en el laberinto acuático, extrema inmovilidad y defecaciones.

La actitud exploratoria normal y los episodios de aseo (GROOMING) serán signos de serenidad o adaptación correcta al nuevo ambiente.

- Campo abierto

- Porcentaje de tiempo de permanencia en la zona periférica
- Porcentaje de recorrido en la zona de periferia.
- Signo de tigmotaxis
- Conductas.
- Parámetros en laberinto acuático de Morris
 - Tiempo de permanencia en zona periférica
 - Porcentaje de recorrido en zona periférica
 - Signo de tigmotaxis

3.3.1.1.4 *Actitud exploratoria.*

Consideramos actitud exploratoria normal a un recorrido en el campo abierto (OF) que no descienda del 50% de la media de los animales jóvenes, y que muestren al menos 3 episodios de alguna de dos de las actitudes exploratorias incorporaciones (rearing) u oler.

Falta de actitud exploratoria en el campo abierto. Como poca actividad, pocas entradas en la zona central, retardo en el tiempo que tarda en empezar a explorar y actitud inhibida y aislada del laberinto (que se observe que los animales se vuelven cara a la pared o a la esquina ofreciendo la espalda al resto).

3.3.1.2 *Declive físico*

- Parámetros medidos en laberinto acuático de Morris.
 - Actividad global total en todos los ensayos.
 - Velocidad media de natación.
 - Signos neuromotores. Incoordinación o avance ineficiente en la natación serán considerados como déficit neuromotor avanzado, si este déficit afecta a su seguridad, los animales serán retirados de la prueba.
- Parámetros en campo abierto.
 - Distancia total recorrida voluntariamente en el tiempo de la prueba.
 - Actividad total realizada voluntariamente durante la prueba.
 - Velocidades medias de desplazamiento que realicen en campo abierto andando.
 - Signos de temblor de intención en los movimientos serán tomados como déficit neuromotor avanzado.

3.3.2 **Estudio del efecto dieta con fresas sobre el animal y la evolución de su envejecimiento.**

Estudio A

1 Comparamos los resultados antes y después de tomar fresas de los mismos parámetros estudiados en la caracterización de la evolución de estos con el envejecimiento de la cepa.

2 Comparamos los resultados de los mismos parámetros, entre animales que han tomado dieta y los controles del mismo grupo.

3 Comparamos los resultados de los mismos parámetros, entre animales que han tomado dieta y los que no dentro de un mismo rango de edad.

Estudio B:

Comparamos los resultados antes y después de tomar fresas en los animales con dieta y controles.



3.3.2.1 Estudio de parámetros cognitivos

3.3.2.1.1 Memoria

- Laberinto acuático de Morris
 - Latencia de escape
 - Espacio recorrido
 - Estrategias de búsqueda
 - Porcentaje de tiempo transcurrido en el cuadrante de escape.
 - Porcentaje de espacio recorrido en el cuadrante de escape.
- Reconocimiento social.
 - Conducta de reconocimiento social a 45 min
 - El tiempo máximo de retención en la memoria.

3.3.2.1.2 Ansiedad:

- Parámetros en campo abierto
 - Porcentaje de tiempo de permanencia en la zona periférica
 - Porcentaje de recorrido en la zona de periferia.
 - Signo de tigmotaxis
 - Conductas enderezamiento o aseo.
- Parámetros en laberinto acuático de Morris
 - Tiempo de permanencia en zona periférica
 - Porcentaje de recorrido en zona periférica
 - Signo de tigmotaxis

3.3.2.1.3 Capacidad de reversión.

- Diferencial de latencia de escape del primer al último intento del ensayo 5.
- Diferencial de distancia recorrida para escape del primer al último intento del ensayo 5.

3.3.2.1.4 Actitud exploratoria.

- Parámetros en campo abierto.
- Distancia recorrida voluntariamente en el lapso de tiempo de la prueba de campo abierto.
- Conducta exploratoria como incorporaciones (rearing).

3.3.2.2 Estudio de parámetros físicos.

- Parámetros medidos en laberinto acuático de Morris.
 - Distancia recorrida en el ensayo de habituación.
 - Velocidad media de natación.
 - Signos neuromotores. Incoordinación o avance ineficiente en la natación serán considerados como déficit neuromotor avanzado y los animales serán retirados de la prueba.
- Parámetros en campo abierto.
 - Distancia total recorrida en el tiempo de la prueba.
 - Velocidades medias de movimientos que realicen en los laberintos tanto acuático nadando como en el campo abierto andando.
 - Signos de temblor de intención en los movimientos serán tomados como déficit neuromotor avanzado.

3.4 Análisis estadístico

En el estudio de caracterización de la cepa, estudiaremos los parámetros para determinar la evolución de los resultados obtenidos con la edad mediante análisis de correlación.

Para estudiar el efecto de la suplementación de la fresa sobre los animales realizamos una comparación entre los resultados obtenidos previos y posteriores a la suplementación mediante análisis de varianza multivariante.

La evolución de envejecimiento de animales suplementados y controles se realiza mediante análisis de regresión lineal. Todos los análisis estadísticos se realizan mediante el programa de análisis IBM SPSS Statistic.

Resultados

4 Resultados

4.1 Hallazgos en patologías asociadas al envejecimiento.

Estudio A

Durante el periodo de experimentación se descartaron aquellos animales que manifestaron alguna alteración considerada incompatible con las tareas que debían realizar. Algunos animales se debieron descartar después de la necropsia por encontrar lesiones en el sistema nervioso que pudieron introducir variabilidad en los datos obtenidos.

De los 63 animales que comenzaron el procedimiento muchos manifestaron algún tipo de patología. Clasificamos las patologías presentadas como incapacitantes y leves.

Aquellas leves permitían a los animales continuar con el experimento y su calidad de vida no se vio afectada o se pudo aplicar una terapia con éxito. Este tipo de patologías fueron: tumores cutáneos de crecimiento lento tipo nevus, papilomas, quistes sebáceos, alopecias, y úlceras en la piel, abscesos o heridas más o menos infectadas que cicatrizaron con tratamiento.

Las que calificamos como incapacitantes son aquellas que afectaban al bienestar, la salud o impedían realizar las pruebas y se les retiró del experimento y aplicó eutanasia.

Entre estas encontramos: tumores craneales (2) (uno presentaba bultafmos asociado y otro fue un hallazgo postmortem), catarata (1), síndrome vestibular (1), coaguloptía (1), enfermedad respiratoria (3), parálisis (1), cardiopatía (2), diabetes (3) y causas sin diagnosticar (3).

En total se retiraron 16 animales lo que representa un 26%. con una media de edad de éstos de 23 meses.

Entre los signos neurológicos que fueron desarrollando a lo largo del estudio encontramos incoordinación en la natación, temblor en la locomoción por el campo abierto, tendencia a la inmovilidad, falta de reactividad o cierta apatía por el entorno.

Entre los hallazgos postmortem encontramos: tumores hepáticos (4), tumores craneales (2) y cardiopatía dilatada (1).

Estudio B.

Estos animales envejecieron en condiciones experimentales, y suplementados con fresa en la dieta precozmente. Las patologías encontradas fueron:

Dermatitis ulcerosa (2), diabetes (3), enteritis (1).

La mortalidad al cabo de los 12 meses fue de 13 % y la causa fue el cáncer en todos (tumores en cuello de origen sin diagnosticar y hepatoma).

4.2 Dieta.

Los animales tomaron sin excepción su porción diaria voluntariamente.



Ilustración 3. Consumo voluntario de fresa

La cantidad media de fresa ofrecida fue de 8 gr y la media tota consumida a diario $3,97 \pm 2,44$ g por animal. Que corresponde al equivalente actividad antioxidante ORAC de $61,00 \pm 37,50$ mmol. Equivalente Trolox.

4.3 Determinación del deterioro relacionado con envejecimiento.

4.3.1 Caracterización fenotípica de declive natural con el envejecimiento.

4.3.1.1 Estudio de parámetros de evaluación neurológica.

Evaluación neurológica.

Se advierte un deterioro en las funciones neurológicas en general si comparamos los grupos de edad con el grupo de animales jóvenes. Se ven afectados de forma leve, alcanzando un score medio bajo, tanto las vías sensitivas como los reflejos motores. Ningún parámetro de esta evaluación resultó dar niveles incapacitantes para el desarrollo de posteriores pruebas de conducta, ya que el deterioro en los reflejos o de sensibilidad en contadas ocasiones llegó al máximo de 2, y cuando lo hizo no presentaba una coherencia de deterioro con otros parámetros.

Parámetros sensitivos:

Parámetros de somestesis, temperatura, olfato y audición.

Correlaciones

		Edad
PIEL	Correlación de Pearson	,021
	Sig. (unilateral)	,429
	N	73
VIBRISAS	Correlación de Pearson	,315**
	Sig. (unilateral)	,003
	N	73
HOCICO	Correlación de Pearson	,055
	Sig. (unilateral)	,322
	N	73
REFLEJO_SACUDIDA	C. Pearson	,040
	Sig. (unilateral)	,368
	N	73
OLFATO	Correlación de Pearson	,189
	Sig. (unilateral)	,055
	N	73
AUDICION	Correlación de Pearson	,266*
	Sig. (unilateral)	,011
	N	73
HOTPLATEANT_seg	Correlación de Pearson	,133
	Sig. (unilateral)	,132
	N	73
HOTPLATEPOST_seg	Correlación de Pearson	,084
	Sig. (unilateral)	,240
	N	73

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (unilateral).

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

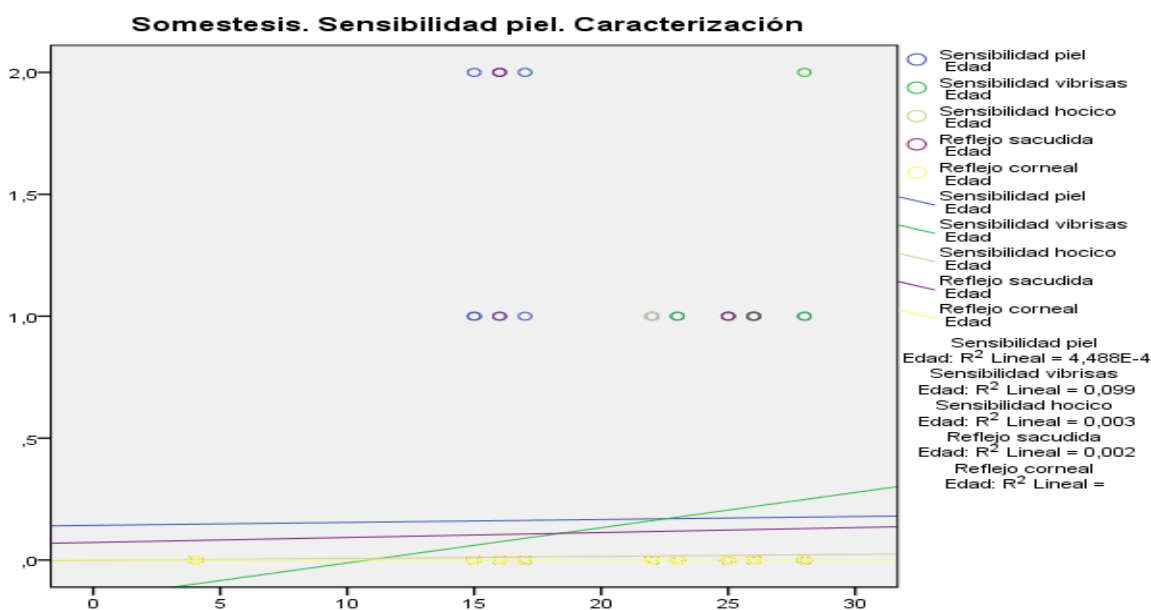


Ilustración 4. Deterioro sensorial. Somestesis sensibilidad de la piel en distintos puntos. Caracterización

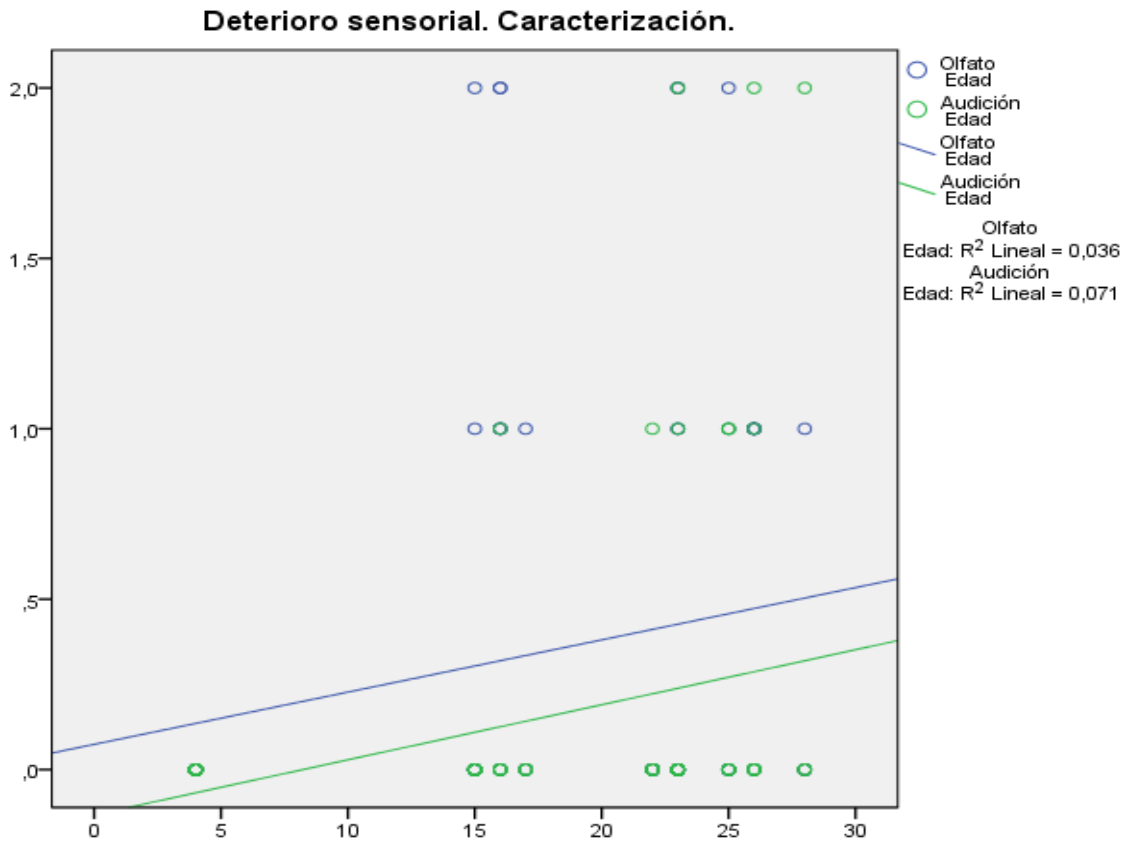


Ilustración 5. Deterioro sensorial. Olfato y Audición. Caracterización

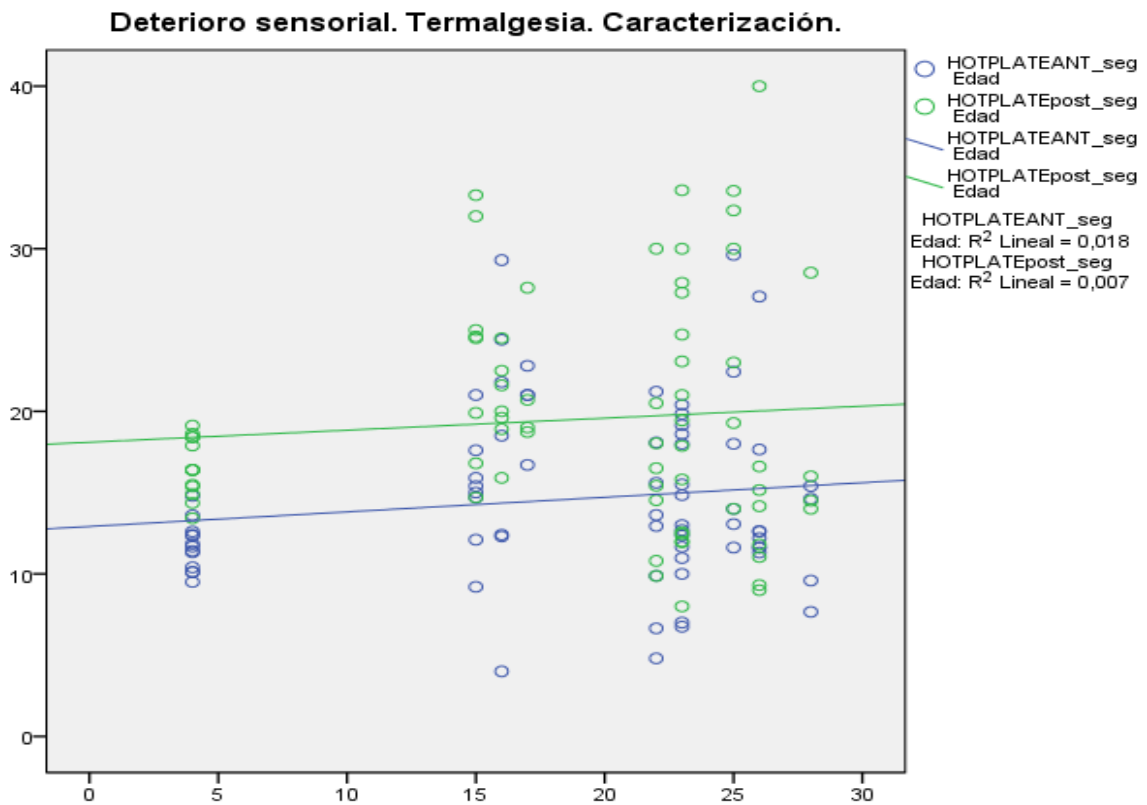


Ilustración 6. Termalgesia. Caracterización.

Percepción, propiocepción reflejos y equilibrio;
Correlaciones

		Edad
EQUILIBRIO_TABLA	C. Pearson Sig. (unilateral) N	,574** ,000 73
EQUILIBRIO_PLANO_INCLINADO	C. Pearson Sig. (unilateral) N	,353** ,001 73
REACION_POST_TRASERA_DCH	C. Pearson Sig. (unilateral) N	,230* ,025 73
REACION_POST_TRASERA_IZQ	C. Pearson Sig. (unilateral) N	,321** ,003 73
REACION_POST_DELANT_DCH	C. Pearson Sig. (unilateral) N	. ^a . . 73
REACION_POST_DELANTERA_IZQ	C. Pearson Sig. (unilateral) N	,115 ,167 73
AGARRE	C. Pearson Sig. (unilateral) N	,106 ,185 73

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (unilateral).

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

a. No se puede calcular porque al menos una variable es constante.

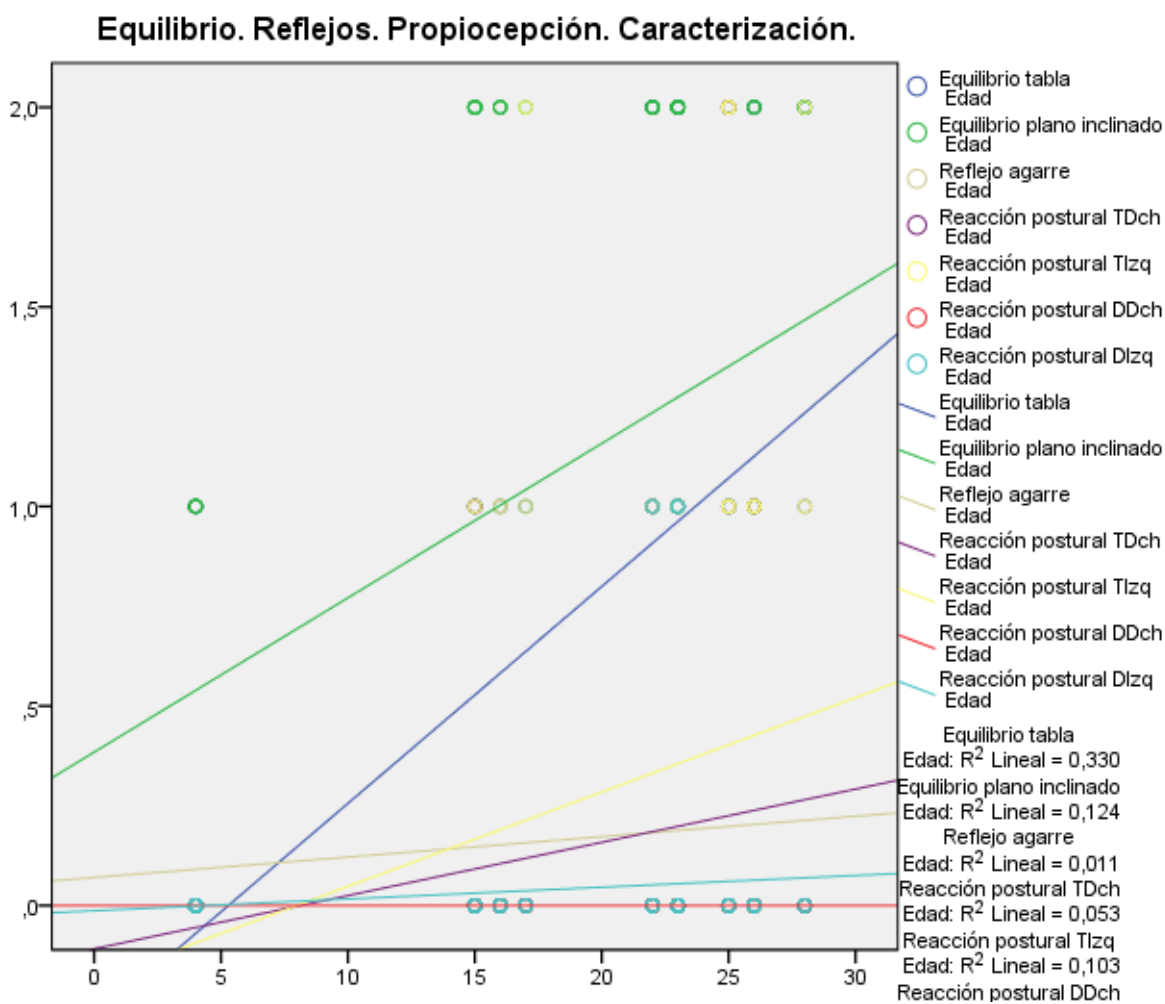


Ilustración 7. Evolución del deterioro en equilibrio, propiocepción y reflejos asociados. Caracterización.

Esfuerzo de agarre.

Correlaciones

		Esfuerzo Agarre
Edad	Correlación de Pearson	-,242*
	Sig. (unilateral)	,019
	N	73

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

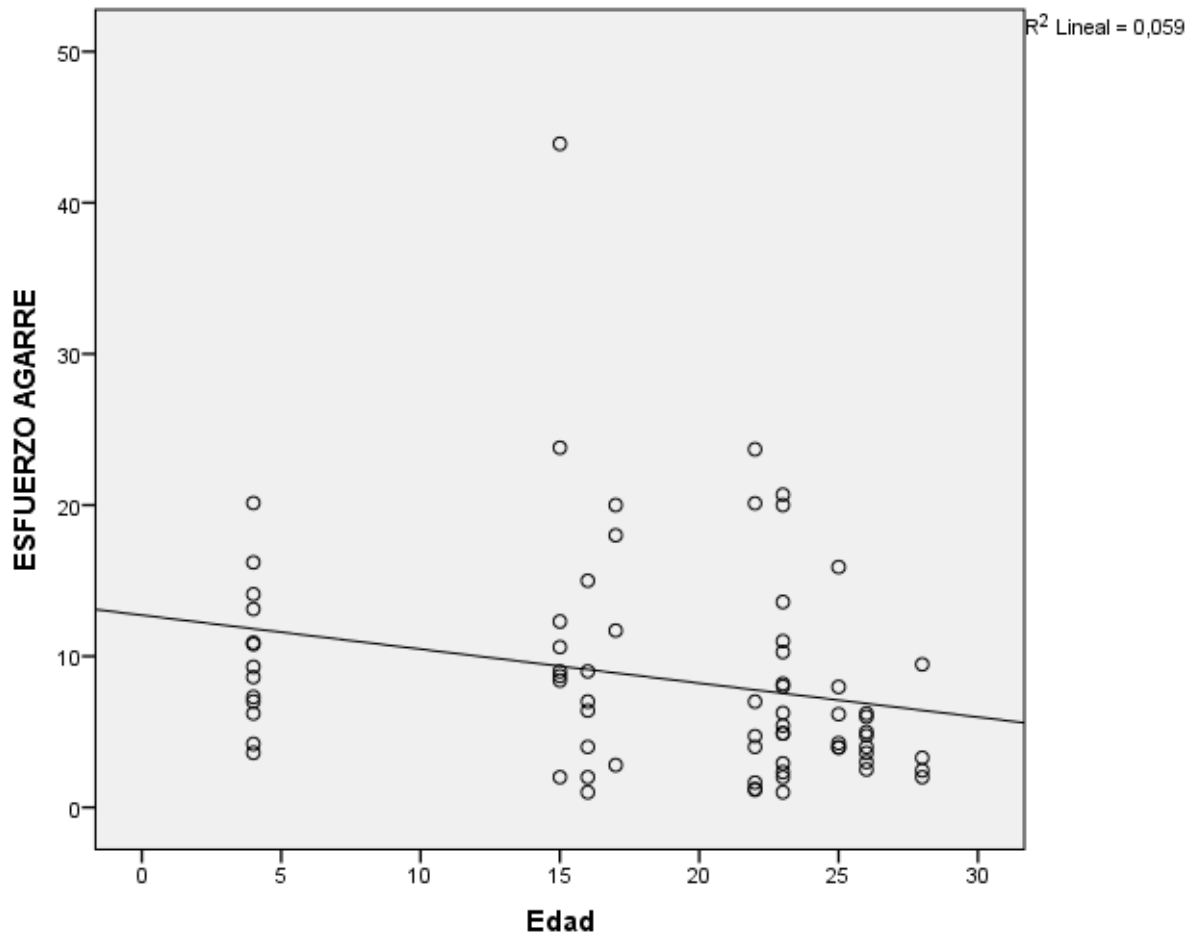


Ilustración 8. Evolución de esfuerzo de agarre. Caracterización.

4.3.1.2 Estudio de parámetros cognitivos; Declive cognitivo.

4.3.1.2.1.1 Memoria.

Pruebas de Laberinto Acuático de Morris.

La mayoría de los animales en todos los rangos de edad consiguen navegar con eficacia, y tanto en el ensayo de habituación como en el de prueba visual se desenvuelven satisfactoriamente, alcanzando la plataforma con eficacia. Algunos animales (3) padecen episodios de descoordinación, natación a brazadas y giros sobre su eje, dos realizan la prueba sin peligro para su integridad y uno de ellos es retirado en la fase posterior.

4.3.1.2.1.1.1 Latencia de escape en Laberinto Acuático.

Se comprueba que durante el envejecimiento se produce un aumento del tiempo que tardan en encontrar la plataforma y que hay correlación positiva entre el parámetro tiempo y el parámetro edad. Coeficiente de C. Pearson positiva=0,530, $p<0.01$

Correlaciones

		Latencia (sg) Escape
Edad	C. Pearson	,530**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	284

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

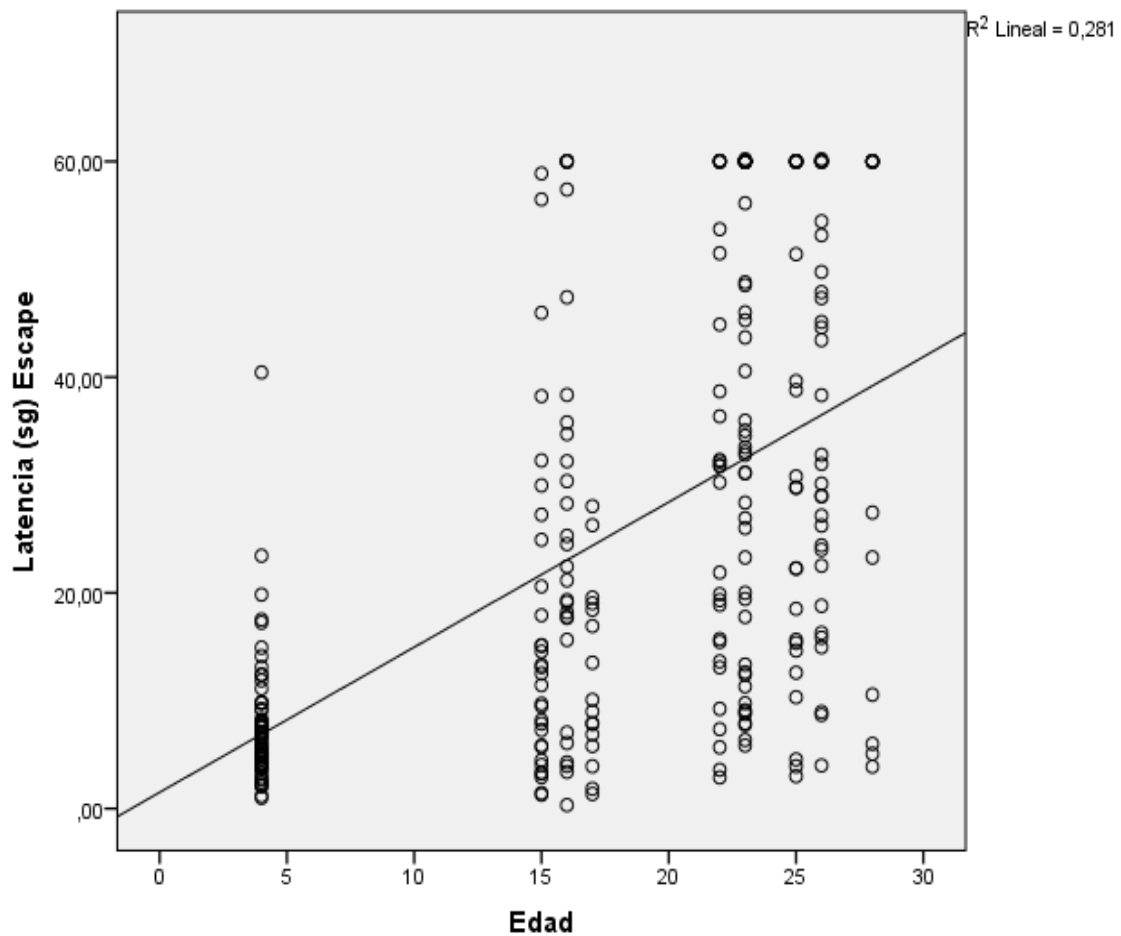


Ilustración 9. Caracterización Envejecimiento. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Latencia de escape

4.3.1.2.1.1.2 *Distancia recorrida de escape en Laberinto Acuático.*

Se comprueba que durante el envejecimiento se produce un aumento de la distancia que necesitan los animales para encontrar la plataforma y que hay correlación positiva entre la variable distancia y el parámetro edad. Coeficiente de C. Pearson positiva =0,491 $p < 0,01$

Correlaciones

		Distancia (cm) Escape
Edad	C. Pearson	,491**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	284

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

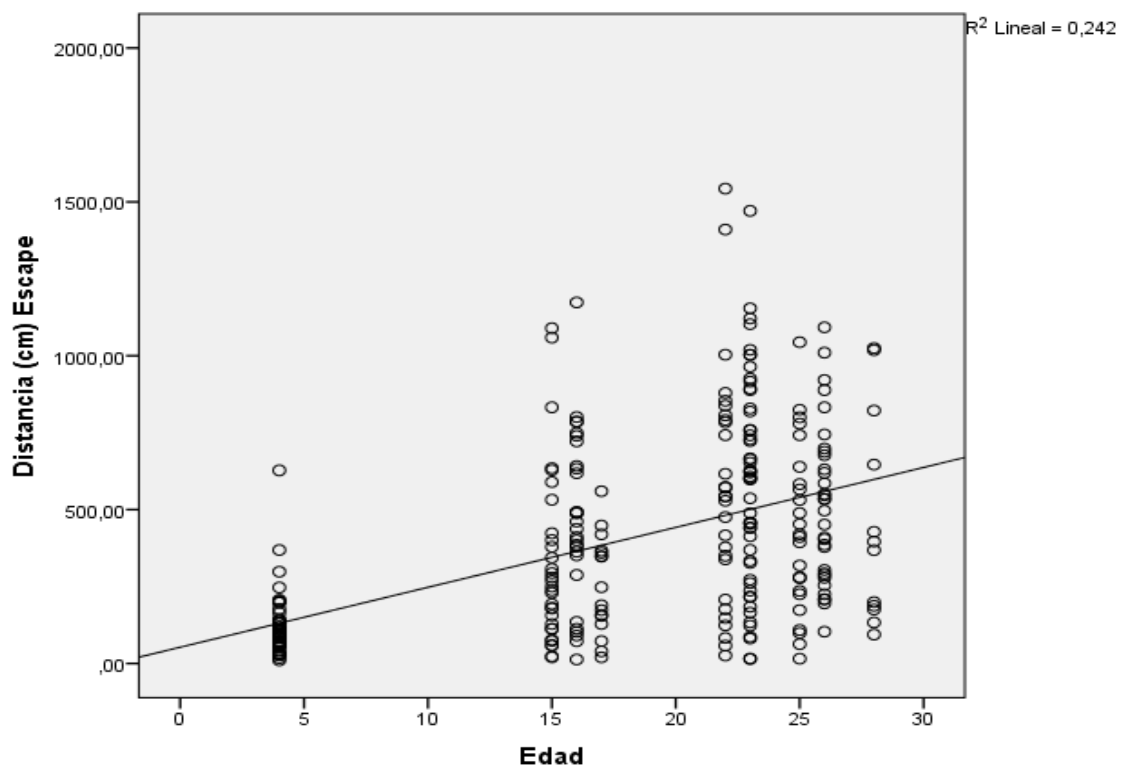


Ilustración 10. Caracterización Envejecimiento. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Distancia de escape

4.3.1.2.1.1.3 Curva de aprendizaje.

La evolución de aprendizaje considerando la distancia que recorren en cada uno de los ensayos del 1º al 4º podemos ver que también se ve afectada. Los animales emplean mas tiempo y distancia en encontrar la plataforma de escape conforme tienen edades mayores. Además la evolución de los tiempos en los 4 días de ensayo pierde pendiente, la cual es menos marcada en las edades de 22 a 28 meses. Podemos ver incluso una variabilidad en los patrones de tiempos y distancias encontrados.

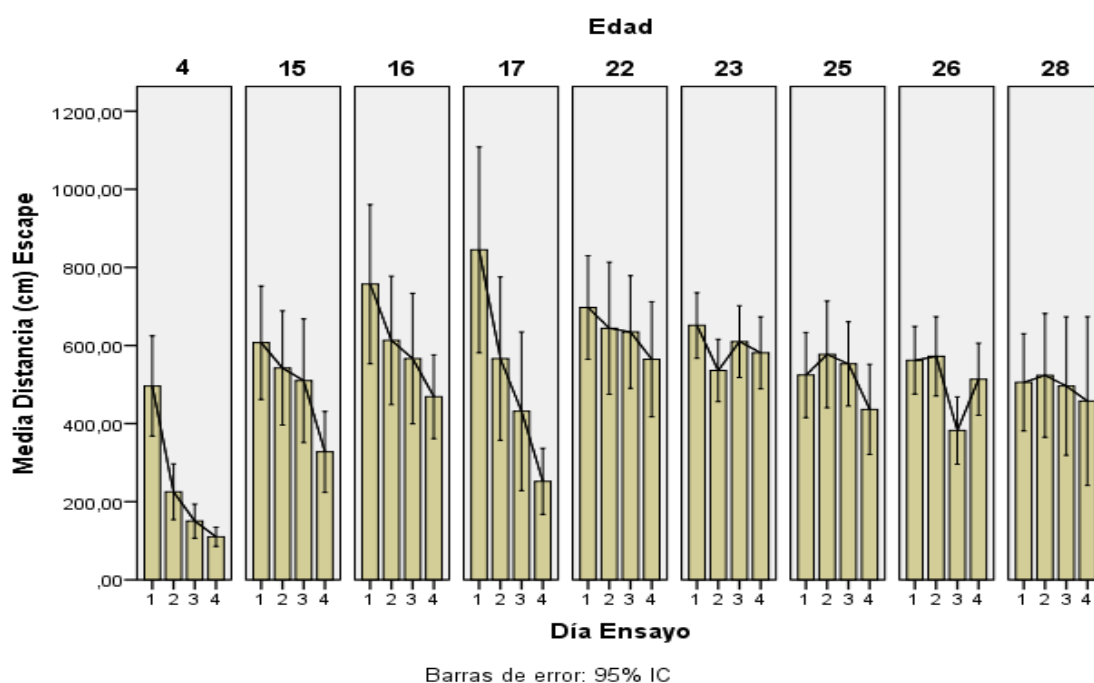
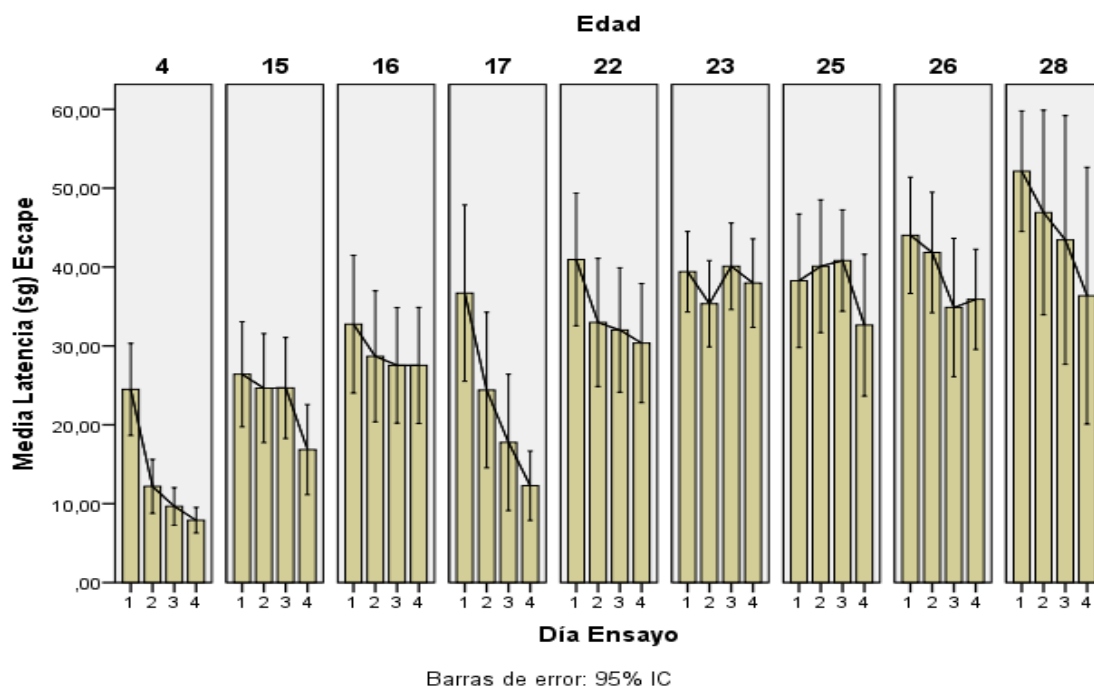


Ilustración 11. Memoria espacial. . Caracterización envejecimiento. Distancias, laberinto acuático de Morris. Curvas de aprendizaje ensayos 1 al 4.

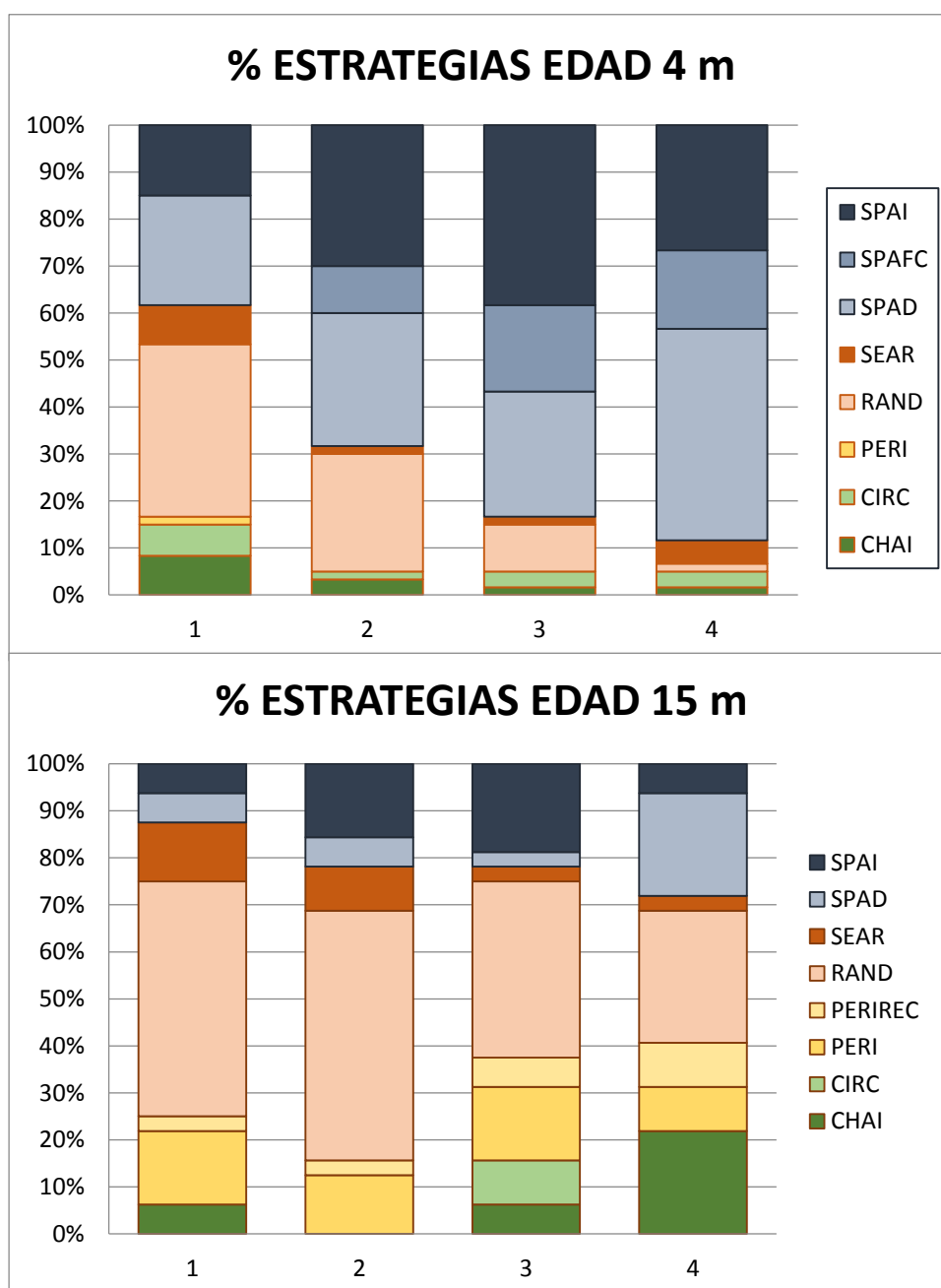
Curva Pendiente aprendizaje

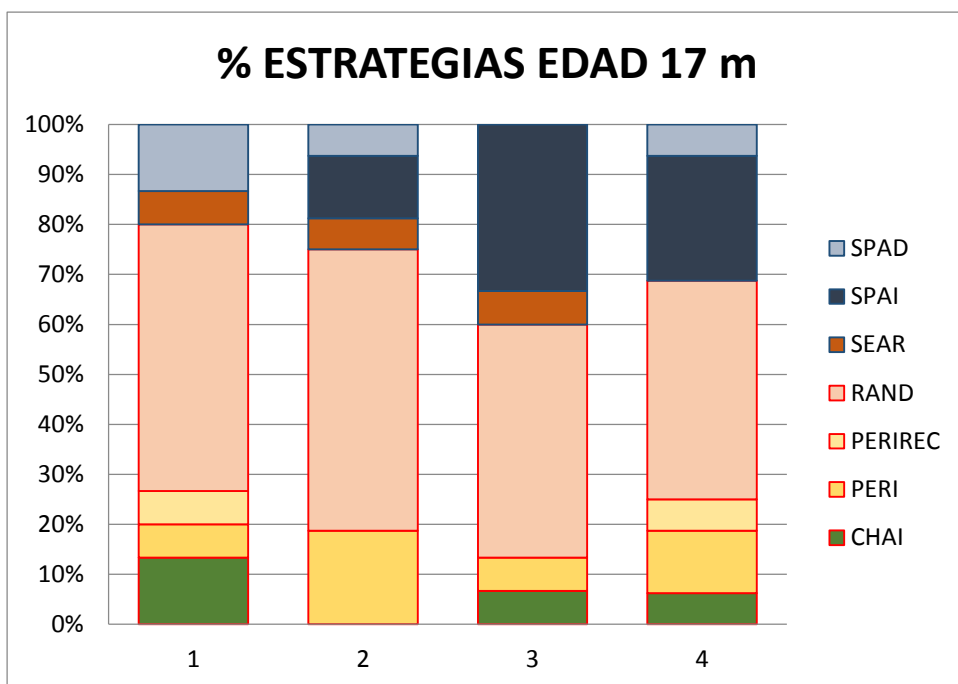
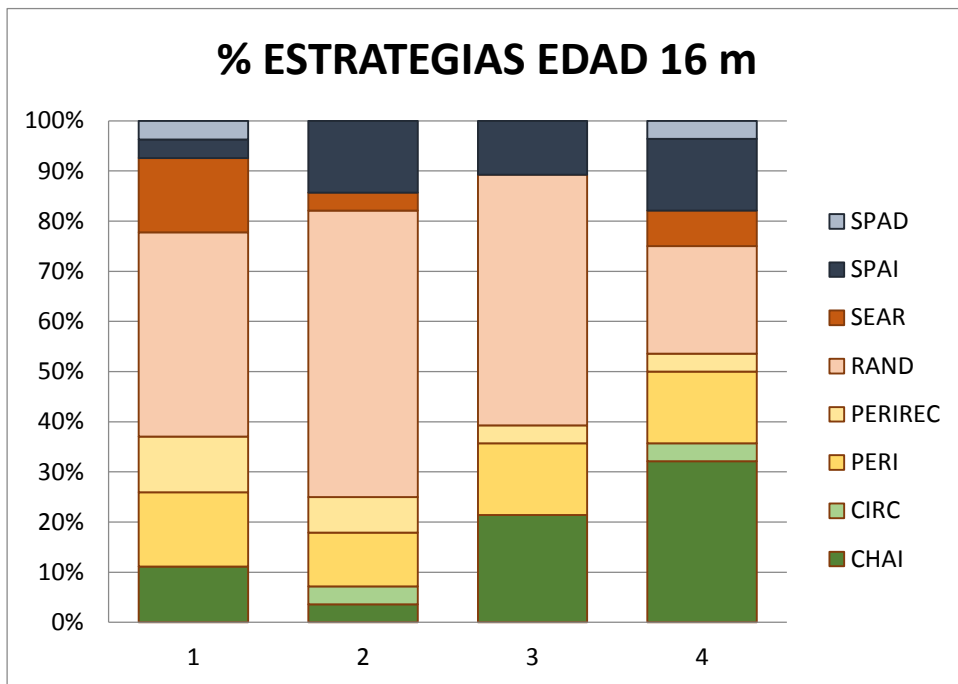
Edad	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
4	,310a	,096	,093	338,39445
15	,227a	,051	,049	418,15566
16	,007a	,000	-,007	409,64460
17	,121a	,015	,002	447,46912
18	,046a	,002	-,007	275,58778
19	,024a	,001	-,009	294,40010
20	,133a	,018	,002	289,45198
22	,150a	,022	,013	367,45475
23	,049a	,002	-,002	325,35623
24	,102a	,010	,006	292,18036
25	,183a	,034	,027	292,92028
26	,083a	,007	,003	258,71391
27	,108a	,012	,004	274,29788
28	,114a	,013	-,008	262,93698
30	,036a	,001	-,032	239,22262

4.3.1.2.1.1.4 Estrategia de búsqueda en Laberinto Acuático.

Se observa que las estrategias de búsqueda basadas en memoria espacial van disminuyendo en proporción respecto a las no espaciales de forma dramática con la edad.

Los animales utilizan estrategias espaciales (SPAD, SPAI, SPAFC) en proporción mayor en cada día de ensayo cuando son jóvenes. Este aumento de proporción en el ensayo 4 se va perdiendo en los grupos de mayor edad, concluyendo que pierden memoria a medio plazo e indicando que una progresión en su déficit cognitivo.





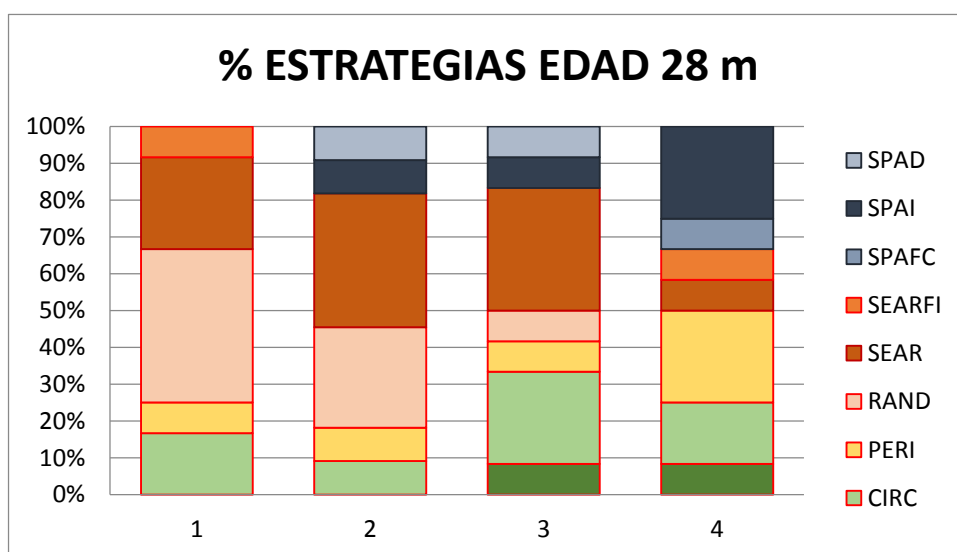
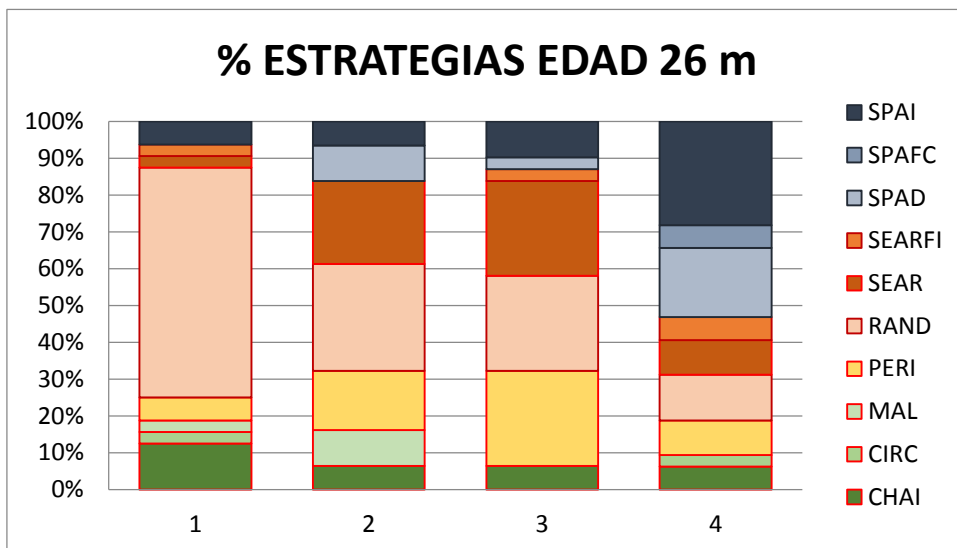
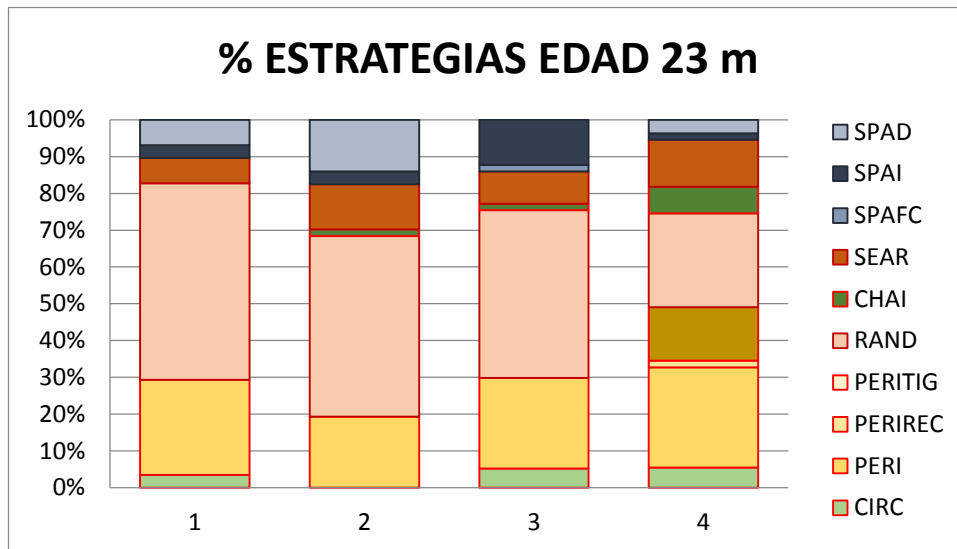


Ilustración 12. Memoria. Porcentaje de estrategias de búsqueda, evolución del primero al cuarto días de ensayo. Caracterización en distintas edades.

4.3.1.2.1.1.5 Permanencia en el cuadrante de escape en Laberinto Acuático.

Tiempo de permanencia

- *Porcentaje de tiempo de permanencia en el cuadrante de escape.*

El porcentaje de tiempo, respecto al total que dura la prueba, se observa una reducción significativa de la proporción de permanencia en el cuadrante de escape correlativa al envejecimiento. Coeficiente de C. Pearson negativa = -0,627 $p < 0.01$.

Correlaciones

		Tiempo (%) Permanencia Cuadrante Escape
Edad	C. Pearson	-,627**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	64

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

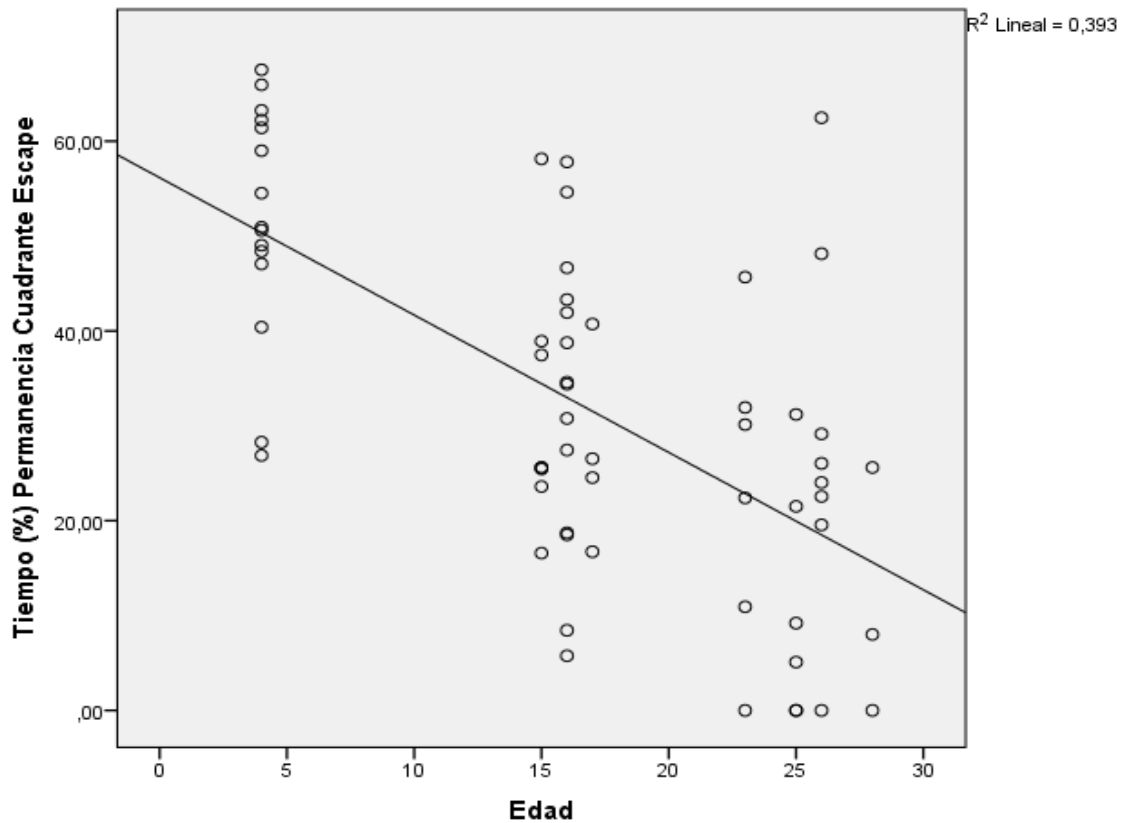


Ilustración 13. Caracterización Envejecimiento. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. % Tiempo de Estancia en el cuadrante de escape.

Distancia recorrida en el cuadrante de escape.

- *Porcentaje de distancia recorrida en el cuadrante de escape.*

La distancia recorrida en el cuadrante donde se encuentra la plataforma como porcentaje de espacio total recorrido en el ensayo N°5 o de extinción experimenta una reducción significativa con una correlación negativa entre distancia recorrida y el envejecimiento. Coeficiente de C. Pearson negativa = -0,633 p<0.01.

Correlaciones

		Distancia (%) Cuadrante Escape
Edad	C. Pearson	-,633**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	64

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

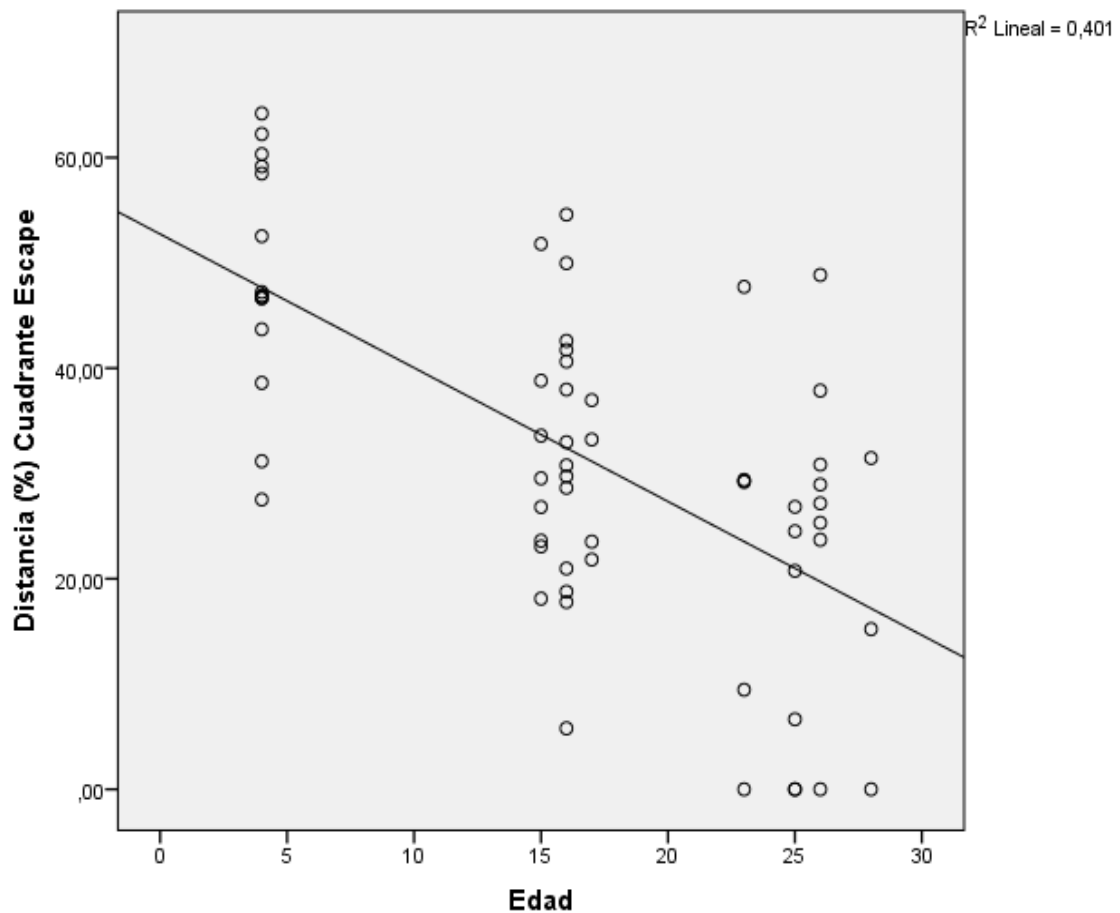


Ilustración 14. Caracterización Envejecimiento. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. % Distancia recorrida en el cuadrante de escape.

4.3.1.2.1.1.6 Número de veces que el animal cruza el cuadrante de escape en Laberinto Acuático.

Existe una disminución del número de entradas en el cuadrante de escape durante el envejecimiento. La correlación con la edad es significativa. Coeficiente de C. Pearson negativa = -0,463 $p < 0,01$

Correlaciones

		Entradas Cuadrante Escape
Edad	C. Pearson	-,463**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	64

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

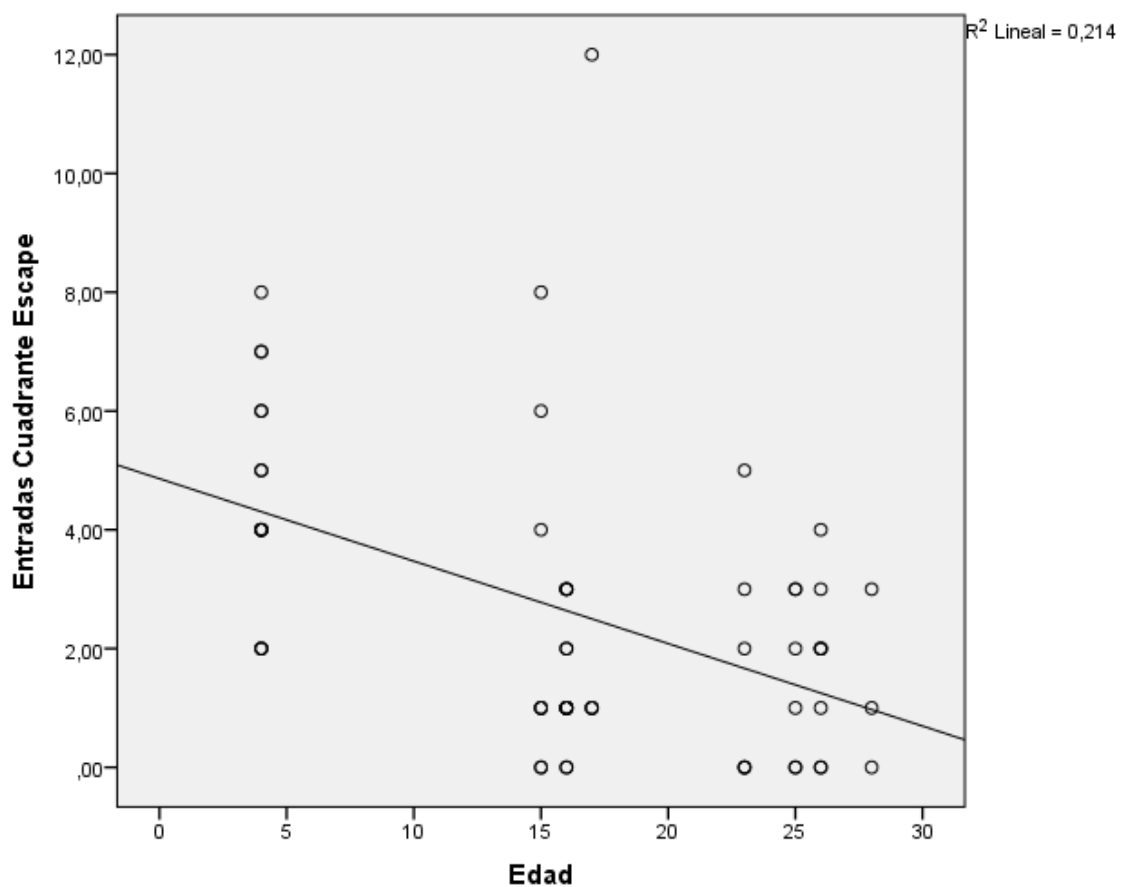


Ilustración 15. Caracterización Envejecimiento. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Nº de Entradas en el cuadrante de escape.

4.3.1.2.1.2 Reconocimiento social.

La mayoría de los animales realizaron la prueba con comodidad y atracción no resultando ser una prueba aversiva. Pocos animales dejaron de manifestar conducta social, quedándose apáticos o intimidados ante la presencia de un individuo desconocido. A estos hubo que retirarlos de la prueba.

Diferencia de tiempo de comportamiento social entre la primera y segunda presentación (aprendizaje y reconocimiento).

- *Estudio del comportamiento social*

Cuando realizamos la prueba con una dilación de 45 minutos, entre la primera presentación y la segunda observamos que el comportamiento de las ratas de mayor edad es distinto que en las jóvenes en el rango de 15 y 17 meses ya que el decremento de tiempo para reconocer al mismo animal es muy acusado, a partir de los 22 meses se vuelve mas aleatorio. En la prueba de contraste donde se le presenta a un individuo desconocido se registra también una disminución del tiempo de exploración. El tiempo registrado durante la prueba del contraste se iguala al tiempo utilizado en el reconocimiento del individuo conocido, no pudiendo atribuir, por tanto esta reducción al reconocimiento del individuo o a la falta de motivación o cansancio que presenta en la prueba de contraste. Esta circunstancia excluye el criterio de decidir si existe una disminución del tiempo de exploración porque realmente recuerden al individuo o que sea debido a una desmotivación en la tarea la segunda vez, invalidando por tanto a los grupos de mayor edad de este estudio.

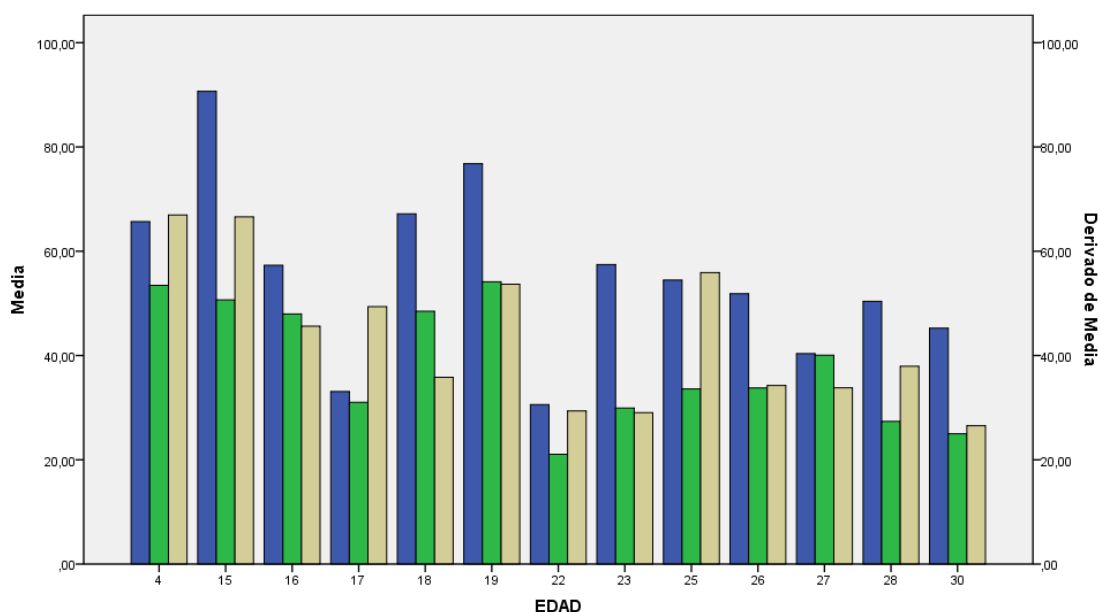


Ilustración 16. Memoria social. Tiempos de conducta social. (Azul primera presentación, verde: segunda presentación mismo individuo, beige: presentación distinto individuo test contraste)

Si extraemos los casos específicos que si han realizado la prueba y su contraste si es significativo, nos aparece esta línea de correlación de retención máxima en la memoria, vemos que no encontramos variación pero este resultado no es significativo con los casos analizados.

Correlaciones

		Tiempo Retención Máxima
Edad	Correlación de Pearson	-,009
	Sig. (bilateral)	,940
	N	66

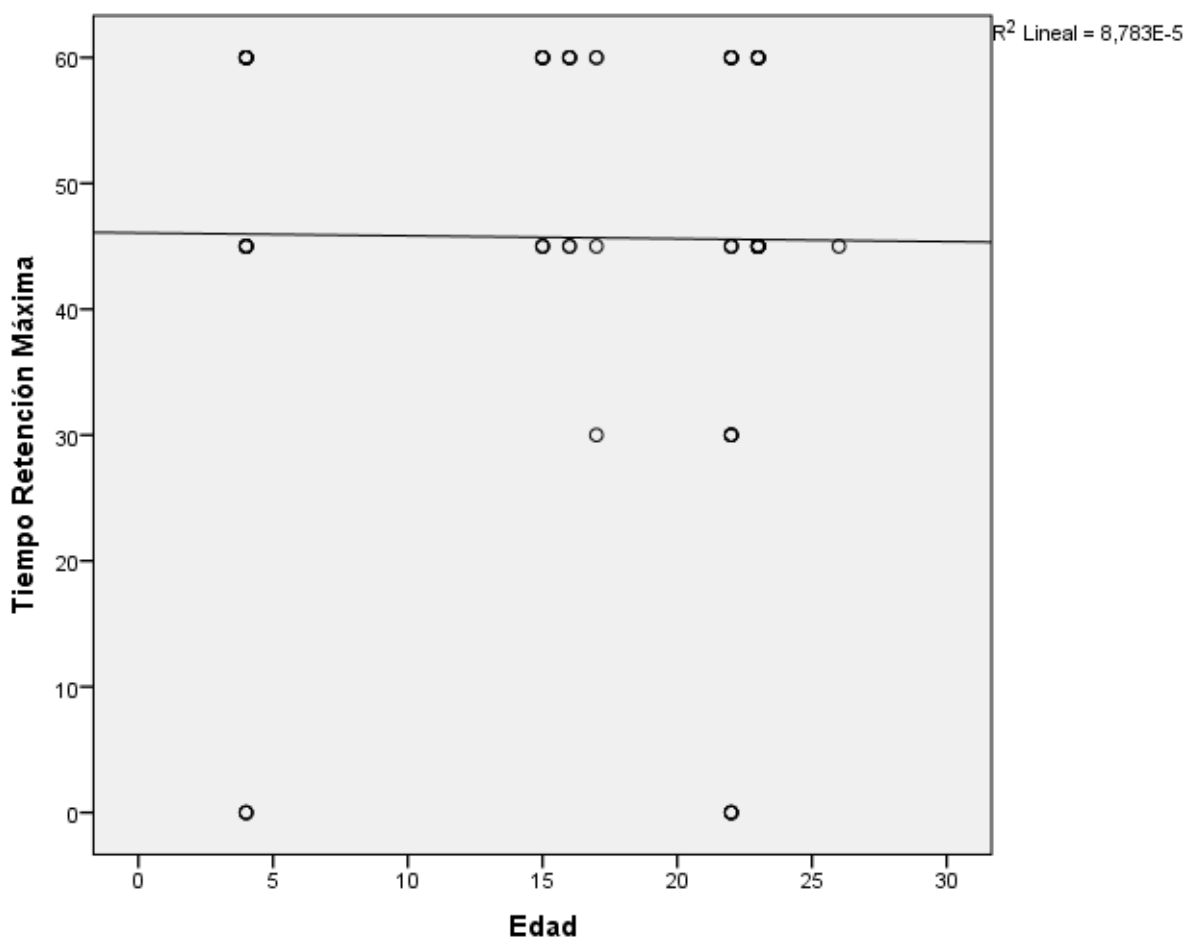


Ilustración 17. Memoria social. Tiempo de retención máxima 30', 45', 60'. Caracterización.

4.3.1.2.1.3 Capacidad de reversión en Laberinto Acuático.

Observamos que la capacidad adaptación de los animales a la nueva tarea se va perdiendo paulatinamente con la edad, y lo hace de manera significativa, con un coeficiente de C. Pearson positiva=0,476 $p < 0,01$ en el caso de la latencia de escape y con un coeficiente de C. Pearson positiva=0,317 $p < 0,05$ en el caso de la distancia de escape.

Correlaciones

		Latencia Escape
Edad	C. Pearson	,476**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	62

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Correlaciones

		Distancia Escape
Edad	C. Pearson	,317*
	Sig. (bilateral)	,012
	N	62

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

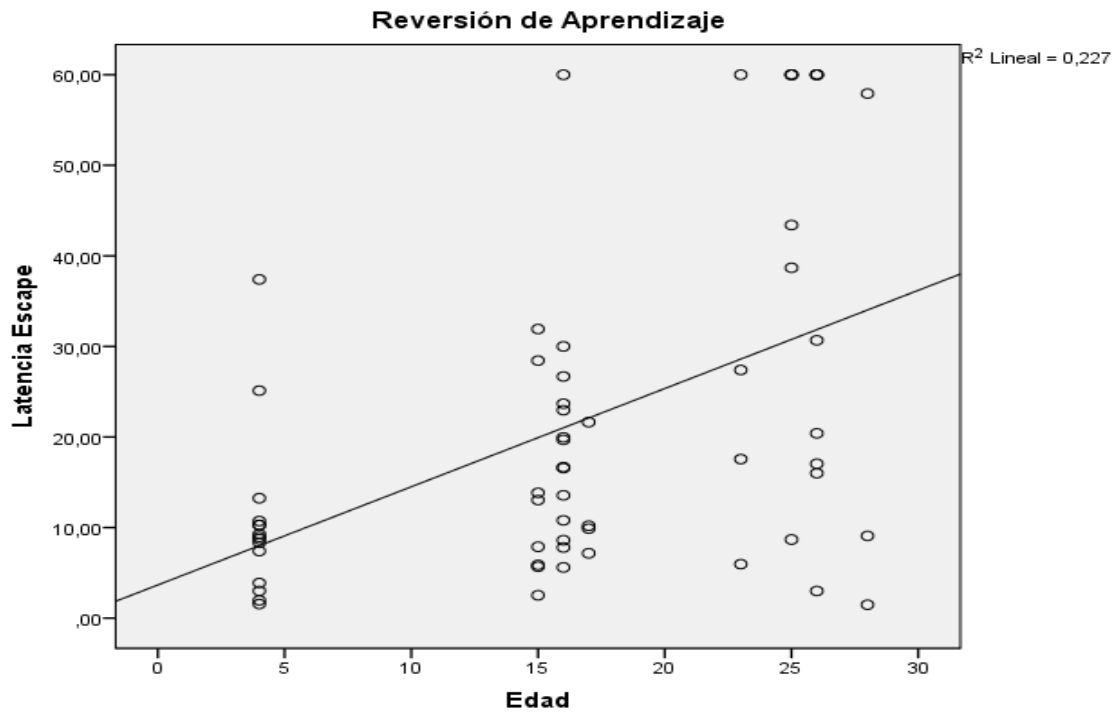


Ilustración 18. Capacidad de reversión. Latencia de escape día de ensayo 5 intento 4

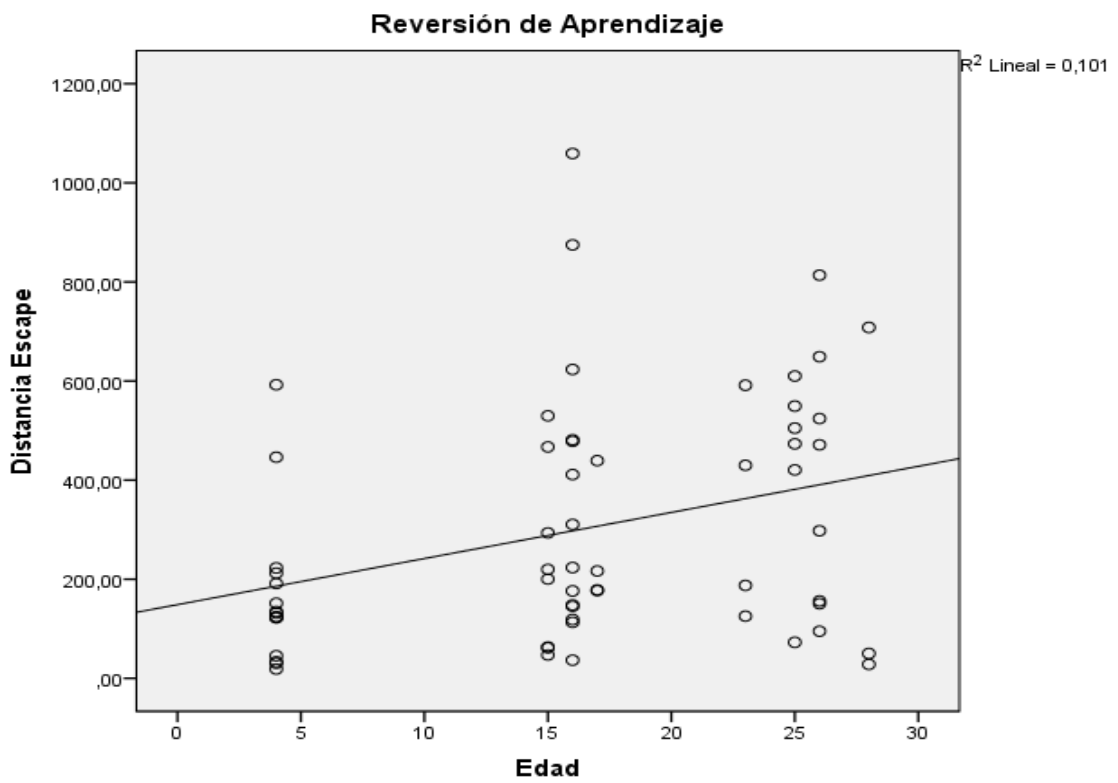


Ilustración 19. Capacidad de reversión. Distancia de escape día de ensayo 5 intento 4.



Correlación de animales de edades mayores a 15 m excluyendo al grupo de jóvenes. Observamos que la capacidad adaptación de los animales a la nueva tarea se va perdiendo paulatinamente con la edad, y lo hace de manera significativa, con un coeficiente de C. Pearson positiva=0,418 $p < 0,01$ en el caso de la latencia de escape y sin embargo no resulta significativo en el caso de la distancia de escape.

Correlaciones

		Latencia Escape
Edad	C. Pearson	,418**
	Sig. (bilateral)	,003
	N	47

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Correlaciones

		Distancia Escape
Edad	C. Pearson	,126
	Sig. (bilateral)	,400
	N	47

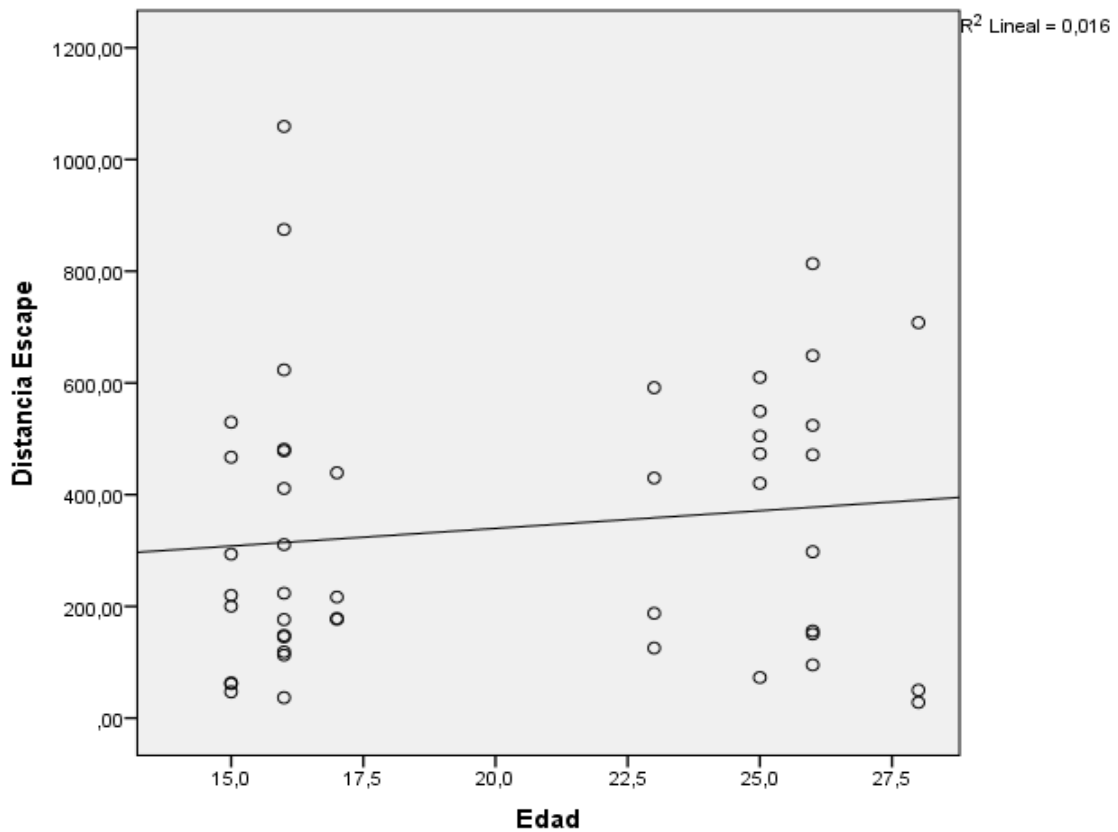
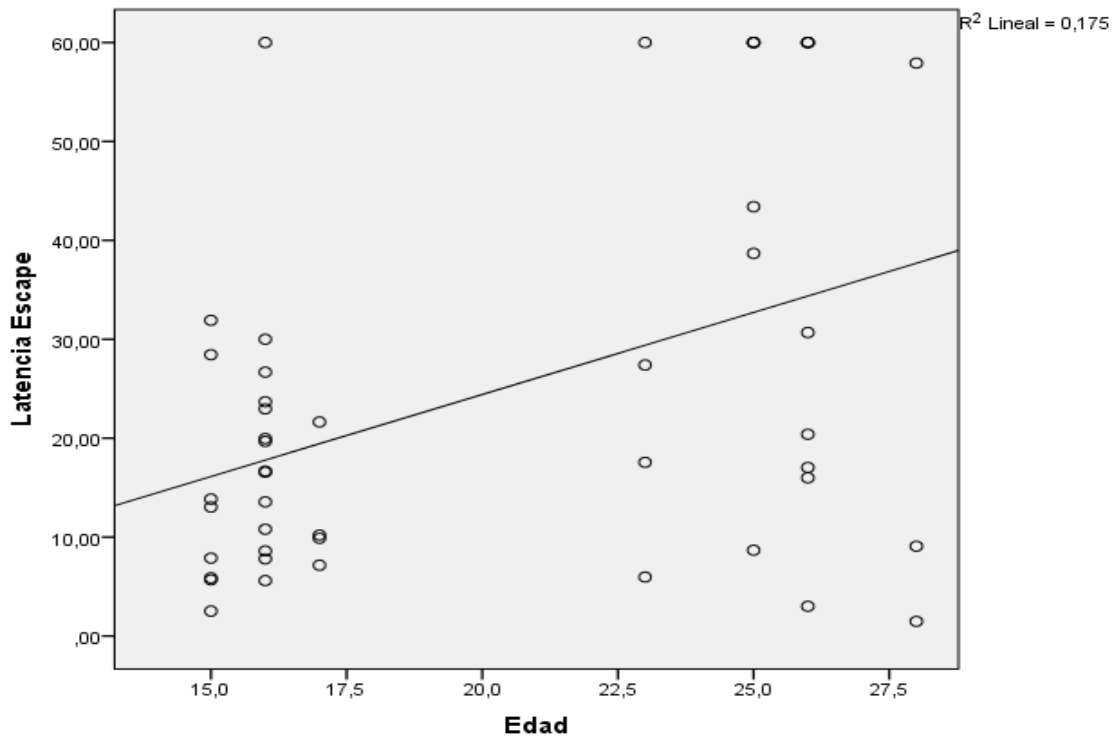


Ilustración 20. Aprendizaje. Capacidad de reversión. Caracterización de animales mayores de 15 meses.

Caracterización de envejecimiento. Reversión de Aprendizaje

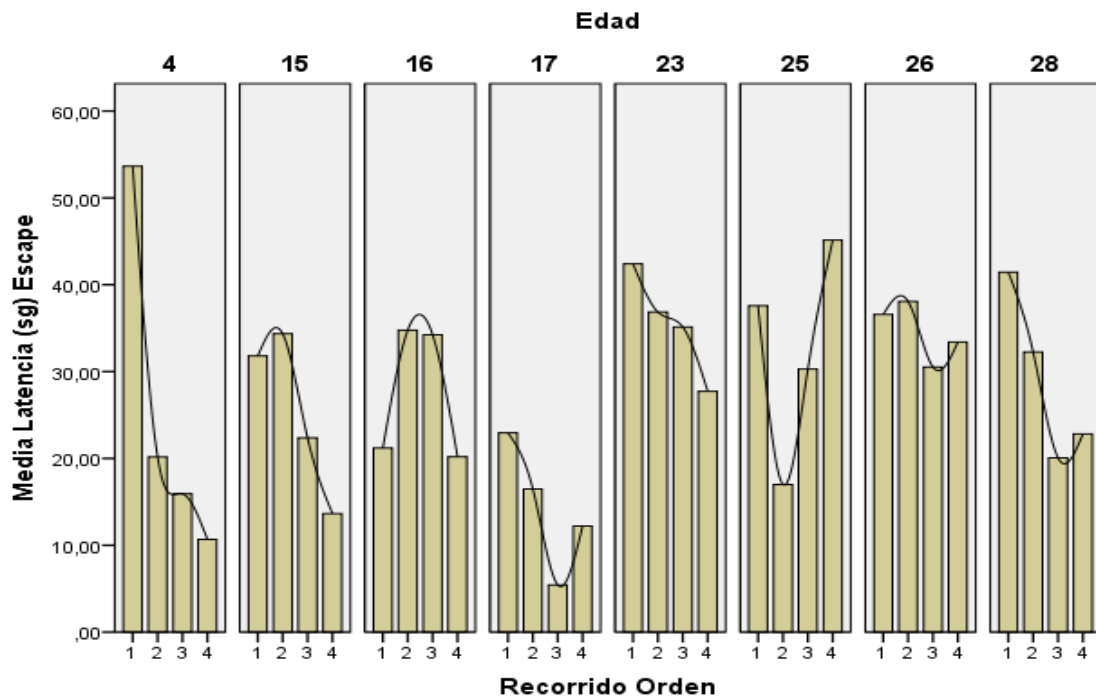


Ilustración 21. Capacidad de reversión. Curvas de Latencias de escape en los intentos 1-4 de día de ensayo 5.

Caracterización de envejecimiento. Reversión de Aprendizaje

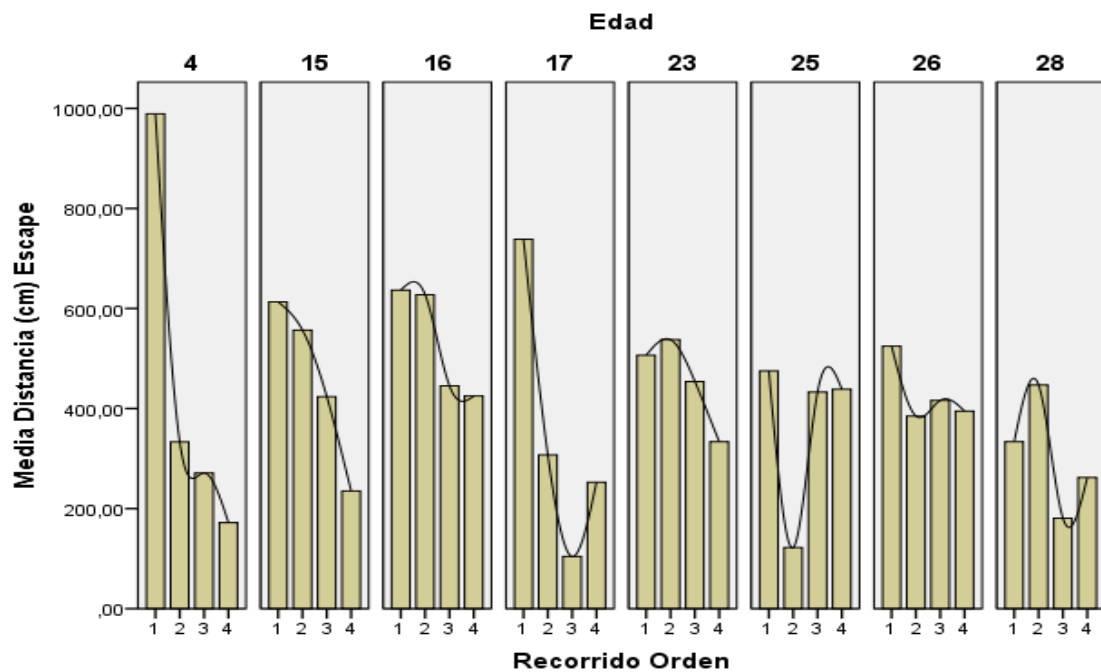


Ilustración 22. Capacidad de reversión. Curvas de distancias de escape en los intentos 1-4 de día de ensayo 5.

4.3.1.2.2 *Ansiedad, Actitud Exploratoria y Capacidad Física; Parámetros en Campo Abierto:*

Los animales mostraron un descenso en la actividad realizada voluntariamente, medida como distancia total y actividad global, comparada con los animales más jóvenes (4 m).

Las distancias recorridas y las velocidades medias tanto en la zona central del campo como en la periferia disminuyen de forma dramática a partir de los 15 meses.

El estudio de las conductas evidenció un deterioro claro de las actitudes de los animales viejos en general, no apareciendo los signos exploratorios de permanencia en el centro y si los desplazamientos por la periferia. La conducta de tigmotaxis aparece comúnmente en todos los animales de todas las edades incluso en las más jóvenes de 4 meses (grupo Basal), solo en contadas ocasiones los animales se atreven a atravesar la zona central, condición por otra parte esperada debido a la conocida tendencia ansiosa de esta cepa en concreto

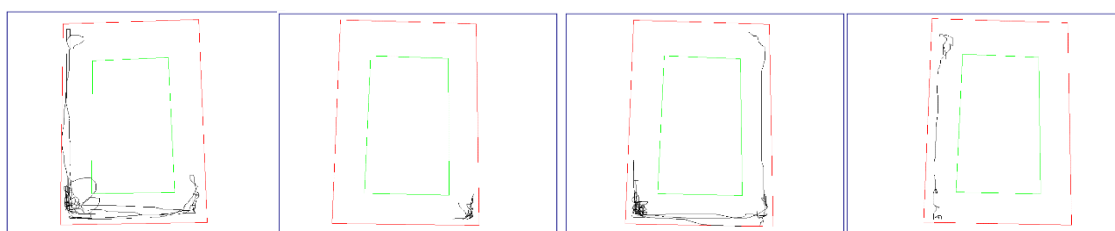


Ilustración 23. Trayectorias recorridas en campo abierto. Grupo basal (4 meses)

4.3.1.2.2.1 Permanencia en la zona periférica en Campo Abierto. Signo de tigmotaxis en campo abierto.

- Tiempo de permanencia.

Se puede observar que en todas las edades la mayor parte de la trayectoria se produce en la periferia no siendo en este caso un signo válido para determinar el estado de ansiedad de los animales. El porcentaje de tiempo de permanencia es ya muy extenso y por tanto varía muy poco y de forma poco significativa.

Correlaciones

		Tiempo (%) Zona Periférica
Edad	C. Pearson	-,020
	Sig. (bilateral)	,864
	N	74

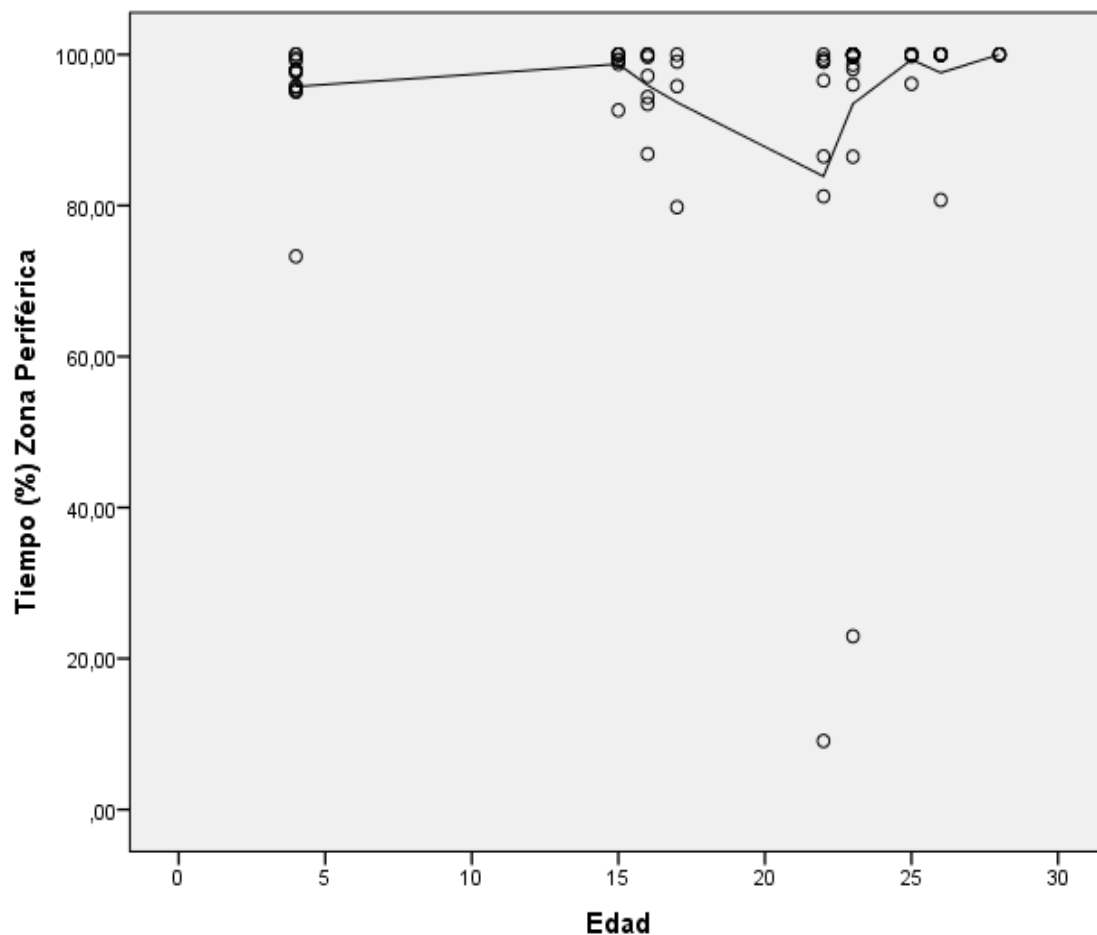


Ilustración 24. Ansiedad. Distribución de las distancias recorridas y porcentaje de actividad en la zona periférica y central. Evolución con la edad.

4.3.1.2.2.2 Conductas en Campo Abierto.

Desaparecen las conductas como la incorporación (rearing) en edades avanzadas indicativas de motivación por la exploración. Los episodios de aseo (grooming) se ven muy disminuidos en general y el número de deposiciones se mantiene constante.

Correlaciones

	Edad	REARING	GROOMING	DEFECATION
Edad	C. de Pearson	1	-,471**	,150
	Sig. (bilateral)		,000	,041
	N	89	89	89

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

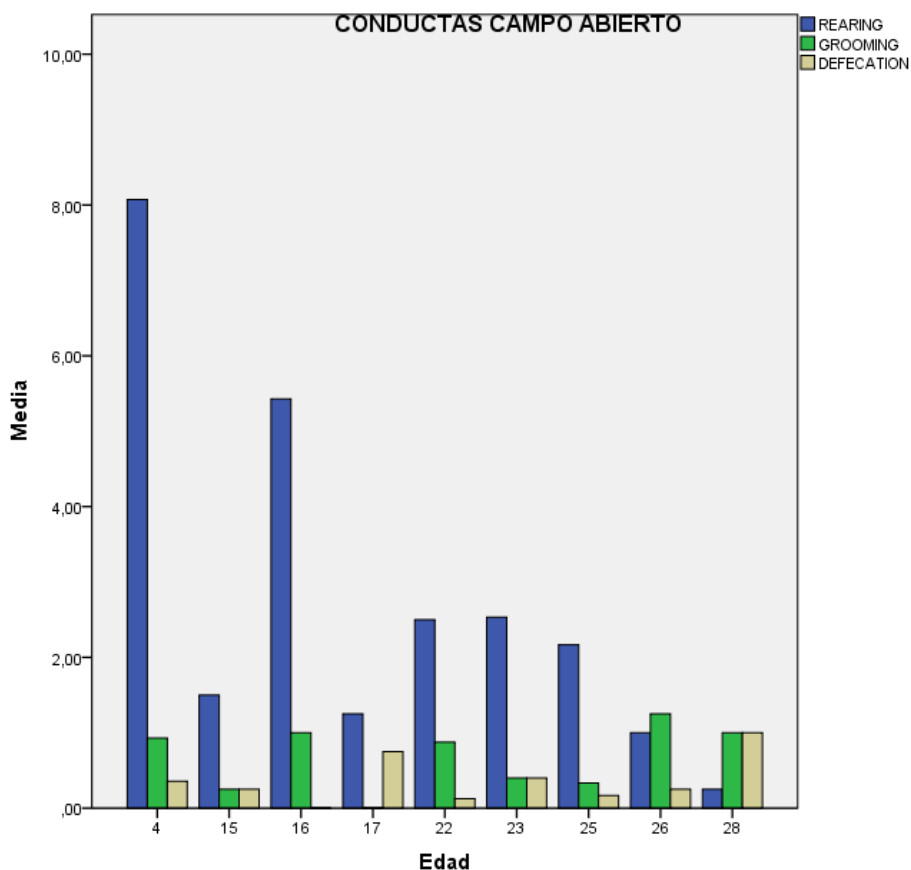


Ilustración 25. Patrón de conductas en Open Field. Evolución durante el envejecimiento.

4.3.1.2.2.3 Distancia total recorrida en Campo Abierto.

La distancia recorrida voluntariamente por los animales en el campo abierto desciende comparada con la expresada en la juventud (4 meses), y lo hace de manera significativa, con un coeficiente de C. Pearson negativa =-0,662 $p < 0,01$

Correlaciones

		Distancia (cm) Total
Edad	C. Pearson	-,662**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	74

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

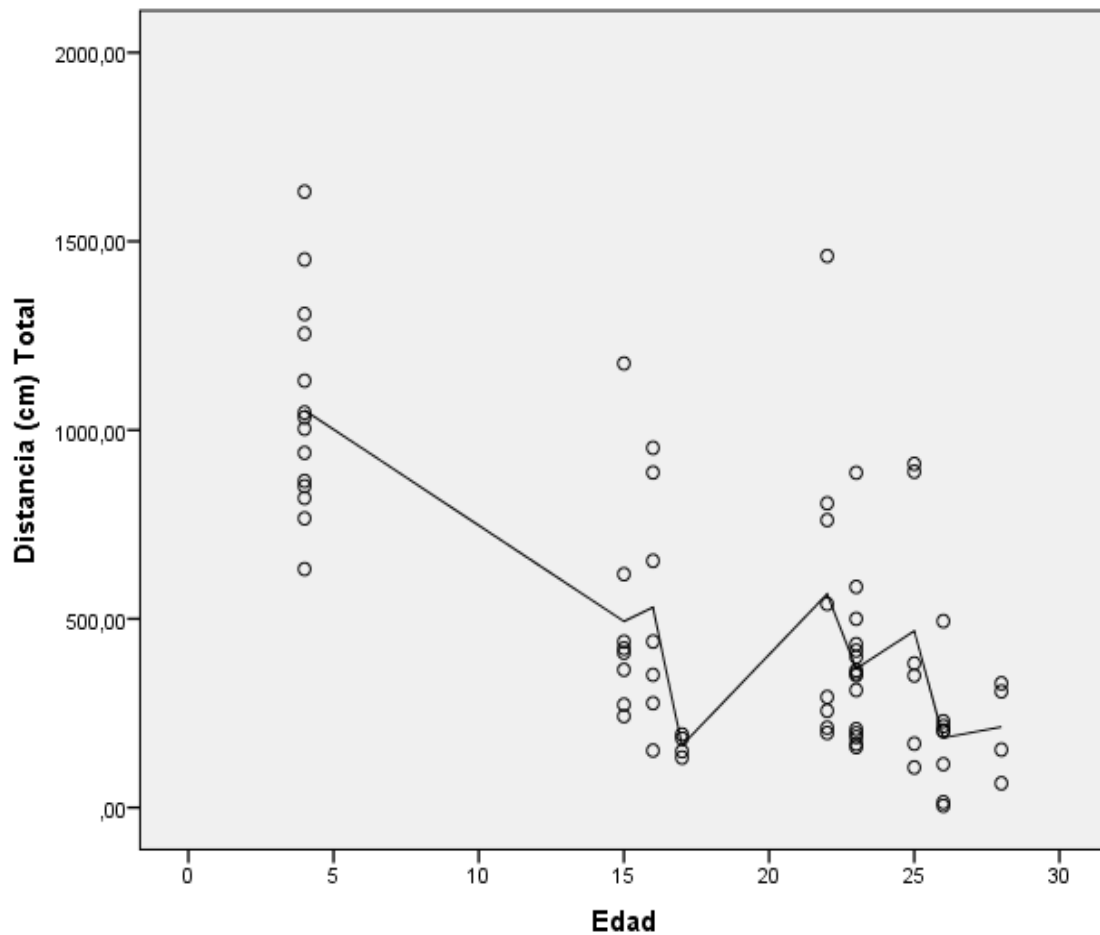


Ilustración 26. Motilidad y capacidad física. Distancia Recorrida en campo abierto.

4.3.1.2.2.4 Velocidades medias de desplazamiento en el Campo Abierto andando.

La velocidad de desplazamiento disminuye también paulatinamente con la edad. Se observa que al atravesar la zona central de campo lo hacen a una velocidad mayor, con un coeficiente de C. Pearson negativa= -0, 635 $p < 0,01$ en el caso de la zona periférica y con un coeficiente de C. Pearson negativa = -0, 640 $p < 0,01$ en el caso de la zona central.

Correlaciones

		Edad	Velocidad media (cm/sg) Periférico	Velocidad Media (cm/sg) Central
Edad	C. Pearson	1	-,635**	-,640**
	Sig. (bilateral)		,000	,000
	N	74	74	39
Velocidad media (cm/sg) Periférico	C. Pearson	-,635**	1	,530**
	Sig. (bilateral)	,000		,001
	N	74	74	39
Velocidad Media (cm/sg) Central	C. Pearson	-,640**	,530**	1
	Sig. (bilateral)	,000	,001	
	N	39	39	39

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

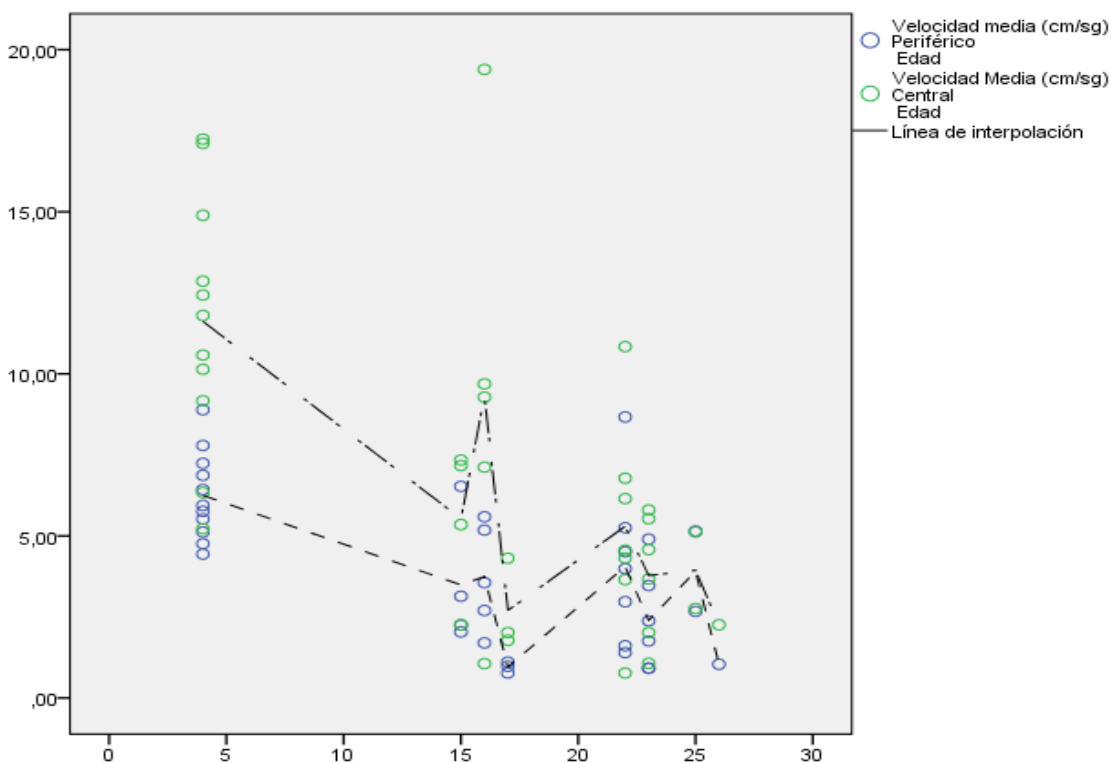


Ilustración 27. Motilidad en campo abierto. Velocidad media de movimiento voluntario



4.3.1.2.2.5 Actividad Global en Campo Abierto.

La actividad global disminuye con la edad pero sin presentar significación estadística

Correlaciones

		Actividad Global (cm ² /sg) OF
Edad	C. Pearson	-,139
	Sig. (bilateral)	,194
	N	89

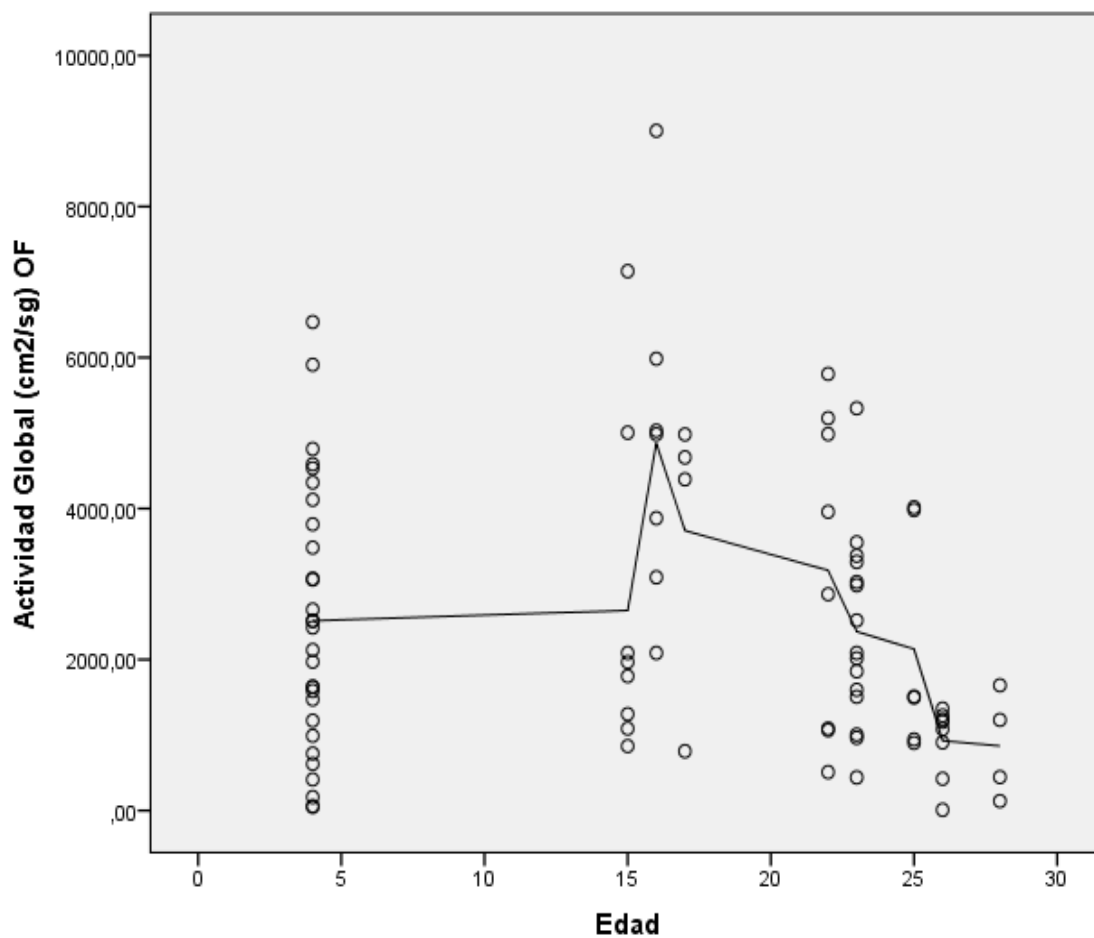


Ilustración 28. Motilidad y capacidad física. Actividad Global en campo abierto.

4.3.1.2.2.6 Signos neuromotores anómalos en el Campo Abierto.

Sus movimientos son lentos, no hay en general signos de discapacidad locomotora aunque aparecen episodios de tremor en el inicio del movimiento que en numerosas ocasiones no se pueden asociar a un grupo estadísticamente significativo.

4.3.1.2.3 Motilidad y capacidad física. Ansiedad; Parámetros medidos en Laberinto Acuático de Morris.

4.3.1.2.3.1 Permanencia en zona periférica en Laberinto Acuático. Signo de tigmotaxis en Laberinto Acuático

- Tiempo de permanencia.

Con la edad aumenta tanto el porcentaje tiempo que permanece en la zona periférica como el porcentaje de distancia recorrido en la zona periférica con un coeficiente de C. Pearson positiva= 0,459 $p < 0,01$ en el porcentaje tiempo que permanece en la zona periférica y con un coeficiente de C. Pearson positiva = 0,351 $p < 0,01$ en el caso del porcentaje de distancia recorrido en la zona periférica.

Correlaciones

		Edad	Tiempo (%) Zona Periférica	Distancia (%) Zona Periférica
Edad	C. Pearson	1	,459**	,351**
	Sig. (bilateral)		,000	,000
	N	1409	1408	1408
Tiempo (%) Zona Periférica	C. Pearson	,459**	1	,877**
	Sig. (bilateral)	,000		,000
	N	1408	1408	1408
Distancia (%) Zona Periférica	C. Pearson	,351**	,877**	1
	Sig. (bilateral)	,000	,000	
	N	1408	1408	1408

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

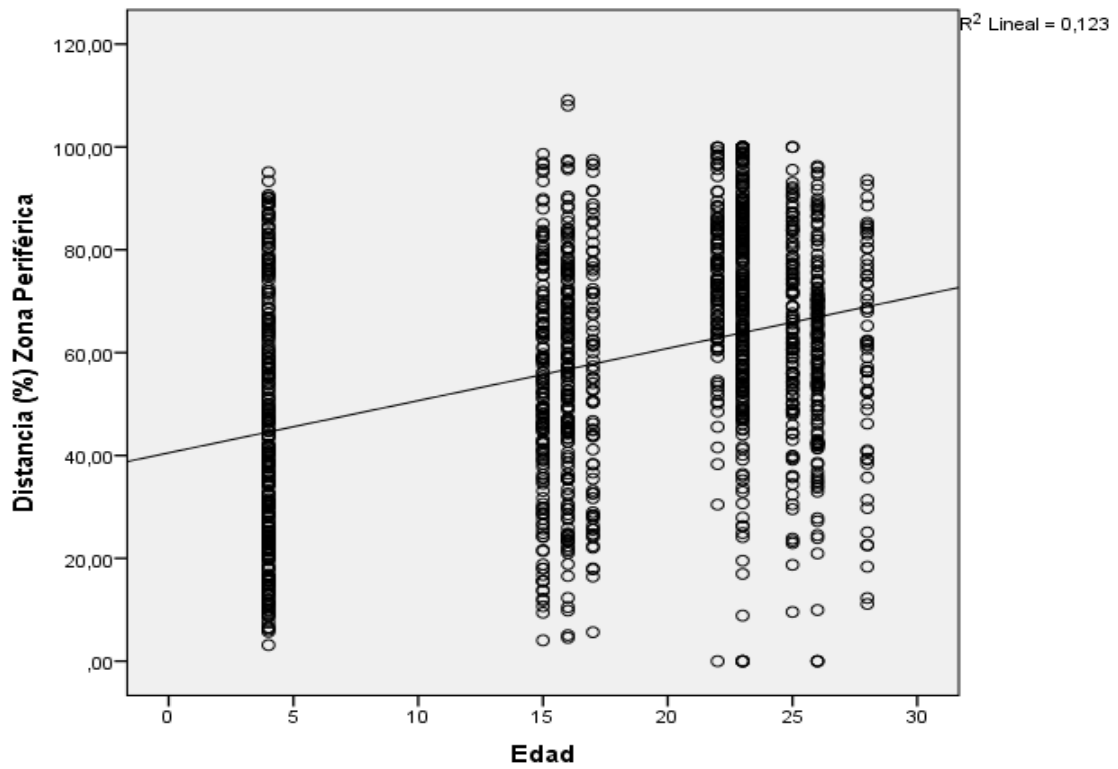
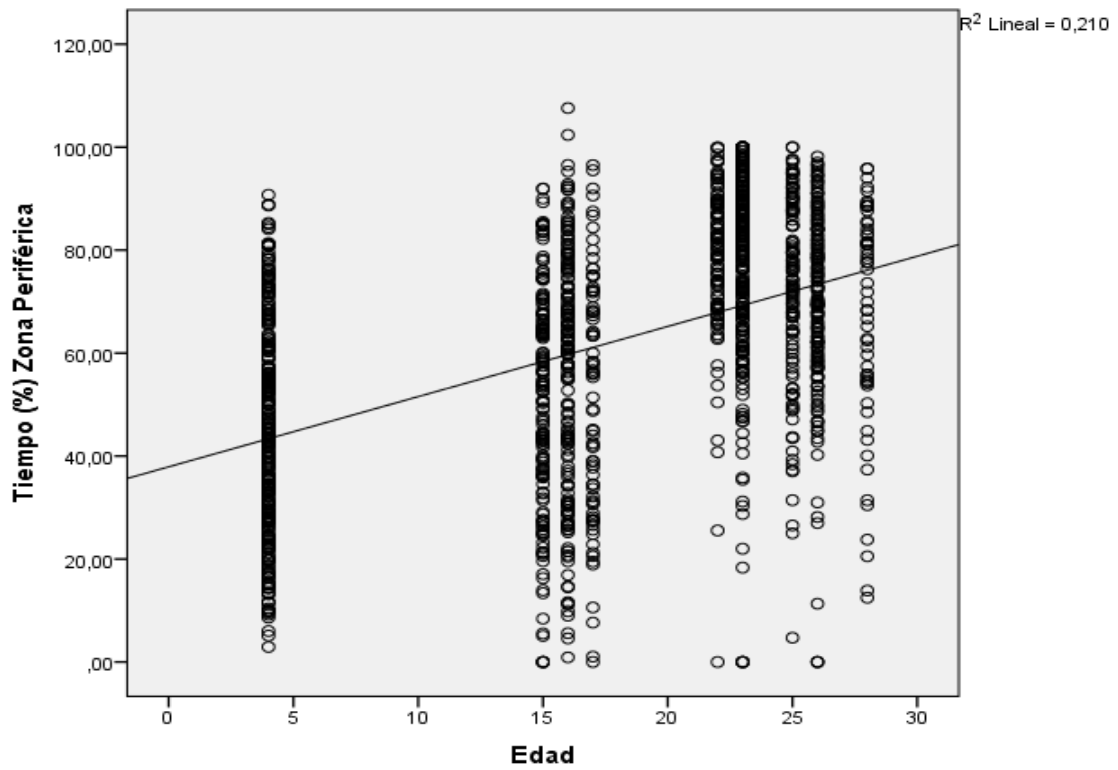


Ilustración 29. Ansiedad. Permanencia en la periferia Laberinto acuático. Cuadro 1 promedio distancia recorrida. Cuadro 2 porcentaje de tiempo

4.3.1.2.3.2 *Velocidad media de natación en Laberinto Acuático.*

Existe una tendencia a disminuir el la velocidad de natación aunque no aparece correlación significativa con el envejecimiento.

Correlaciones

		Velocidad Media (cm/sg)
Edad	C. Pearson	-,026
	Sig. (bilateral)	,333
	N	1408

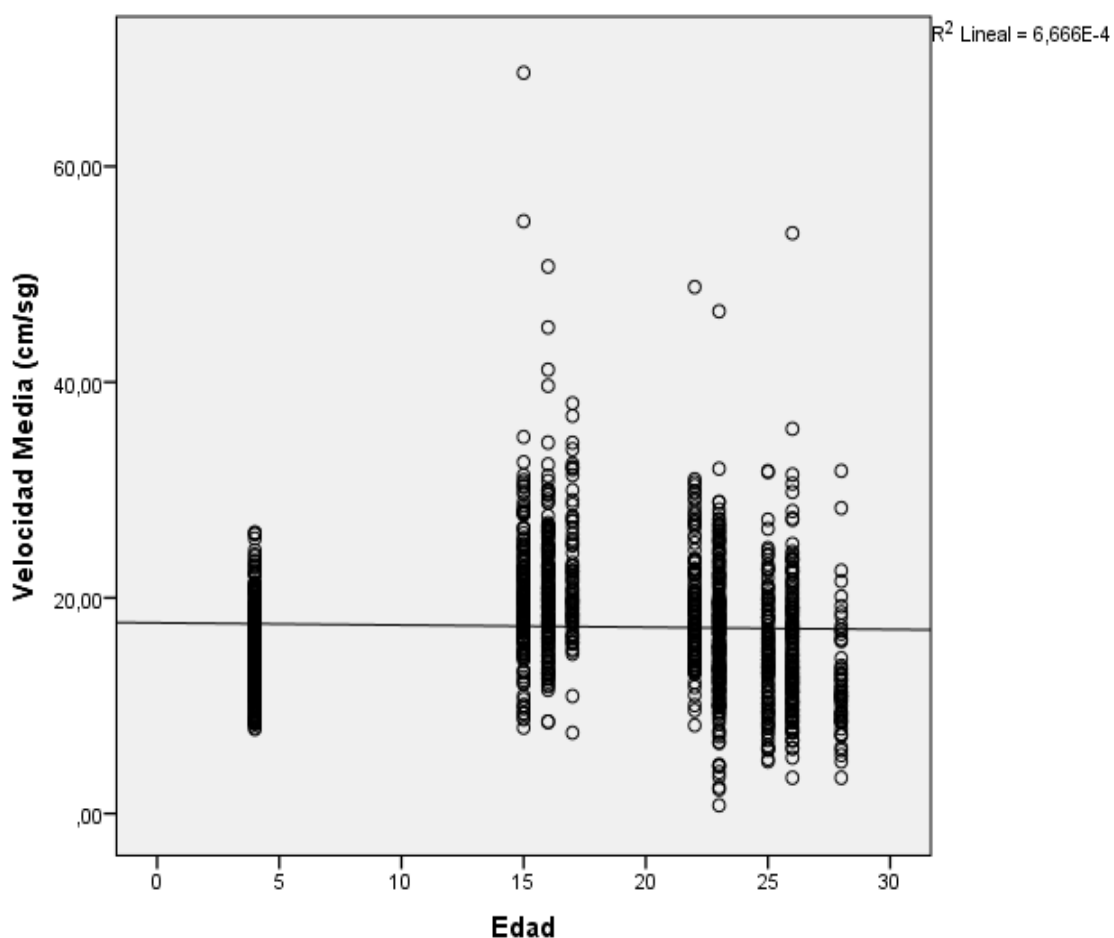


Ilustración 30. Capacidad física. Velocidad media de natación en laberinto acuático.

4.3.1.2.3.3 Actividad total en Laberinto Acuático.

Con la edad disminuye de actividad total de manera significativa. C. Pearson = -0,305 $p < 0,01$

Correlaciones

		Actividad Total
Edad	C. Pearson	-,305**
	Sig. (bilateral)	,000
	N	1380

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

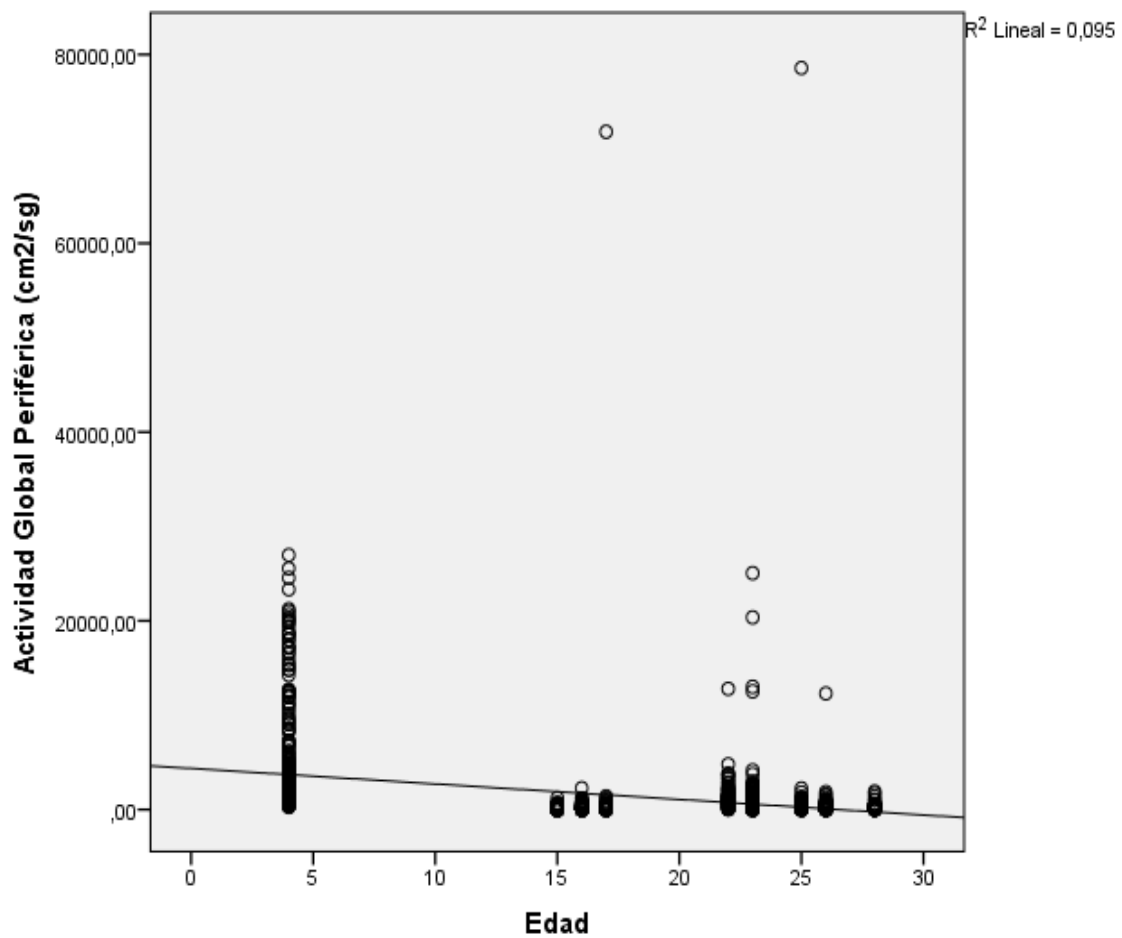


Ilustración 31. Motilidad Capacidad física. Velocidad media de natación. Evolución envejecimiento.

4.3.1.2.3.4 Signos neuromotores anómalos en Laberinto Acuático.

Aparecen casos de animales que manifiestan episodios de natación descoordinada con giros sobre su eje longitudinal y natación a brazadas. Estos casos sin embargo son esporádicos y se presentaron en animales de 22, 25 y 27 meses.

4.3.2 Estudio del efecto y evolución del envejecimiento sometido a dieta con fresas.

Estudio A

1 Comparamos los resultados antes y después de tomar fresas de los mismos parámetros estudiados en la evolución con la edad

2 Comparamos los resultados de los mismos parámetros, entre animales que han tomado dieta y los que no a lo largo de las distintas edades de los animales de estudio.

4.3.2.1 Estudio de parámetros de evaluación neurológica: Estudio A.

Parámetros sensitivos:

Parámetros de somestesis, termalgesia, olfato y audición. No se observa una variación significativa en la valoración de estos resultados. En el caso del olfato se puede ver cierta tendencia a mantenerse en la segunda prueba tras la suplementación lo que es llamativo pero no tiene significación estadística.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: **Sensibilidad piel**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,602 ^a	3	,201	1,493	,220
Intersección	1,252	1	1,252	9,309	,003
FRESAS	,170	1	,170	1,262	,263
FASE	,202	1	,202	1,500	,223
FRESAS * FASE	,082	1	,082	,608	,437
Error	17,487	130	,135		
Total	20,000	134			
Total corregida	18,090	133			

a. R cuadrado = ,033 (R cuadrado corregida = ,011)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: **Sensibilidad vibrisas**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,286 ^a	3	,095	,598	,618
Intersección	2,663	1	2,663	16,703	,000
FRESAS	,012	1	,012	,075	,785
FASE	,267	1	,267	1,676	,198
FRESAS * FASE	,018	1	,018	,115	,735
Error	20,729	130	,159		
Total	24,000	134			
Total corregida	21,015	133			

a. R cuadrado = ,014 (R cuadrado corregida = -,009)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: **Sensibilidad hocico**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,028 ^a	3	,009	,419	,740
Intersección	,067	1	,067	3,001	,086
FRESAS	,000	1	,000	,008	,931
FASE	,021	1	,021	,949	,332
FRESAS * FASE	,016	1	,016	,714	,400
Error	2,905	130	,022		
Total	3,000	134			
Total corregida	2,933	133			

a. R cuadrado = ,010 (R cuadrado corregida = -,013)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: **Reflejo sacudida**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,330 ^a	3	,110	1,185	,318
Intersección	,389	1	,389	4,193	,043
FRESAS	,036	1	,036	,384	,537
FASE	,241	1	,241	2,599	,109
FRESAS * FASE	,003	1	,003	,034	,854
Error	12,066	130	,093		
Total	13,000	134			
Total corregida	12,396	133			

a. R cuadrado = ,027 (R cuadrado corregida = ,004)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: **Reflejo corneal**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,045 ^a	3	,015	1,002	,394
Intersección	,041	1	,041	2,763	,099
FRESAS	,005	1	,005	,327	,568
FASE	,041	1	,041	2,763	,099
FRESAS * FASE	,005	1	,005	,327	,568
Error	1,926	130	,015		
Total	2,000	134			
Total corregida	1,970	133			

a. R cuadrado = ,023 (R cuadrado corregida = ,000)

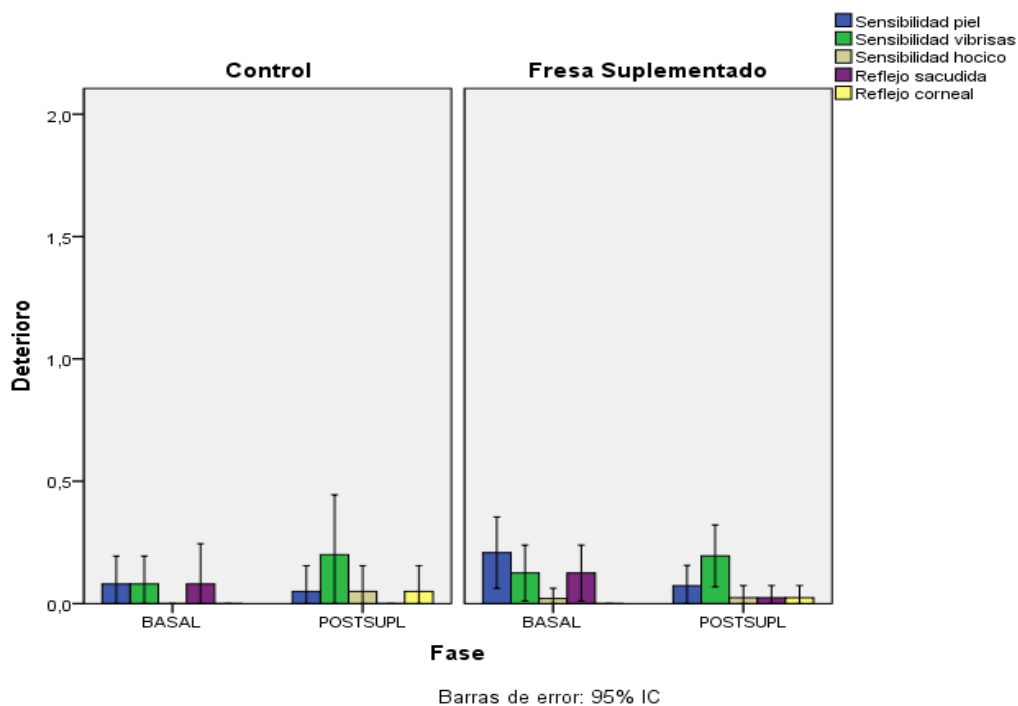
Somestesis. Sensibilidad piel

Ilustración 32. Evaluación neurológica. Somestesis, sensibilidad de la piel. Estudio A

Resultados

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: **Audición**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,676 ^a	3	,559	1,681	,174
Intersección	8,968	1	8,968	26,990	,000
FRESAS	,495	1	,495	1,490	,224
FASE	,820	1	,820	2,466	,119
FRESAS * FASE	,064	1	,064	,192	,662
Error	43,197	130	,332		
Total	53,000	134			
Total corregida	44,873	133			

a. R cuadrado = ,037 (R cuadrado corregida = ,015)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: **Olfato**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,499 ^a	3	,500	1,310	,274
Intersección	13,649	1	13,649	35,787	,000
FRESAS	,848	1	,848	2,223	,138
FASE	,110	1	,110	,288	,592
FRESAS * FASE	,493	1	,493	1,292	,258
Error	49,583	130	,381		
Total	69,000	134			
Total corregida	51,082	133			

a. R cuadrado = ,029 (R cuadrado corregida = ,007)

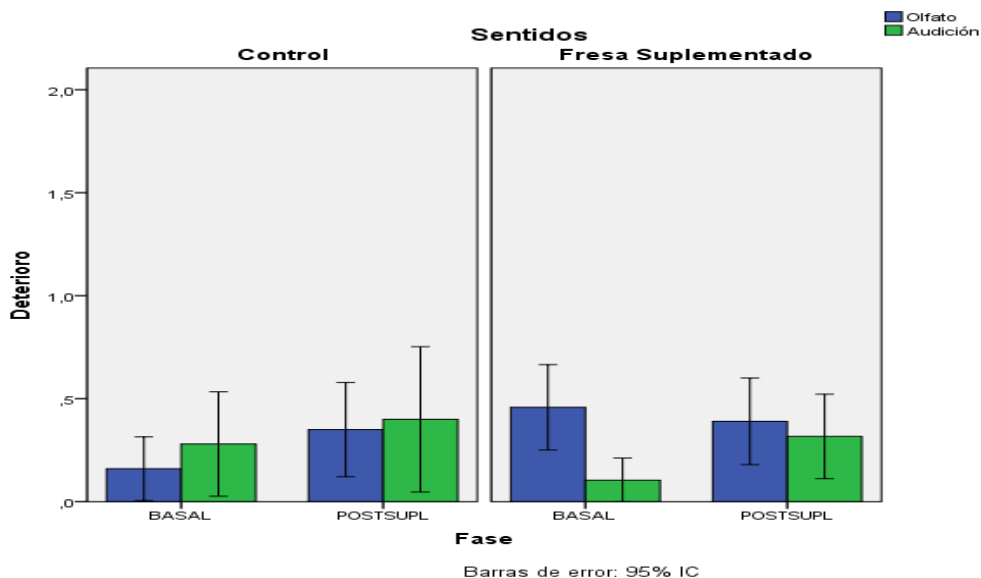


Ilustración 33. Evaluación neurológica. Olfato y oído. Estudio A

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: **Hotplate anterior**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	25,428 ^a	3	8,476	,326	,806
Intersección	23970,873	1	23970,873	922,785	,000
FRESAS	13,365	1	13,365	,514	,474
FASE	11,191	1	11,191	,431	,513
FRESAS * FASE	7,440	1	7,440	,286	,593
Error	3376,964	130	25,977		
Total	31063,494	134			
Total corregida	3402,392	133			

a. R cuadrado = ,007 (R cuadrado corregida = -,015)

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: **Hotplate posterior**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	456,120 ^a	3	152,040	3,753	,013
Intersección	36868,320	1	36868,320	910,149	,000
FRESAS	6,816	1	6,816	,168	,682
FASE	280,930	1	280,930	6,935	,009
FRESAS * FASE	43,800	1	43,800	1,081	,300
Error	5266,039	130	40,508		
Total	48550,839	134			
Total corregida	5722,159	133			

a. R cuadrado = ,080 (R cuadrado corregida = ,058)

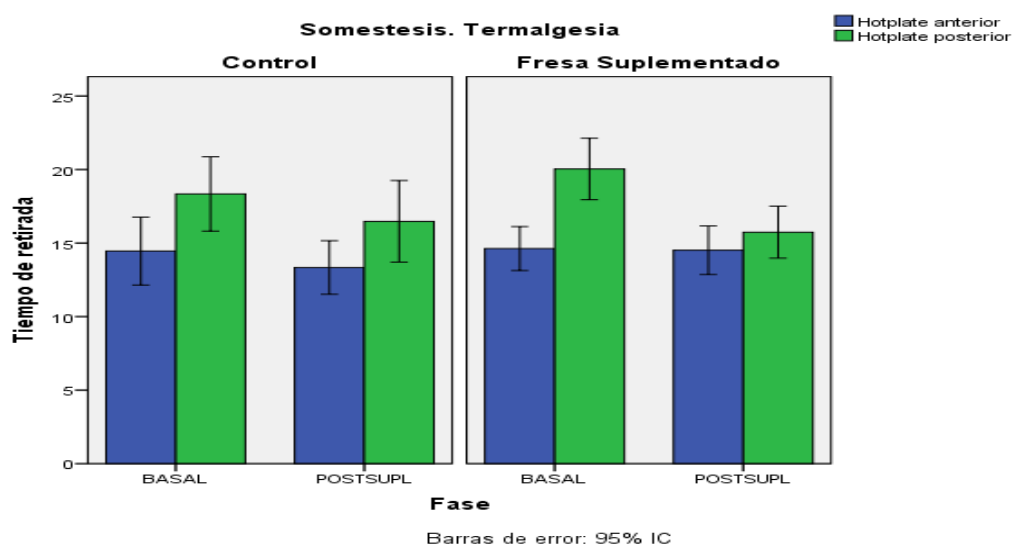


Ilustración 34. Evaluación neurológica. Termalgesia. Estudio A

Resultados

Estudio del deterioro de los parámetros sensitivos con la edad.

Parámetros sensitivos

Observamos que el efecto de la suplementación no produce variación

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
1 (Constante)	-,142	,139		-1,021	,312
Edad	,009	,006	,197	1,508	,137
Suplementación Fresa	,004	,069	,007	,056	,956

a. Variable dependiente: **Sensibilidad piel**

1 (Constante)	-,195	,243		-,801	,426
Edad	,019	,011	,231	1,772	,082
Suplementación Fresa	-,045	,121	-,048	-,369	,713

a. Variable dependiente: **Sensibilidad vibrisas**

1 (Constante)	-,072	,100		-,718	,476
Edad	,006	,005	,175	1,329	,189
Suplementación Fresa	-,038	,050	-,100	-,761	,450

a. Variable dependiente: **Sensibilidad hocico**

1 (Constante)	-,061	,072		-,845	,402
Edad	,003	,003	,122	,922	,360
Suplementación Fresa	,018	,036	,068	,511	,611

a. Variable dependiente: **Reflejo sacudida**

1 (Constante)	,083	,101		,815	,418
Edad	-,002	,005	-,047	-,352	,726
Suplementación Fresa	-,022	,051	-,059	-,442	,660

a. Variable dependiente: **Reflejo corneal**

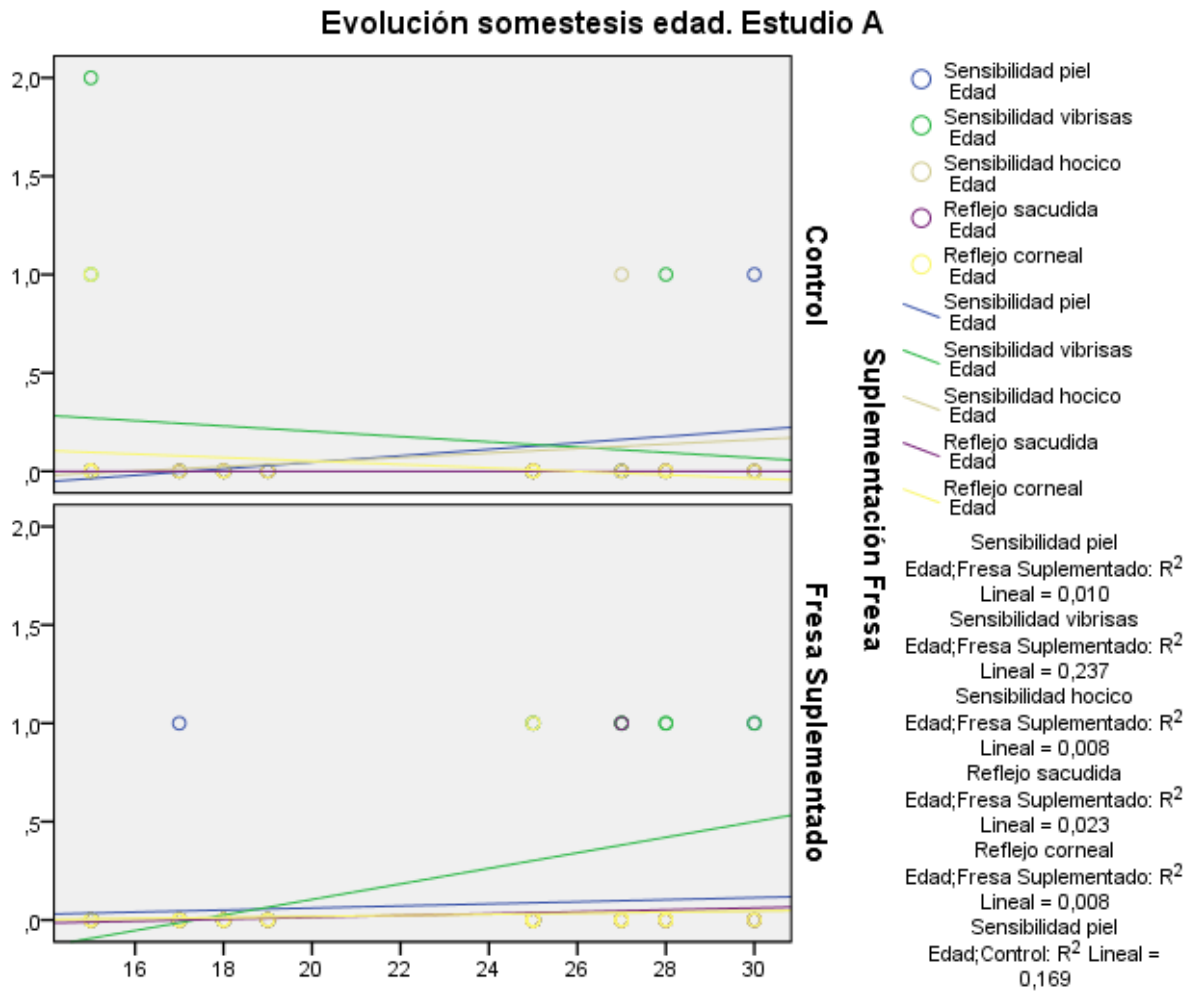


Ilustración 35. Evaluación neurológica. Somestesis sensibilidad de la piel estudio del deterioro con la edad. Estudio A

Sentidos olfato y oído, evolución con la edad.

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes estandarizados		no	t	Sig.
	B	Error típ.	Coeficientes tipificados		
1 (Constante)	,626	,343		1,823	,073
1 Edad	-,014	,016	-,116	-,877	,384
1 Suplementación Fresa	,068	,171	,053	,398	,692

a. Variable dependiente: **Olfato**

1 (Constante)	-,659	,354		-1,861	,068
1 Edad	,052	,016	,400	3,265	,002
1 Suplementación Fresa	-,190	,176	-,132	-1,077	,286

a. Variable dependiente: **Audición**

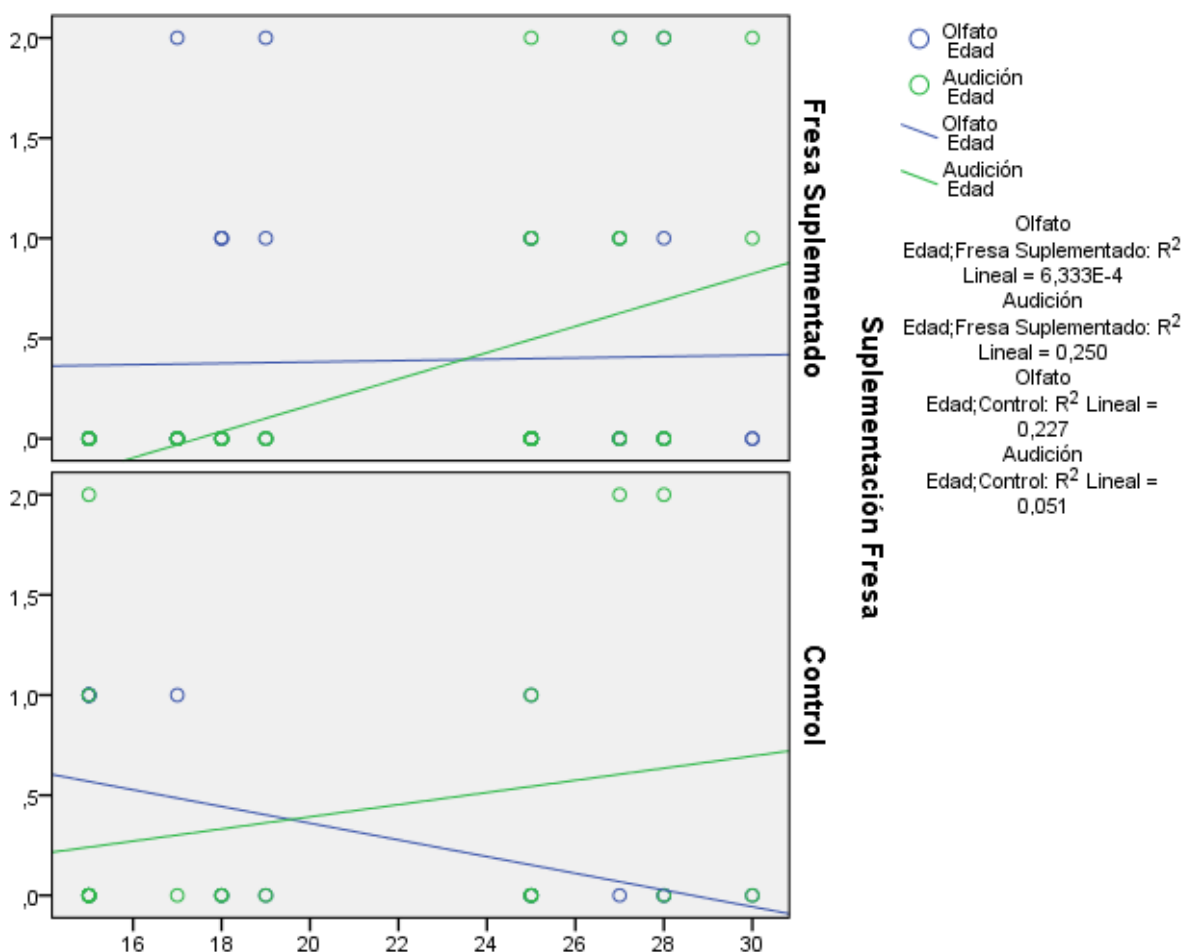


Ilustración 36. Evaluación neurológica. Deterioro de los sentidos olfato y audición con la edad. Estudio A

Termalgesia

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	HOTPLATEANT_seg	61,002 ^a	3	20,334	,708	,550
	HOTPLATEpost_seg	425,281 ^b	3	141,760	3,044	,032
Intersección	HOTPLATEANT_seg	17414,422	1	17414,422	606,139	,000
	HOTPLATEpost_seg	27529,114	1	27529,114	591,176	,000
FRESAS	HOTPLATEANT_seg	,096	1	,096	,003	,954
	HOTPLATEpost_seg	,212	1	,212	,005	,946
FASE	HOTPLATEANT_seg	60,694	1	60,694	2,113	,149
	HOTPLATEpost_seg	208,638	1	208,638	4,480	,037
FRESAS * FASE	HOTPLATEANT_seg	14,708	1	14,708	,512	,476
	HOTPLATEpost_seg	37,989	1	37,989	,816	,369
Error	HOTPLATEANT_seg	2987,929	104	28,730		
	HOTPLATEpost_seg	4842,936	104	46,567		
Total	HOTPLATEANT_seg	26081,892	108			
	HOTPLATEpost_seg	41821,658	108			
Total corregida	HOTPLATEANT_seg	3048,931	107			
	HOTPLATEpost_seg	5268,217	107			

a. R cuadrado = ,020 (R cuadrado corregida = -,008)

b. R cuadrado = ,081 (R cuadrado corregida = ,054)

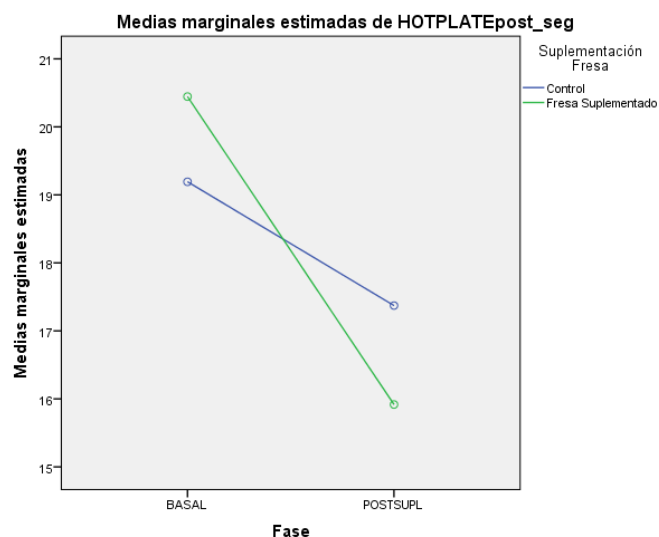
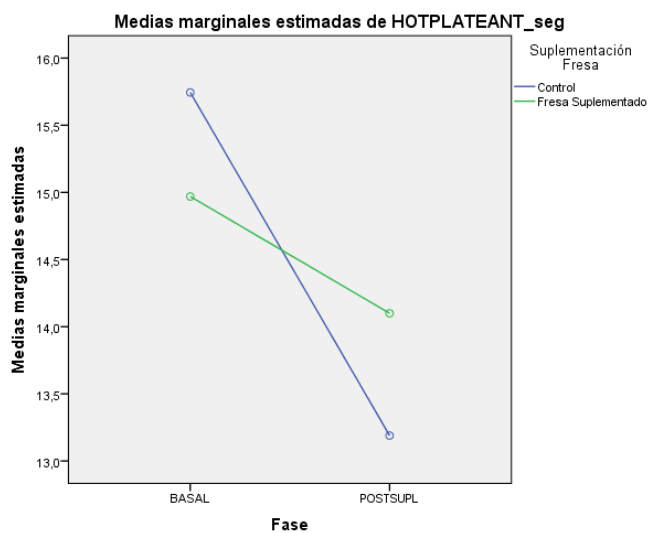


Ilustración 37. Evaluación neurológica. Termalgesia comparación pre y postsuplementación. Estudio A

Evolución de termalgesia con la edad.

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
1 (Constante)	10,553	2,692		3,921	,000
Edad	,138	,122	,148	1,130	,263
Suplementación Fresa	,893	1,340	,087	,666	,508

a. Variable dependiente: **Hotplate anterior**

1 (Constante)	11,320	3,123		3,625	,001
Edad	,255	,141	,234	1,804	,076
Suplementación Fresa	-1,257	1,555	-,105	-,809	,422

a. Variable dependiente: **Hotplate posterior**

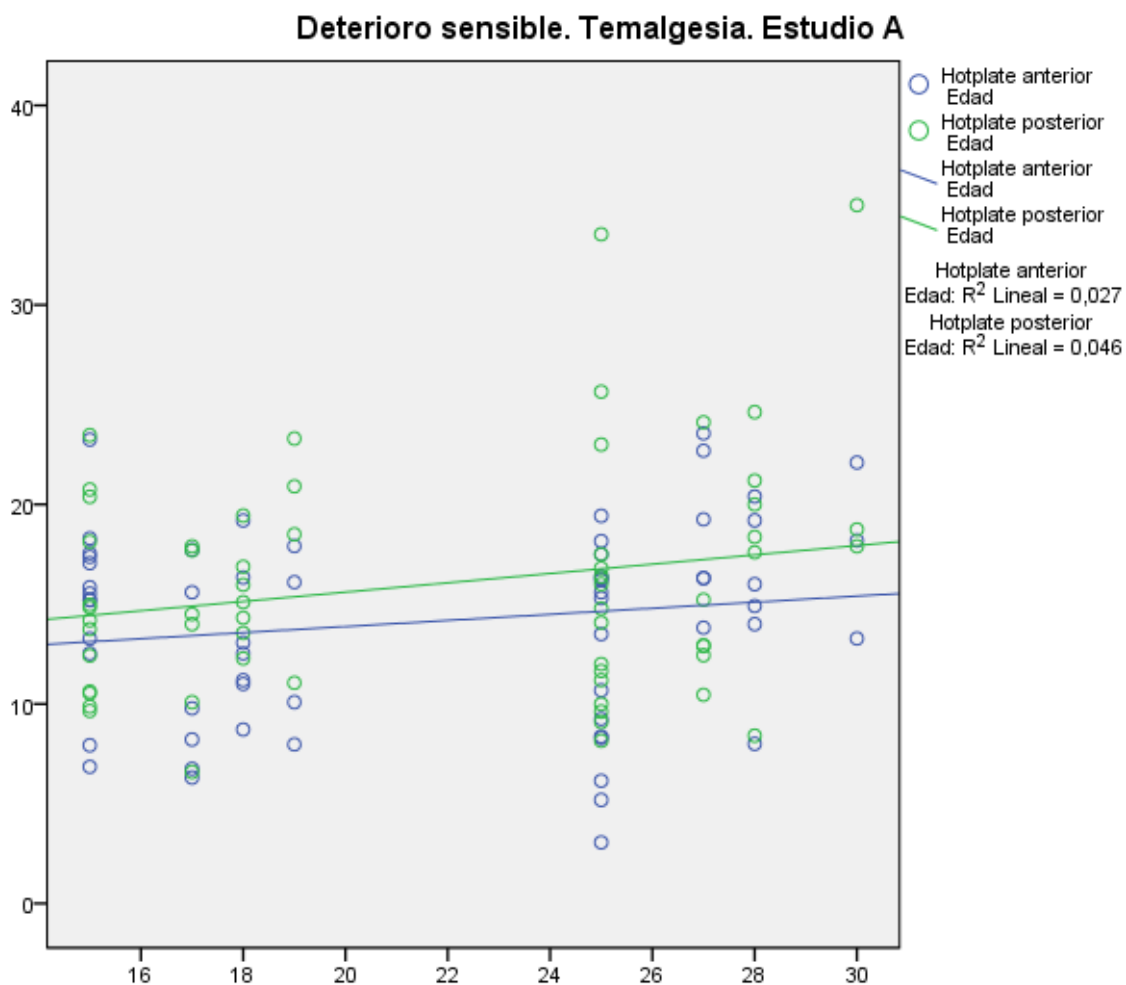


Ilustración 38. Evaluación neurológica. Deterioro sensible con la edad, análisis de termalgesia. Estudio A



Percepción y coordinación: propiocepción reflejos y equilibrio

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Equilibrio en tabla	1,959a	3	,653	1,308	,275
	Equilibrio plano inclinado	7,941b	3	2,647	4,018	,009
	Reflejo enderezamiento	,070c	3	,023	,787	,503
Intersección	Equilibrio en tabla	56,760	1	56,760	113,693	,000
	Equilibrio plano inclinado	125,167	1	125,167	190,012	,000
	Reflejo enderezamiento	,144	1	,144	4,886	,029
FASE	Equilibrio en tabla	,040	1	,040	,079	,779
	Equilibrio plano inclinado	,230	1	,230	,349	,556
	Reflejo enderezamiento	,027	1	,027	,897	,345
FRESAS	Equilibrio en tabla	,014	1	,014	,028	,868
	Equilibrio plano inclinado	4,068	1	4,068	6,175	,014
	Reflejo enderezamiento	,012	1	,012	,399	,529
FASE * FRESAS	Equilibrio en tabla	1,890	1	1,890	3,786	,054
	Equilibrio plano inclinado	3,047	1	3,047	4,625	,033
	Reflejo enderezamiento	,012	1	,012	,399	,529
Error	Equilibrio en tabla	64,402	129	,499		
	Equilibrio plano inclinado	84,977	129	,659		
	Reflejo enderezamiento	3,810	129	,030		
Total	Equilibrio en tabla	130,000	133			
	Equilibrio plano inclinado	251,000	133			
	Reflejo enderezamiento	4,000	133			
Total corregida	Equilibrio en tabla	66,361	132			
	Equilibrio plano inclinado	92,917	132			
	Reflejo enderezamiento	3,880	132			

a. R cuadrado = ,030 (R cuadrado corregida = ,007)

b. R cuadrado = ,085 (R cuadrado corregida = ,064)

c. R cuadrado = ,018 (R cuadrado corregida = -,005)

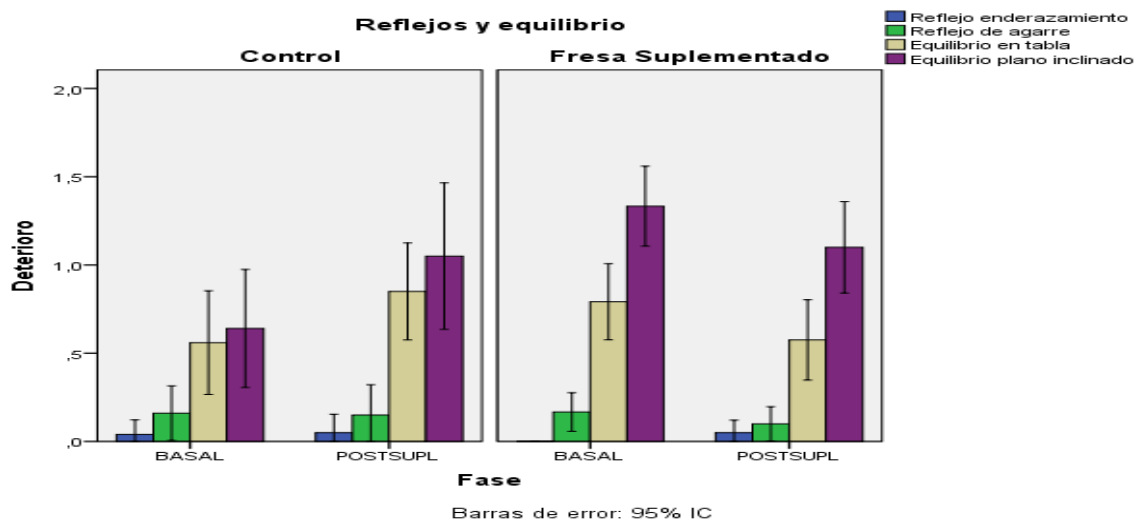


Ilustración 39. Evaluación neurológica. Comparación pre y postsuplementación de equilibrio y reflejos relacionados con la propiocepción. Estudio A

Evolución con la edad.

Coefficientes^a

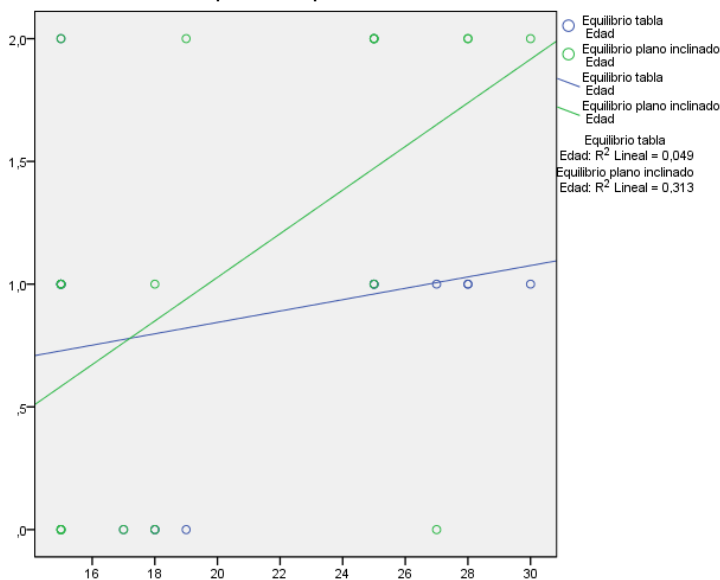
Modelo		Coeficientes estandarizados		no	Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta			
1	(Constante)	,081	,360			,224	,823
	Edad	,038	,016		,293	2,330	,023
	Suplementación Fresa	-,342	,179		-,240	-1,908	,061

a. Variable dependiente: **Equilibrio en tabla**

1	(Constante)	,248	,456			,543	,589
	Edad	,040	,021		,248	1,919	,060
	Suplementación Fresa	-,009	,227		-,005	-,039	,969

a. Variable dependiente: **Equilibrio plano inclinado**

Evolución pruebas equilibrio edad. Controles. Estudio A



Evolución pruebas equilibrio edad. Suplementados. Estudio A

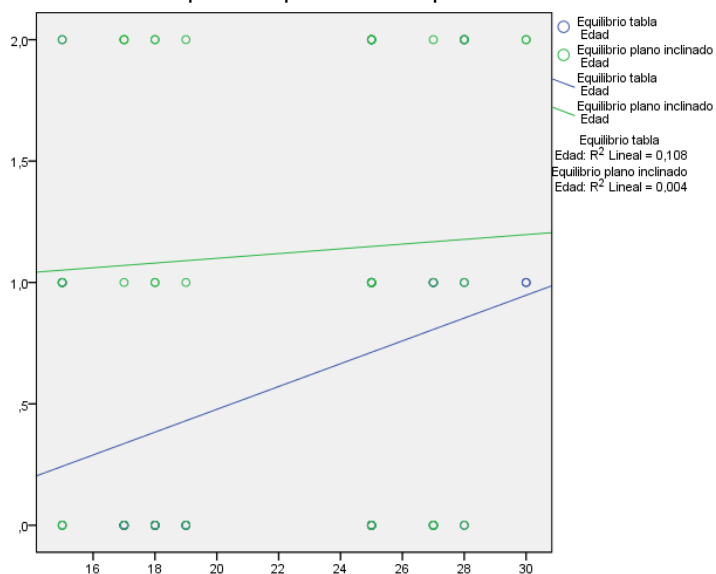


Ilustración 40. Evaluación neurológica. Deterioro con la edad de equilibrio. Estudio A



Pruebas de los efectos inter-sujetos

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Reacción post. TDch	,920 ^a	3	,307	1,409	,243
	Reacción post. TIzq	,120 ^b	3	,040	,130	,942
	Reacción post. DDch	,070 ^c	3	,023	1,583	,197
	Reacción post DIzq	,010 ^d	3	,003	,093	,964
Intersección	Reacción post. TDch	2,899	1	2,899	13,321	,000
	Reacción post. TIzq	5,908	1	5,908	19,220	,000
	Reacción post. DDch	,018	1	,018	1,250	,266
	Reacción post DIzq	,181	1	,181	4,855	,029
FASE	Reacción post. TDch	,219	1	,219	1,007	,318
	Reacción post. TIzq	,015	1	,015	,050	,823
	Reacción post. DDch	,018	1	,018	1,250	,266
	Reacción post DIzq	,000	1	,000	,009	,925
FRESAS	Reacción post. TDch	,020	1	,020	,093	,761
	Reacción post. TIzq	,068	1	,068	,220	,640
	Reacción post. DDch	,018	1	,018	1,250	,266
	Reacción post DIzq	,004	1	,004	,108	,743
FASE * FRESAS	Reacción post. TDch	,889	1	,889	4,085	,045
	Reacción post. TIzq	,015	1	,015	,050	,823
	Reacción post. DDch	,018	1	,018	1,250	,266
	Reacción post DIzq	,005	1	,005	,141	,708
Error	Reacción post. TDch	28,073	129	,218		
	Reacción post. TIzq	39,654	129	,307		
	Reacción post. DDch	1,900	129	,015		
	Reacción post DIzq	4,802	129	,037		
Total	Reacción post. TDch	32,000	133			
	Reacción post. TIzq	47,000	133			
	Reacción post. DDch	2,000	133			
	Reacción post DIzq	5,000	133			
Total corregida	Reacción post. TDch	28,992	132			
	Reacción post. TIzq	39,774	132			
	Reacción post. DDch	1,970	132			
	Reacción post DIzq	4,812	132			

a. R cuadrado = ,032 (R cuadrado corregida = ,009)

b. R cuadrado = ,003 (R cuadrado corregida = -,020)

c. R cuadrado = ,035 (R cuadrado corregida = ,013)

d. R cuadrado = ,002 (R cuadrado corregida = -,021)

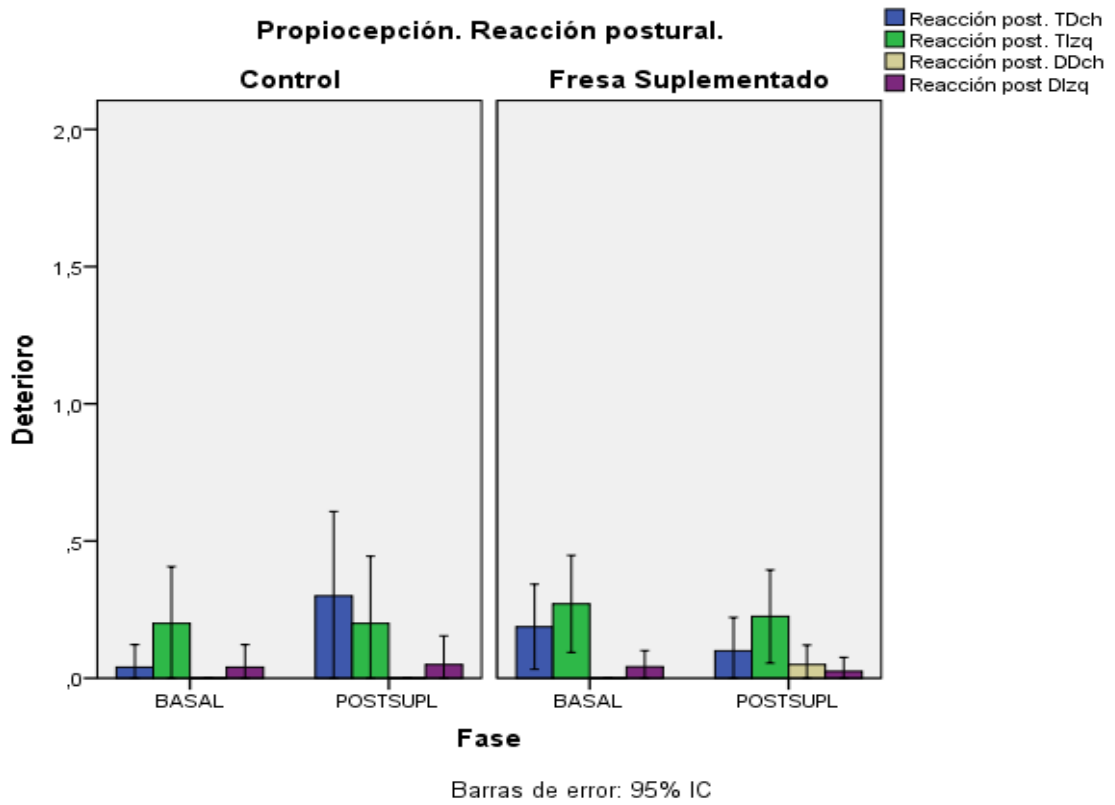


Ilustración 41. Evaluación neurológica. Reflejos relacionados con la propiocepción. Estudio

A

Somestesis. Reacción postural

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
1 (Constante)	-,050	,102		-,489	,627
1 Edad	,005	,005	,141	1,065	,292
1 Suplementación Fresa	-,034	,051	-,090	-,679	,500

a. Variable dependiente: **Reacción post Dzq**

1 (Constante)	-,075	,102		-,734	,466
1 Edad	,004	,005	,106	,800	,427
1 Suplementación Fresa	,043	,050	,113	,851	,398

a. Variable dependiente: **Reacción post. DDch**

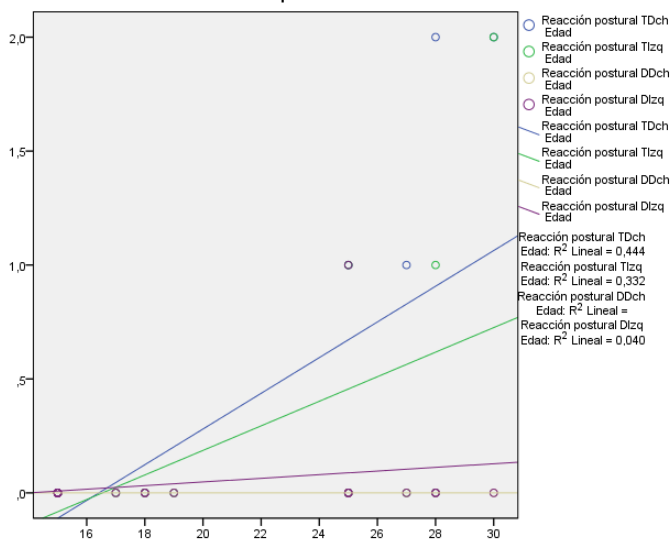
1 (Constante)	-,888	,255		-3,477	,001
1 Edad	,054	,012	,532	4,643	,000
1 Suplementación Fresa	-,077	,126	-,070	-,611	,544

a. Variable dependiente: **Reacción post. Tlzq**

1 (Constante)	-,528	,250		-2,113	,039
1 Edad	,041	,011	,430	3,613	,001
1 Suplementación Fresa	-,278	,123	-,268	-2,249	,028

a. Variable dependiente: **Reacción post. TDch**

Evolución reacciones posturales edad. Controles. Estudio A



Evolución reacciones posturales edad. Suplementados. Estudio A

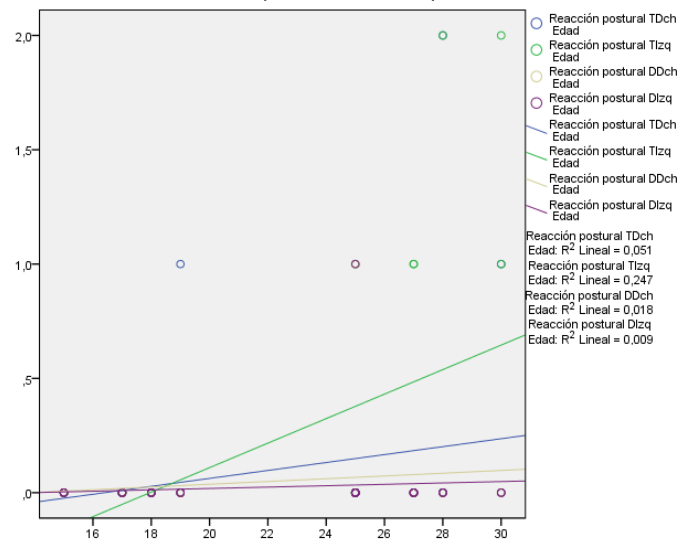


Ilustración 42. Evaluación neurológica. Deterioro de reflejos relacionados con la propiocepción. Estudio A

Esfuerzo Agarre

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: ESFUERZO AGARRE

Origen	Suma de cuadrados tipo III	degl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	116,787 ^a	3	38,929	,599	,617
Intersección	5566,731	1	5566,731	85,688	,000
FASE	5,653	1	5,653	,087	,769
FRESAS	92,509	1	92,509	1,424	,235
FASE * FRESAS	9,129	1	9,129	,141	,709
Error	6756,369	104	64,965		
Total	14958,830	108			
Total corregida	6873,155	107			

a. R cuadrado = ,017 (R cuadrado corregida = -,011)

Estudio A

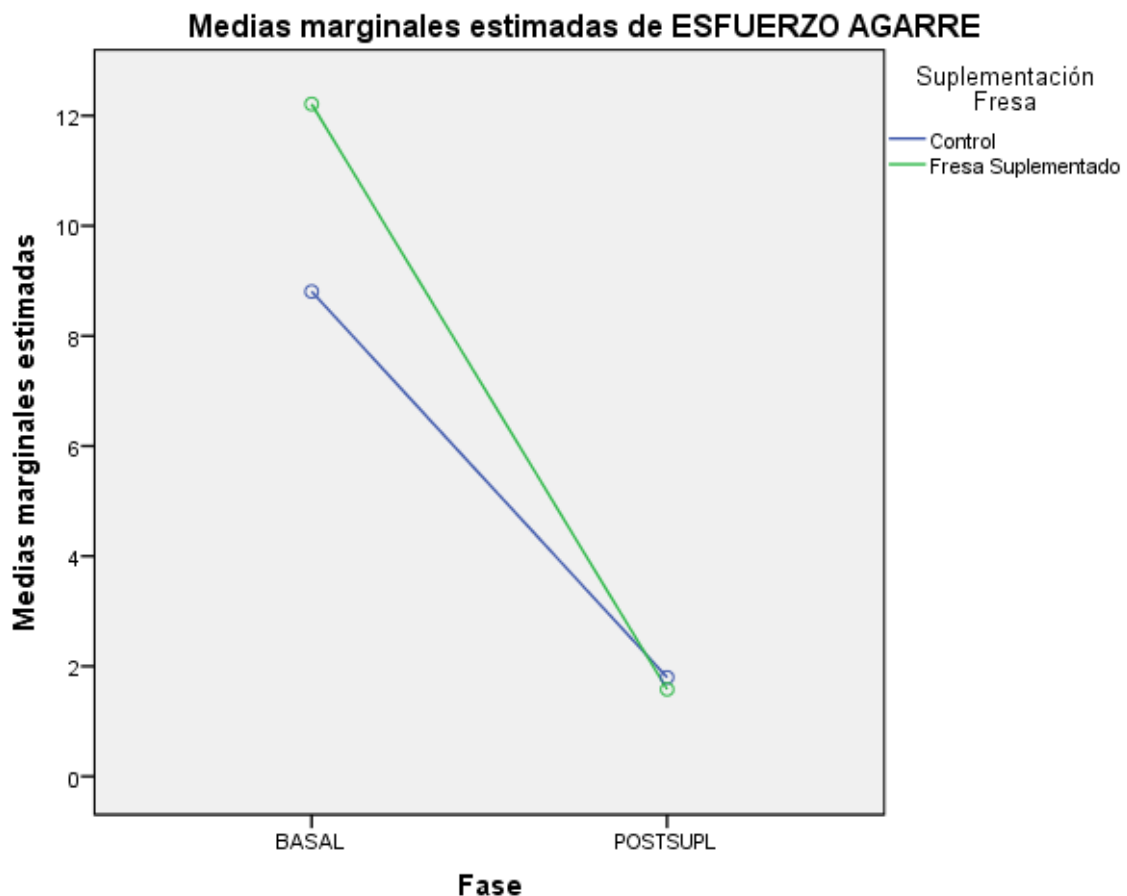


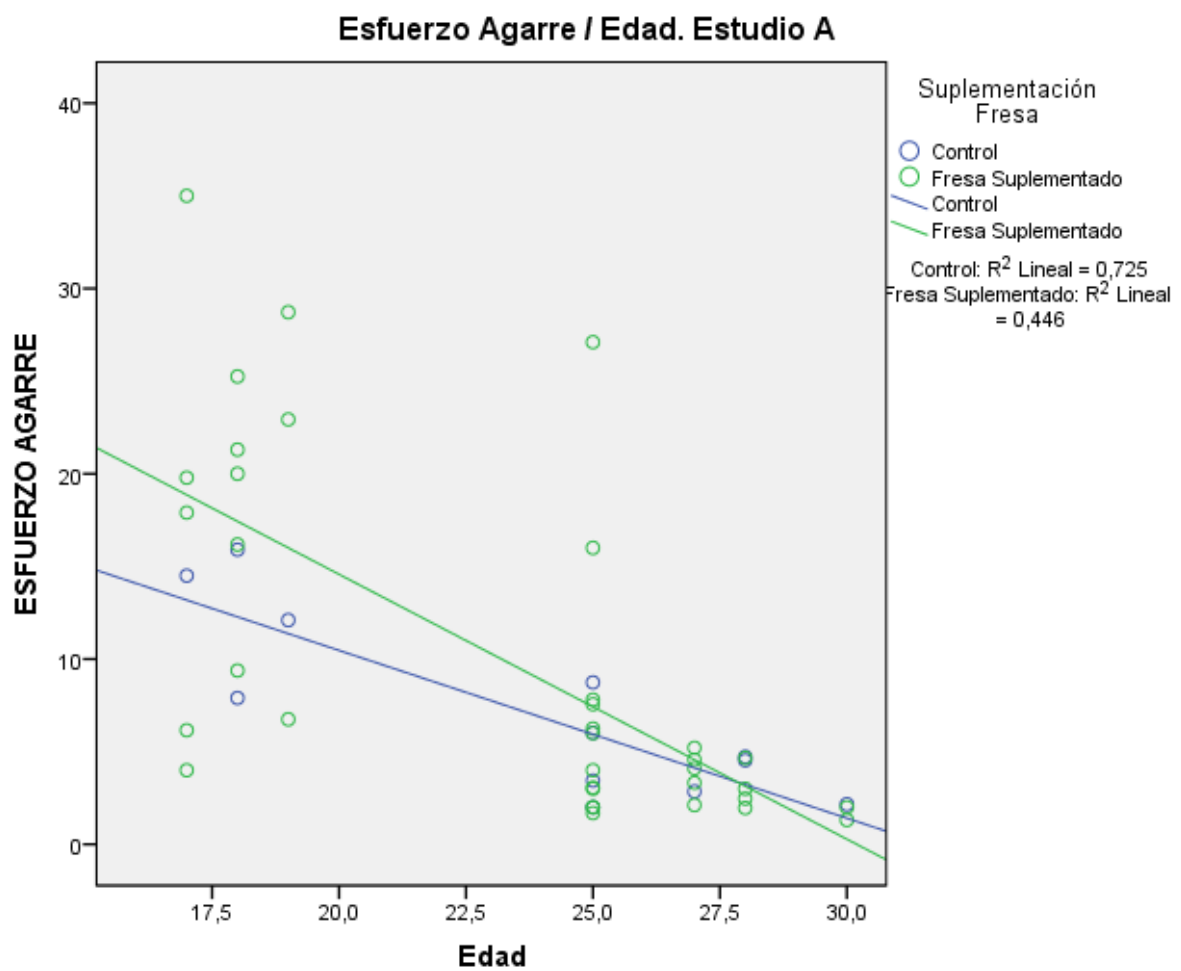
Ilustración 43. Evaluación neurológica. Esfuerzo de agarre al alambre. Estudio A



Evolución de esfuerzo de agarre con la edad

Coeficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
1 (Constante)	37,898	5,366		7,062	,000
Edad	-1,298	,212	-,667	-6,115	,000
Suplementación Fresa	2,201	2,127	,113	1,035	,306

a. Variable dependiente: **ESFUERZO AGARRE**

4.3.2.2 Estudio de parámetros cognitivos: Estudio A

4.3.2.2.1.1 Memoria. Estudio A

Pruebas de laberinto acuático de Morris.

4.3.2.2.1.1.1 Latencia de escape en Laberinto Acuático.

Se observa un mejor rendimiento en la fase posterior a la suplementación por todos los animales $p < 0,01$. En cuanto a la comparación entre animales controles y suplementados la diferencia no es significativa $p > 0,05$.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Latency_to_Target_Seconds_median

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	11027,133 ^a	3	3675,711	9,639	,000
Intersección	250359,206	1	250359,206	656,551	,000
Trial_Fase	7191,414	1	7191,414	18,859	,000
FRESA	3563,723	1	3563,723	9,346	,002
Trial_Fase *	392,248	1	392,248	1,029	,311
Error	159393,749	418	381,325		
Total	459592,599	422			
Total corregida	170420,882	421			

a. R cuadrado = ,065 (R cuadrado corregida = ,058)

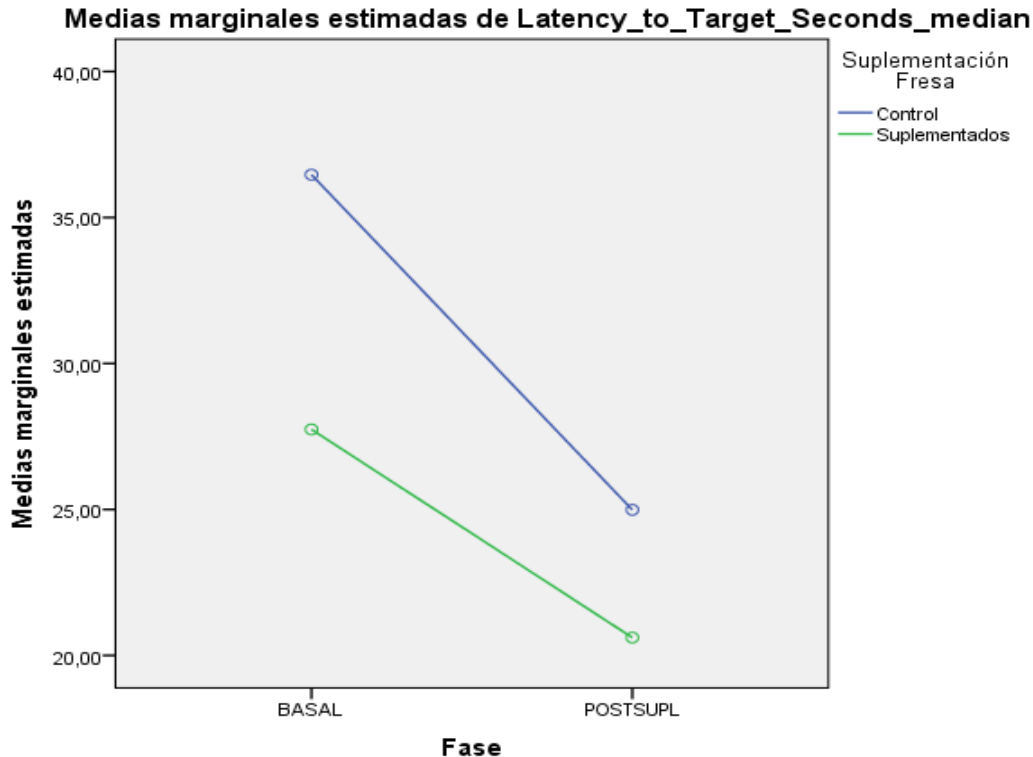


Ilustración 45. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Resultados basal y posterior suplementación. Latencia de escape. Estudio A. 0=Controles. 1= suplementados.



- Evolución durante el envejecimiento.

Estudiando la evolución de este parámetro con el envejecimiento las variaciones de los suplementados con los controles parece tener una tendencia a disminuir la latencia con la edad (-7.59 s $p < 0,01$). Lo animales que han tomado suplementación con fresa mantienen unos registros de tiempo menores, respecto a los controles a lo largo de las distintas edades. Este tiene una significación $p < 0,05$.

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
		B	Error típ.	Beta	t	
1	(Constante)	-12,447	7,445		-1,672	,096
	Suplementación Fresa	-7,593	3,132	-,170	-2,424	,016
	Edad	1,798	,309	,408	5,816	,000

a. Variable dependiente: Latencia Escape

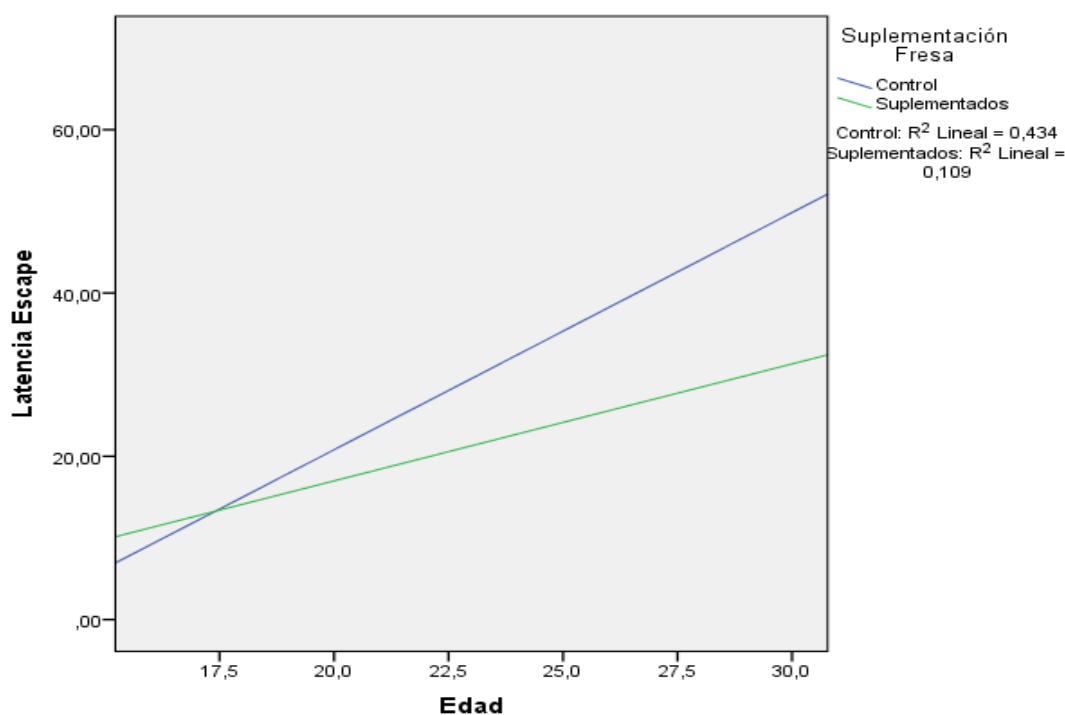


Ilustración 46. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Latencia de escape evolución de resultados basal y posterior a suplementación durante el envejecimiento. Estudio A.

4.3.2.2.1.1.2 Distancia recorrida de escape en Laberinto Acuático.

Aunque existe un descenso de la distancia recorrida más acusado en los animales suplementados que en los controles. Esta diferencia no es significativa. Como en otras ocasiones sí existe mejoría de este parámetro en los animales en la segunda prueba.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Distance_to_Target_median

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2274519,392 ^a	3	758173,131	8,442	,000
Intersección	59384669,650	1	59384669,650	661,244	,000
Trial_Fase	2074143,878	1	2074143,878	23,095	,000
FRESA	205087,253	1	205087,253	2,284	,132
Trial_Fase * FRESA	328525,161	1	328525,161	3,658	,056
Error	37539506,463	418	89807,432		
Total	112357690,769	422			
Total corregida	39814025,855	421			

a. R cuadrado = ,057 (R cuadrado corregida = ,050)

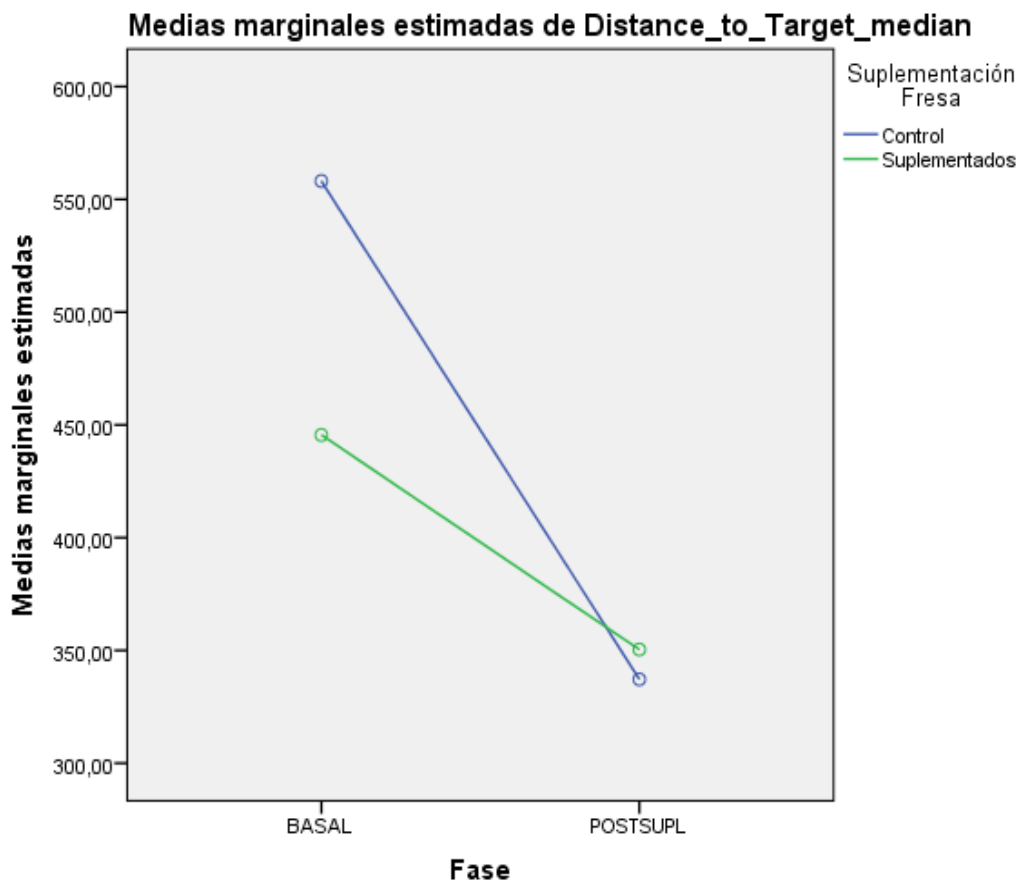


Ilustración 47. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Resultados basal y posterior suplementación. Distancia de escape. Estudio A. azul=Controles. Verde= suplementados



- Evolución durante el envejecimiento.

En cuanto a la evolución de las distancias de escape con el envejecimiento de animales suplementados respecto a los controles, se observa que la regresión entre los resultados de los animales suplementados y los controles ofrece una leve disminución y esta no es significativa $p > 0,05$

Coeficientes^a

Modelo		Coeficientes estandarizados		no	Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta			
1	(Constante)	150,368	103,284			1,456	,147
	Edad	8,515	4,449		,147	1,914	,057
2	(Constante)	172,466	107,358			1,606	,110
	Edad	8,666	4,459		,150	1,944	,054
	Suplementación Fresa	-34,612	45,163		-,059	-,766	,445

a. Variable dependiente: Distancia Escape

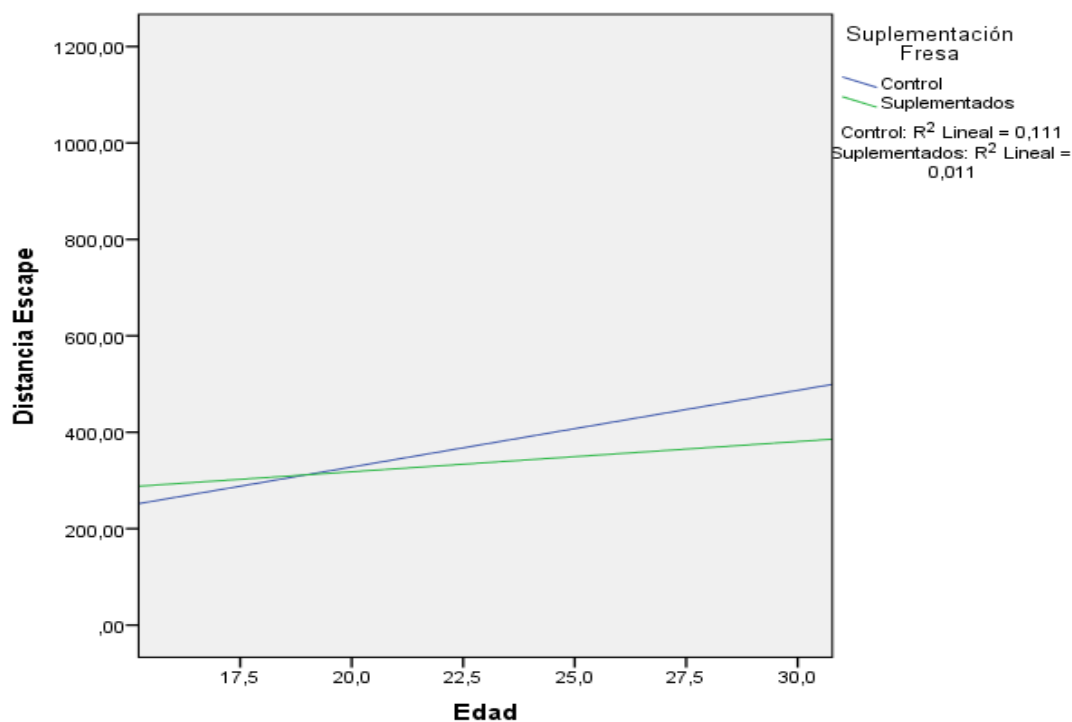


Ilustración 48. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Distancia de escape evolución de resultados basal y posterior a suplementación durante el envejecimiento. Estudio A. azul=Controles.

4.3.2.2.1.1.3 Curva de aprendizaje.

Estudiando la evolución de aprendizaje considerando la distancia que recorren en cada uno de los ensayos del 1º al 4º podemos ver que los animales control tienen un comportamiento de entrada diferente, en el comienzo del ensayo los tiempos y distancias en los distintos días no cambian en la determinación basal.

Observamos que la pendiente de los valores alcanzados desde el primer día de ensayo hasta el cuarto día de ensayo, tanto en latencia como en distancia, mejora tanto en los animales controles como en los suplementados. Podemos además inferir que aunque existe cierta diferencia en patrón de aprendizaje entre unos y otros este se puede deber al azar.

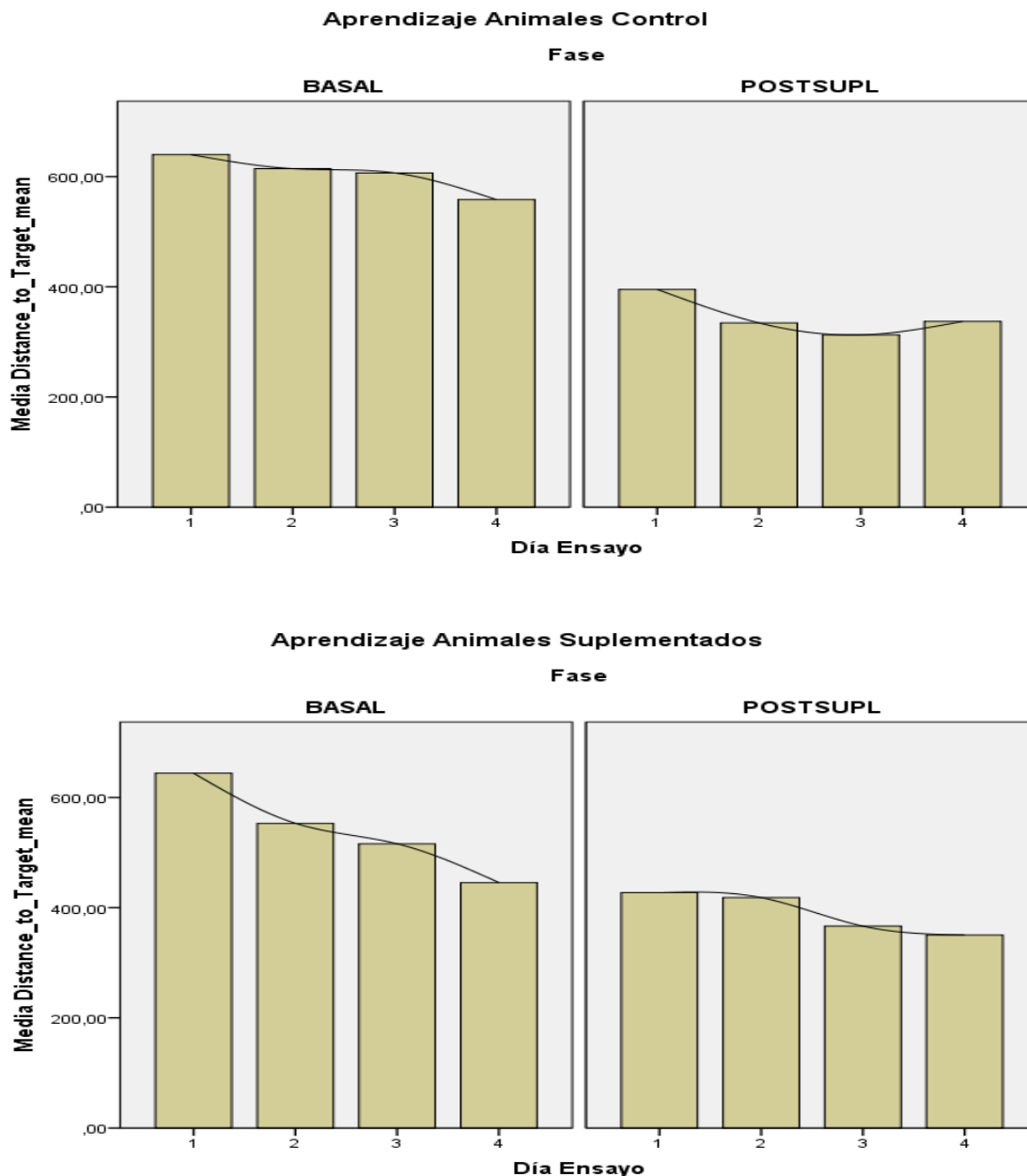
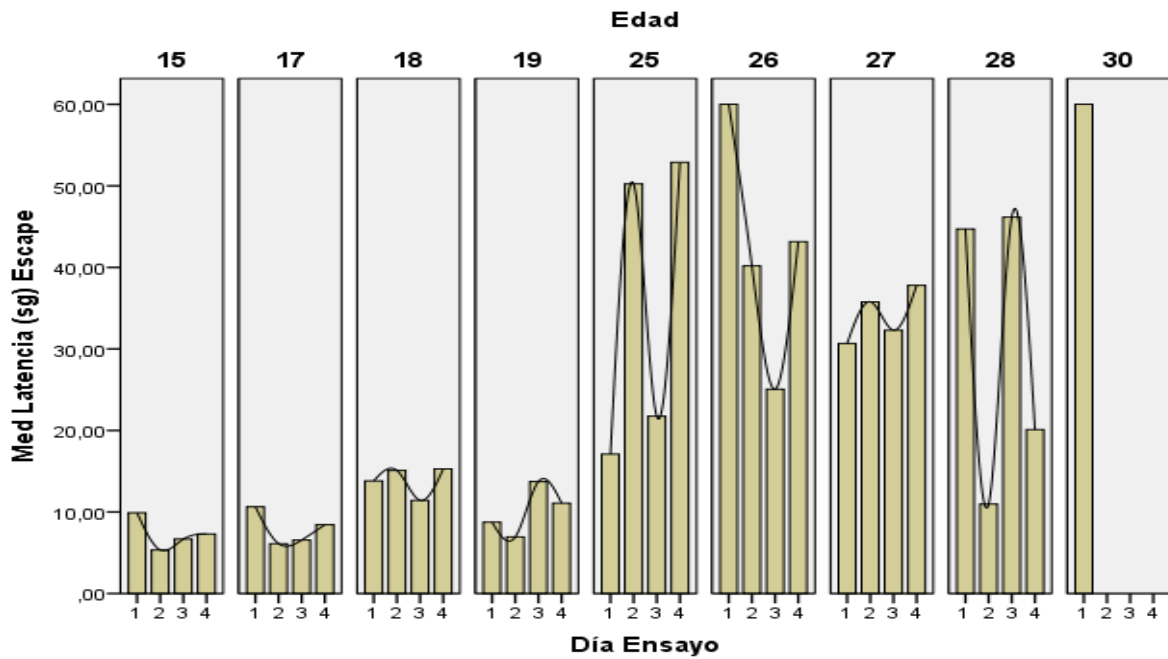


Ilustración 49. Aprendizaje. Comparación de las distancias de escape recorridas entre el primer y cuarto día en las fases basal y posterior a la suplementación enfrentando animales controles y suplementados con fresa. Estudio A



Evolución de tiempos de aprendizaje con la edad animales control



Evolución de tiempos de aprendizaje con la edad. Animales suplementados con fresa.

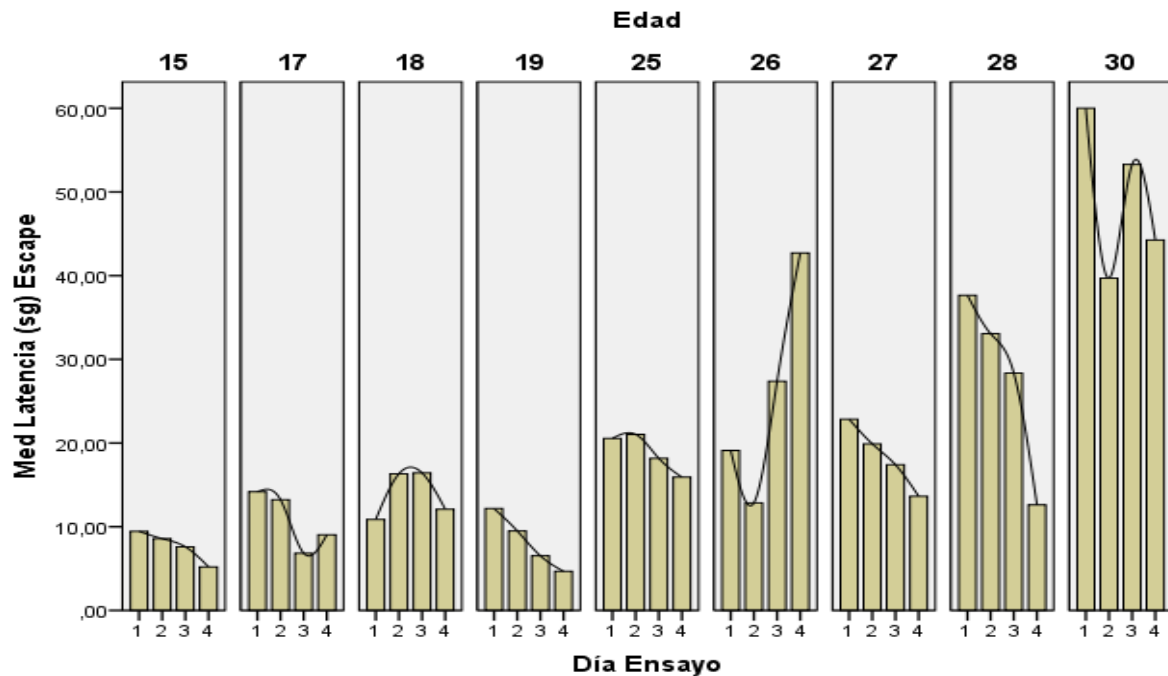
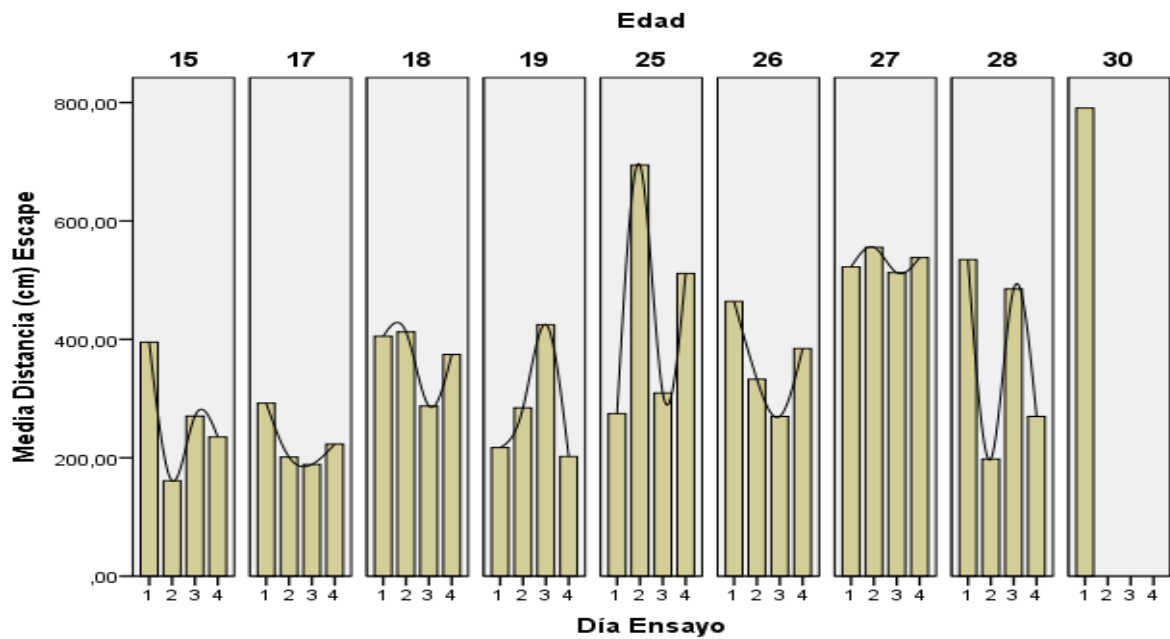


Ilustración 50. Aprendizaje. Estudio de evolución con la edad de las latencias de escape recorridas entre el primer y cuarto día entre animales controles y suplementados con fresa. Estudio A

Evolución de distancias de aprendizaje con la edad. Animales control.



Evolución en distancias de aprendizaje con la edad. Animales suplementados con fresa.

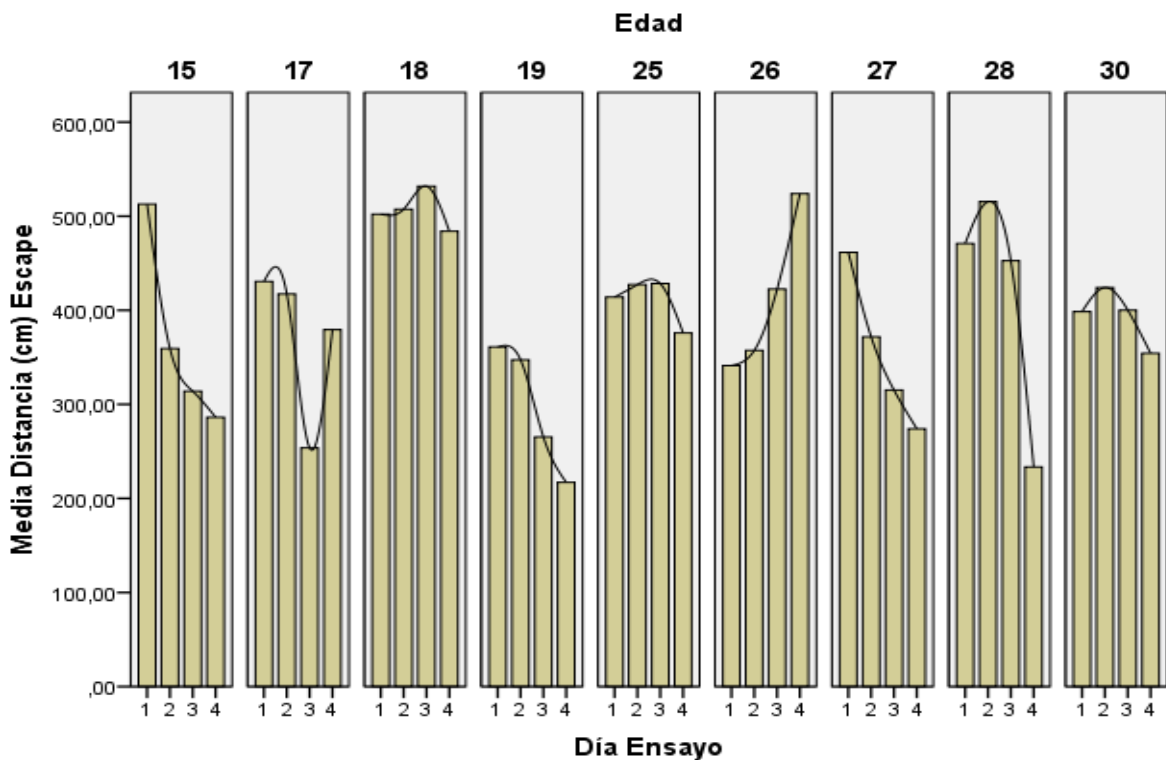


Ilustración 51. Aprendizaje. Estudio de evolución con la edad de las distancias de escape recorridas entre el primer y cuarto día entre animales controles y suplementados con fresa. Estudio A



4.3.2.2.1.1.4 Estrategias de búsqueda en Laberinto Acuático.

No se observan cambios significativos en el porcentaje de estrategias espaciales llevadas a cabo por los animales tratados sobre los no tratados. En este caso no se advierte mejora entre los animales antes y después de la toma de fresa, tampoco hay diferencias entre animales controles y suplementados.

Tabla de frecuencias Estrategia Búsqueda * Fase animales control
Recuento animales control.

		Fase		Total
		BASAL	POSTSUPL	
Estrategia Búsqueda	CHAI	8	14	22
	CIRC	3	2	5
	MAL	0	2	2
	PERI	6	12	18
	PERIREC	2	2	4
	PERITIG	8	0	8
	RAND	14	11	25
	SEAR	5	4	9
	SEARFI	2	0	2
	SPAD	6	2	8
	SPAFC	1	6	7
	SPAI	5	5	10
Total		60	60	120

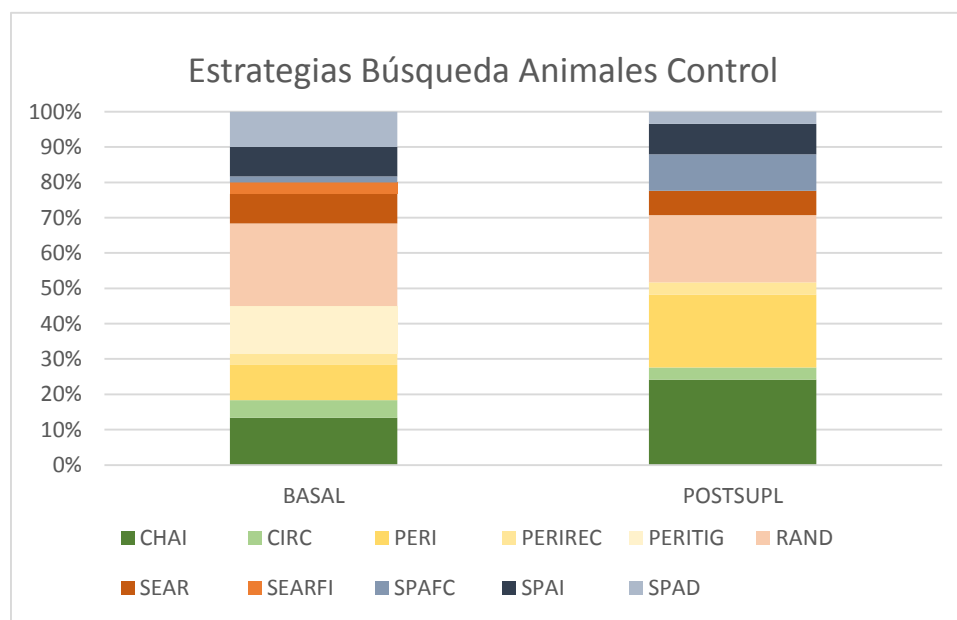


Ilustración 52. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Proporción de estrategias de búsqueda animales controles. Izquierda: determinación basal, derecha posterior a suplementación. Azul= estrategias espaciales. Otros: estrategias no espaciales.

Tabla de contingencia Estrategia Búsqueda * Fase animales suplementados con fresa
Recuento suplementados

		Fase		Total
		BASAL	POSTSUPL	
Estrategia Búsqueda	CHAI	17	35	52
	CIRC	4	6	10
	MAL	2	0	2
	PERI	31	36	67
	PERIREC	4	5	9
	PERITIG	0	3	3
	RAND	45	31	76
	SEAR	16	8	24
	SEARFI	1	1	2
	SPAD	17	29	46
	SPAFC	3	5	8
	SPAI	28	16	44
Total	168	175	343	

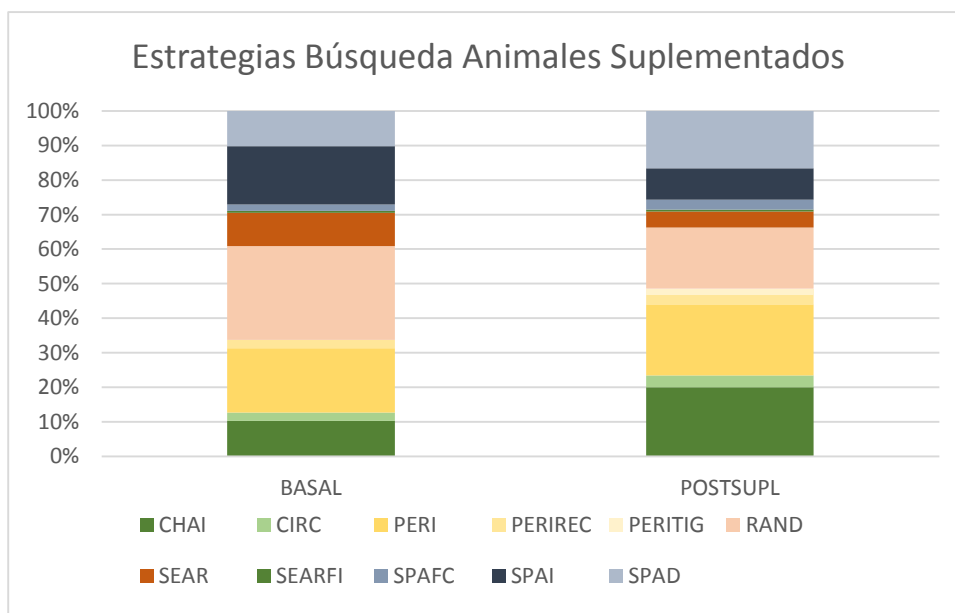


Ilustración 53. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Proporción de estrategias de búsqueda animales suplementados. Izquierda basal, derecha posterior a suplementación. Azul= estrategias espaciales. Otros: estrategias no espaciales.



- Evolución durante el envejecimiento.

Tabla de contingencia Estrategia Búsqueda * Edad
Recuento controles vs. suplementados

Suplementación Fresa		Edad								Total
		15	17	17	22	23	25	26	28	
Control	CHAI	2	3	0	0	1	1	1	0	8
	CIRC	0	1	0	0	1	0	0	1	3
	PERI	0	0	1	1	2	0	1	1	6
	PERIREC	1	0	1	0	0	0	0	0	2
	Estrategia Búsqueda PERITIG	0	0	0	0	8	0	0	0	8
	RAND	2	3	2	1	5	0	1	0	14
	SEAR	0	0	0	0	3	1	1	0	5
	SEARFI	0	0	0	0	0	0	1	1	2
	SPAD	2	0	0	2	0	1	1	0	6
	SPAFC	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	SPAI	1	1	0	0	0	1	2	0	5
Total	8	8	4	4	20	4	8	4	60	
Suplementados	CHAI	5	6	1	0	3	0	1	1	17
	CIRC	0	0	0	0	2	0	1	1	4
	MAL	0	0	0	0	1	1	0	0	2
	PERI	3	4	1	3	13	3	2	2	31
	Estrategia Búsqueda PERIREC	2	1	0	0	1	0	0	0	4
	RAND	7	3	5	14	9	4	3	0	45
	SEAR	1	2	0	2	4	4	2	1	16
	SEARFI	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	SPAD	5	1	1	1	2	2	5	0	17
	SPAFC	0	0	0	1	0	0	2	0	3
	SPAI	1	3	4	3	1	6	7	3	28
Total	24	20	12	24	36	20	24	8	168	

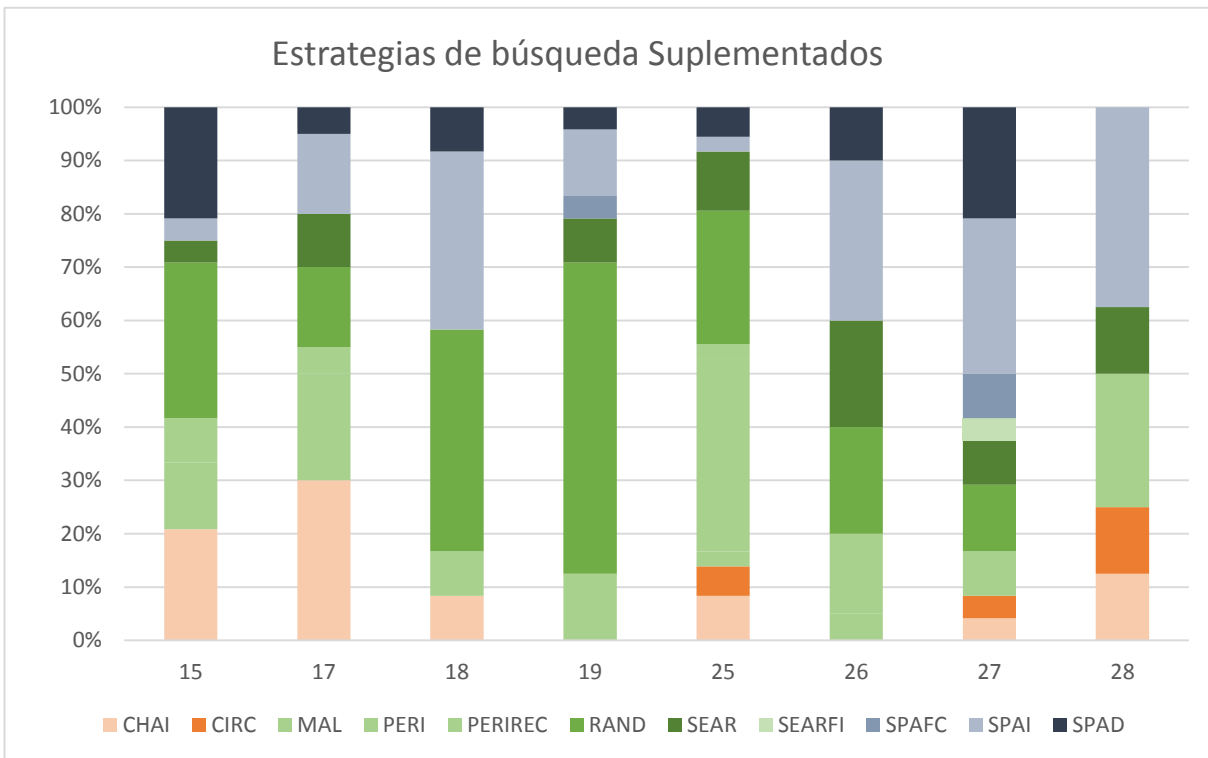
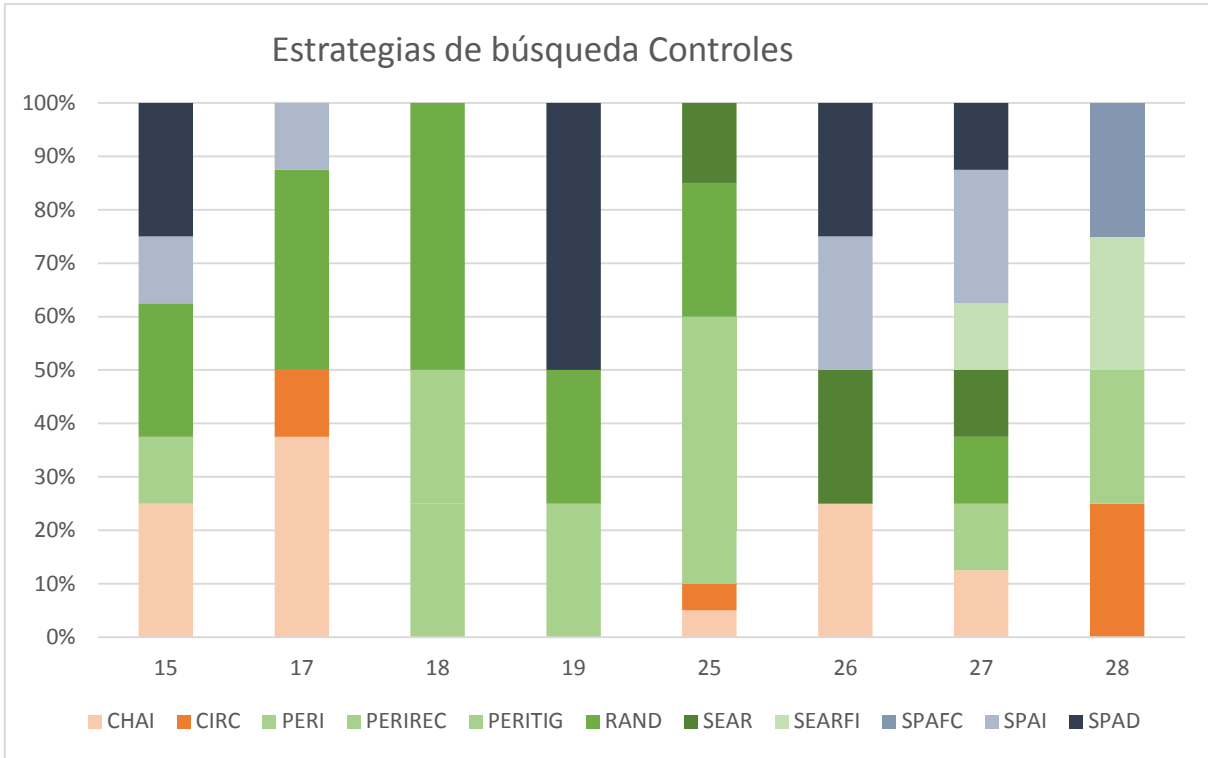


Ilustración 54. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Proporción de estrategias de búsqueda en 4º día de ensayo y 4º intento. Evolución con la edad. Azul: estrategias espaciales. Otros: estrategias no espaciales.



4.3.2.2.1.1.5 Permanencia en el cuadrante de escape en Laberinto Acuático.

En la determinación del porcentaje de tiempo y distancia, respecto al total del intento 1º del 5º día de extinción, no se observa diferencias significativas de los animales tratados respecto a los controles. Al contrario que en otros parámetros no existe mejoría significativa bajo el criterio de aumento de porcentaje de tiempo en los animales en la segunda prueba, $p > 0,05$. Entre los animales control y suplementados las diferencias tampoco son significativas $p > 0,05$.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Tiempo (%) Permanencia Cuadrante Escape

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	245,410 ^a	3	81,803	,332	,802
Intersección	15087,516	1	15087,516	61,219	,000
Trial_Fase	14,550	1	14,550	,059	,809
FRESA	196,122	1	196,122	,796	,377
Trial_Fase * FRESA	18,929	1	18,929	,077	,783
Error	11829,681	48	246,452		
Total	43407,274	52			
Total corregida	12075,091	51			

a. R cuadrado = ,020 (R cuadrado corregida = -,041)

Medias marginales estimadas de Tiempo (%) Permanencia Cuadrante Escape

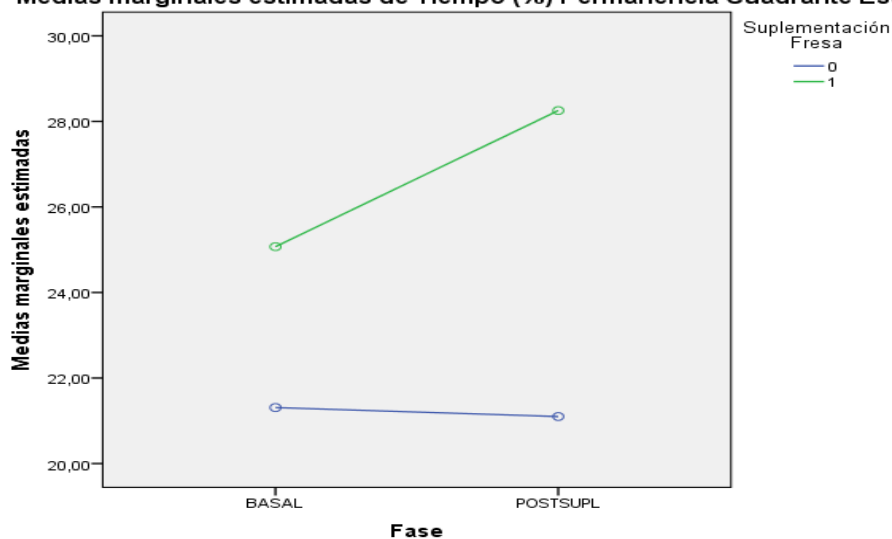


Ilustración 55. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. % tiempo en cuadrante de escape evolución de resultados basal y posterior a suplementación durante el envejecimiento. Estudio A.

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: Distancia (%) Cuadrante Escape

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	281,505 ^a	3	93,835	,475	,701
Intersección	16364,587	1	16364,587	82,819	,000
Trial_Fase	44,397	1	44,397	,225	,638
FRESA	183,978	1	183,978	,931	,339
Fase * FRESA	7,899	1	7,899	,040	,842
Error	9484,502	48	197,594		
Total	42941,481	52			
Total corregida	9766,008	51			

a. R cuadrado = ,029 (R cuadrado corregida = -,032)

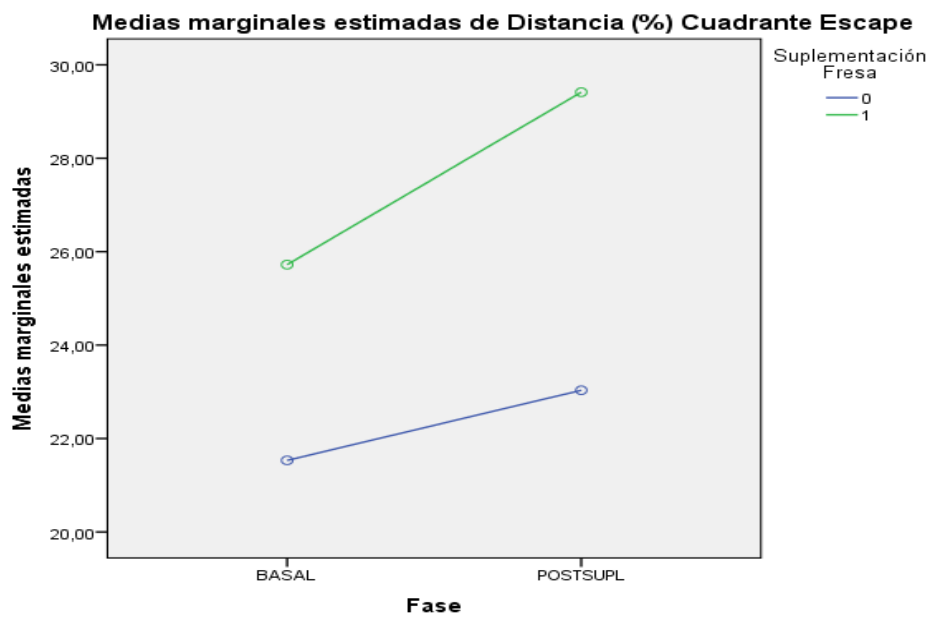


Ilustración 56. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Resultados basal y posterior suplementación. Porcentaje de distancia en cuadrante de escape. Estudio A. 0=Controles. 1= suplementados.



- Evolución durante el envejecimiento.

Los animales disminuyen el porcentaje de tiempo que pasan en el cuadrante de escape con la edad, es una tendencia no significativa $p>0,05$.

En la evolución de estos parámetros las correlaciones con las distintas edades, comparando los grupos basales con los suplementados no se observan diferencias significativas, $p>0,05$.

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
	B	Error típ.	Beta	t	
(Constante)	88,166	32,623		2,703	,018
1 Edad	-2,585	1,306	-,477	-1,980	,069
Suplementación Fresa	6,594	11,857	,134	,556	,588

a. Variable dependiente: Tiempo (%) Cuadrante Escape

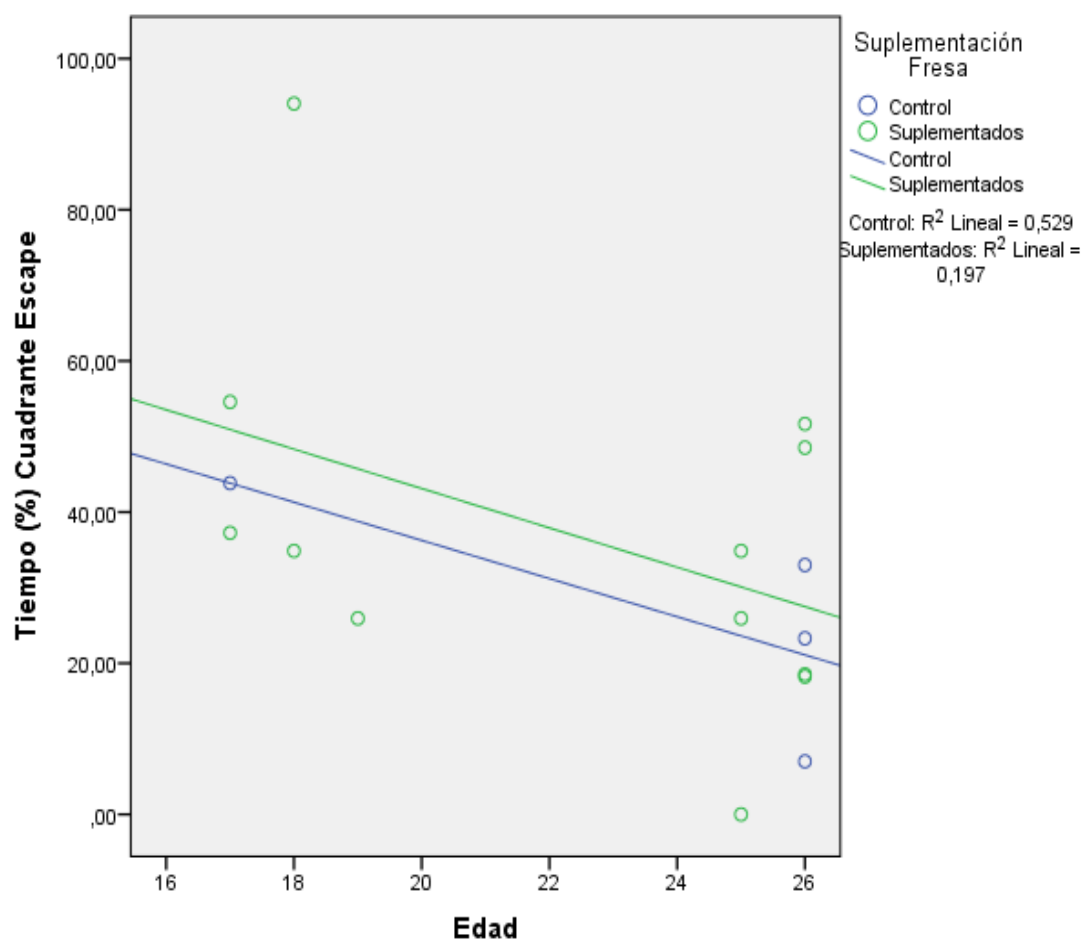


Ilustración 57. Memoria espacial, Laberinto acuático de Morris. % tiempo permanencia en cuadrante de escape evolución de animales controles y suplementados durante el envejecimiento. Estudio A.

El comportamiento de los animales para este parámetro es también a disminuir la distancia recorrida en el cuadrante correcto $p < 0,01$

En el estudio por edad se ve un patrón de tendencia de aumento de la distancia recorrida por los animales respecto a los control suplementados, no hay diferencias significativas $> 0,05$

Coefficientes

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	2703,070	516,209		5,236	,000
	Edad	-88,011	20,658	-,754	-4,260	,001
	Suplementación Fresa	105,877	187,612	,100	,564	,582

a. Variable dependiente: **Distancia (cm) Escape**

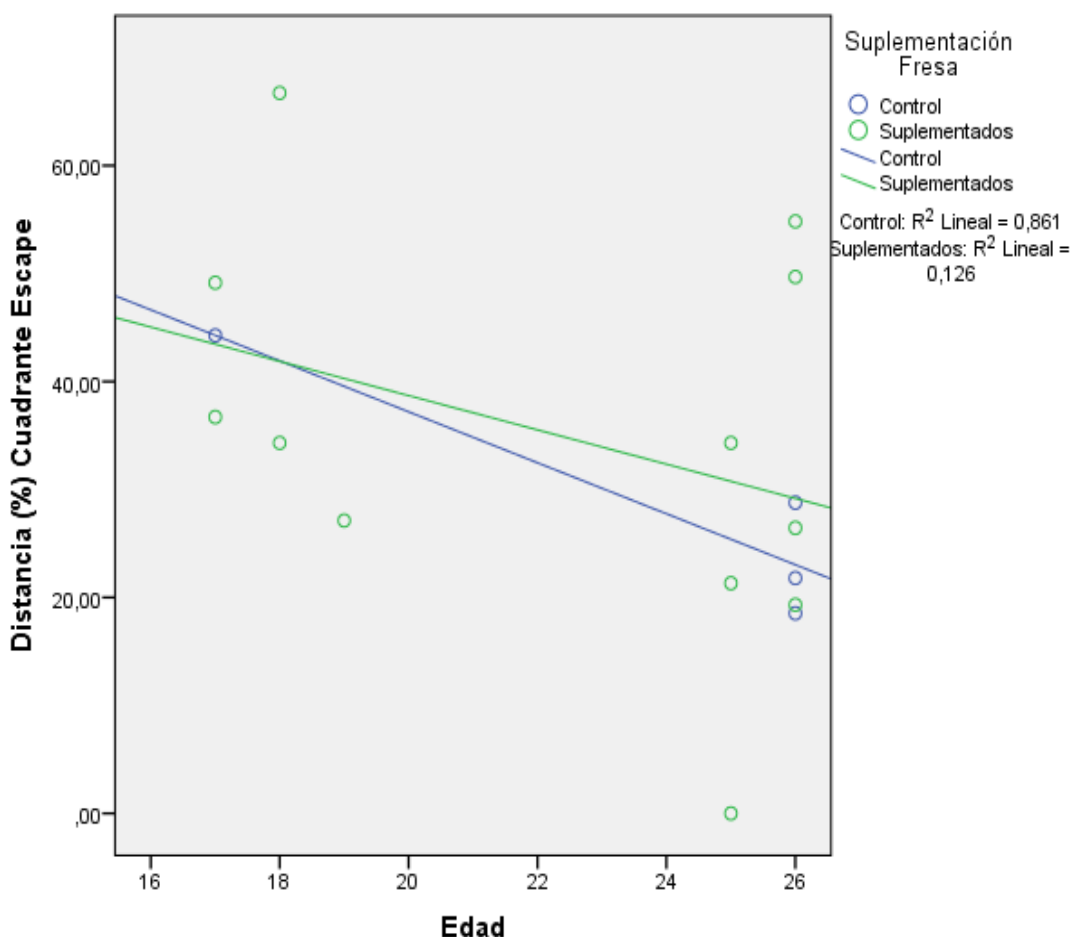


Ilustración 58. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. % distancia recorrida en cuadrante de escape evolución de animales controles y suplementados durante el envejecimiento. Estudio A.



4.3.2.2. 1.1.6 Número de veces que el animal cruza el cuadrante de escape en Laberinto Acuático.

Se observa una tendencia a aumentar las entradas en el cuadrante de escape en la repetición de la prueba fase posterior a la suplementación en los dos grupos estudiados aunque este aumento no resulta significativo $p > 0,05$

No hay modificación significativa de los animales suplementados y los no suplementados

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Entradas Cuadrante Escape

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	18,184 ^a	3	6,061	1,008	,397
Intersección	107,100	1	107,100	17,810	,000
Trial_Fase	3,972	1	3,972	,661	,420
FRESA	10,558	1	10,558	1,756	,191
Trial_Fase * FRESA	,290	1	,290	,048	,827
Error	288,643	48	6,013		
Total	527,000	52			
Total corregida	306,827	51			

a. R cuadrado = ,059 (R cuadrado corregida = ,000)

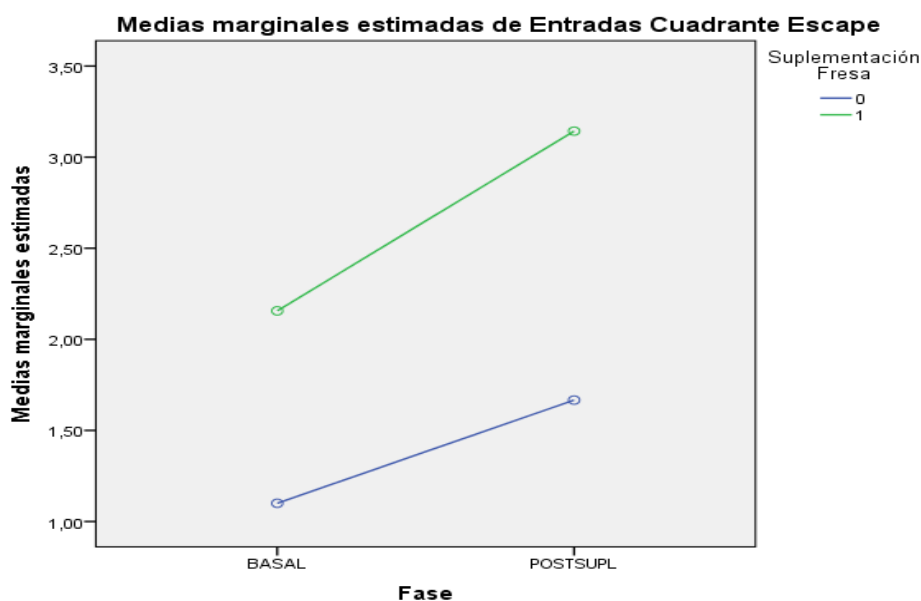


Ilustración 59. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Entradas en el cuadrante de escape.

- Evolución durante el envejecimiento.

Respecto al número de entradas en el cuadrante de escape se observa una tendencia en los dos grupos a disminuir con la edad y esta tendencia está asociada de manera muy significativa a la edad $p < 0.01$ pero no se ve afectada por la ingesta de fresas $p > 0,05$

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
		B	Error típ.	Beta	t	
1	(Constante)	8,606	1,762		4,885	,000
	Edad	-,230	,086	-,514	-2,681	,014
2	(Constante)	8,768	1,757		4,989	,000
	Edad	-,265	,091	-,593	-2,915	,009
	Suplementación Fresa	1,078	,970	,226	1,112	,280

a. Variable dependiente: Entradas Cuadrante Escape

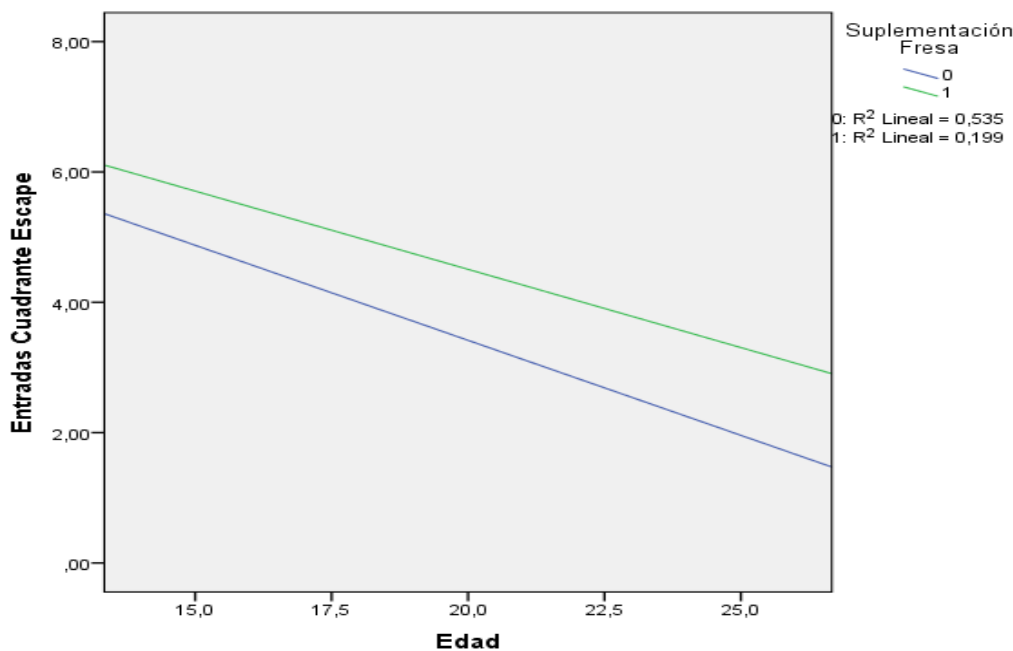


Ilustración 60. Memoria espacial. Laberinto acuático de Morris. Nº de entradas en cuadrante de escape evolución de resultados basal y posterior a suplementación durante el envejecimiento. Estudio A

4.3.2.2.1.2 *Reconocimiento social.*

En cuanto a la variación del tiempo retención en la memoria que determina la prueba, como ya dijimos en la caracterización de la cepa, no podemos realizar un estudio pues el comportamiento de los animales en los tiempos de reconocimiento social no nos permite realizar este tipo de análisis por ahora.

4.3.2.2.1.3 Capacidad de reversión en Laberinto Acuático.

Los parámetros: latencia y distancia de escape del intento 4º del 5º día de ensayo de extinción, donde cambiamos la plataforma al cuadrante opuesto, aumentan en la fase posterior a la suplementación, pero esta no es significativa $p > 0,05$. No hay diferencias significativas entre los animales controles y suplementados.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Latencia (sg) Escape

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2483,731 ^a	3	827,910	1,914	,137
Intersección	27603,543	1	27603,543	63,817	,000
Trial_Fase	1222,405	1	1222,405	2,826	,098
FRESA	212,461	1	212,461	,491	,486
Trial_Fase * FRESA	724,050	1	724,050	1,674	,201
Error	25952,366	60	432,539		
Total	73711,425	64			
Total corregida	28436,097	63			

a. R cuadrado = ,087 (R cuadrado corregida = ,042)

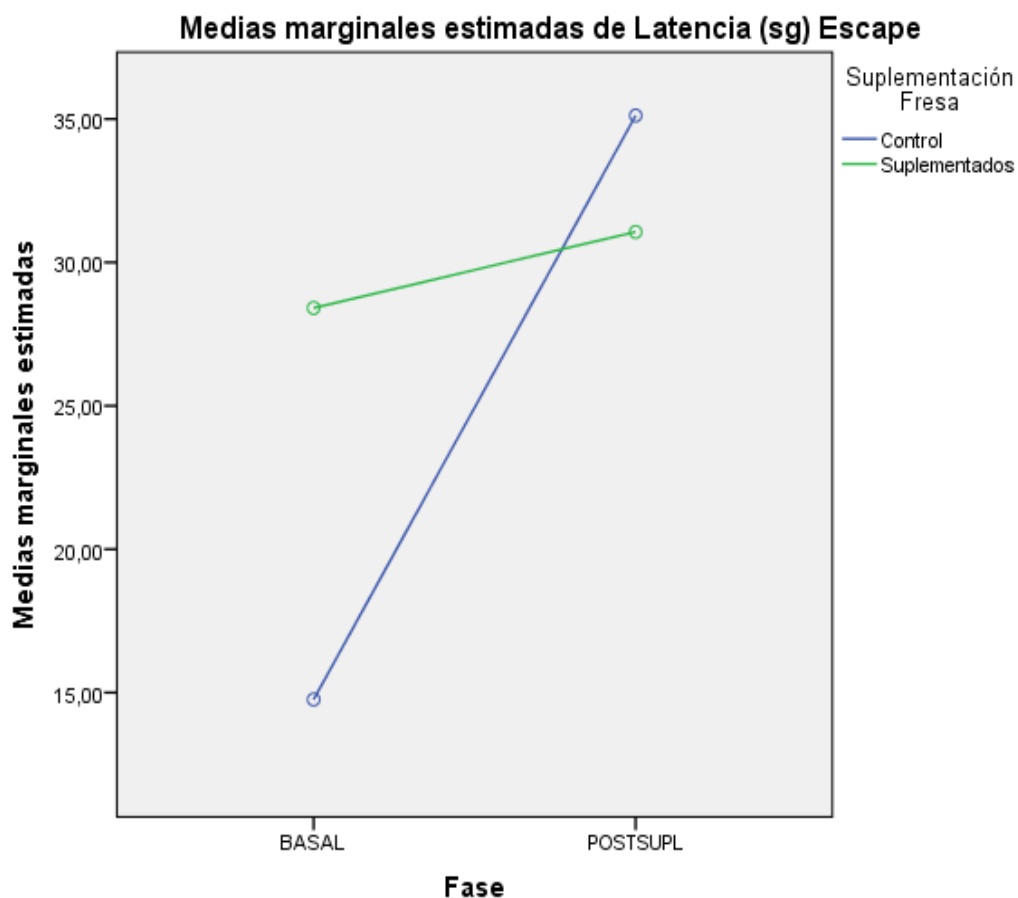


Ilustración 61. Aprendizaje. Capacidad de reversión de aprendizaje medido como latencias de escape en el último intento del quinto día de ensayo. Comparando fases basal y posterior a suplementación, animales controles y suplementados con fresa.



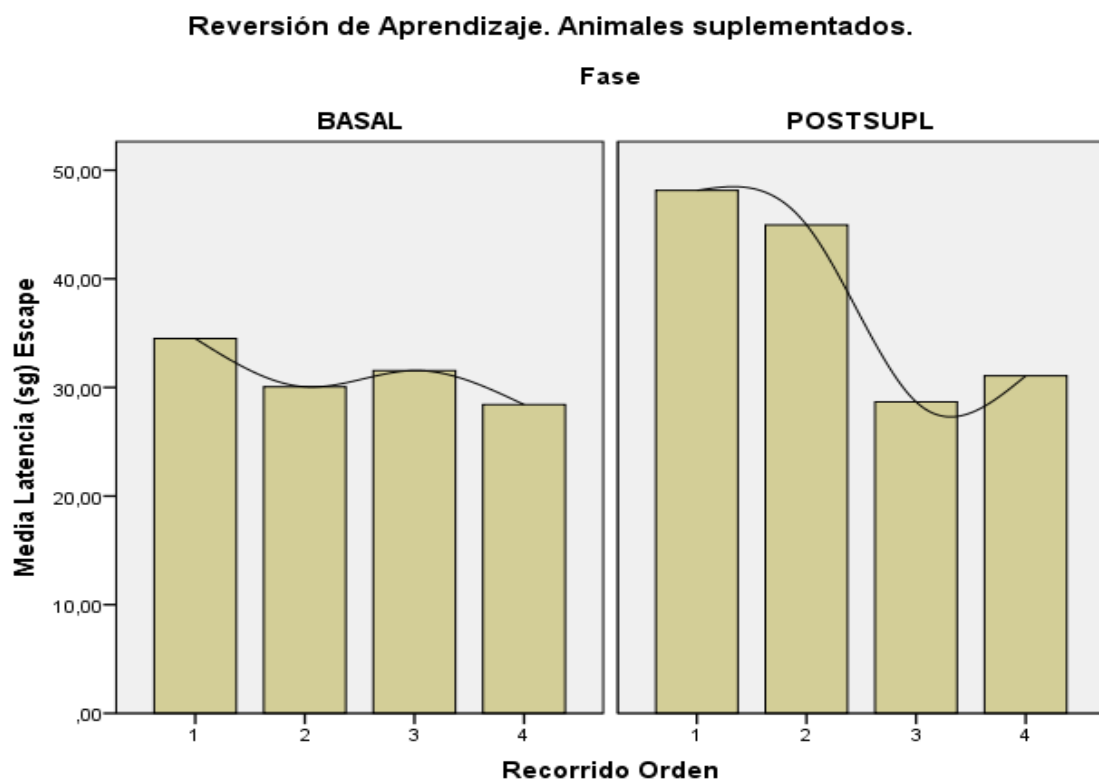
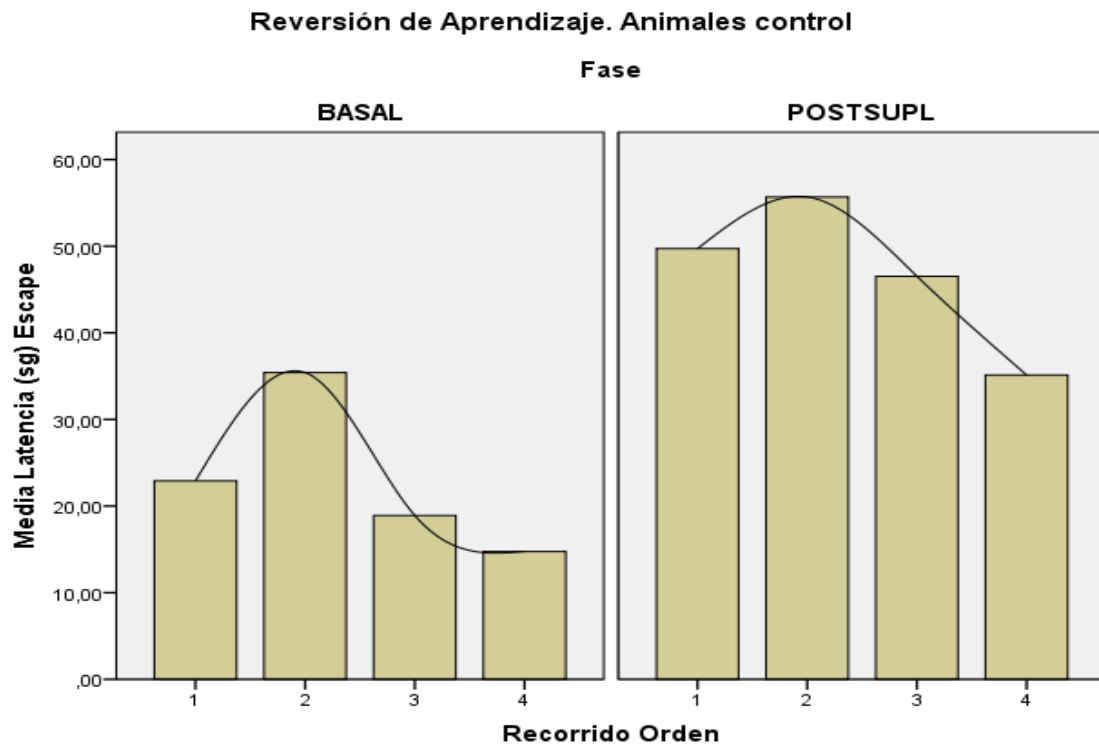


Ilustración 62. Aprendizaje. Capacidad de reversión de aprendizaje estudio gráficos de latencias en los intentos primeros al cuarto del quinto día de ensayo. Comparando fases basal y posterior a suplementación, animales controles y suplementados con fresa.

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: Distancia (cm) Escape

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	325804,159 ^a	3	108601,386	1,272	,292
Intersección	5259278,431	1	5259278,431	61,586	,000
Trial_Fase	118933,740	1	118933,740	1,393	,243
FRESA	71380,601	1	71380,601	,836	,364
Trial_Fase * FRESA	48258,532	1	48258,532	,565	,455
Error	5123808,427	60	85396,807		
Total	14602060,240	64			
Total corregida	5449612,587	63			

a. R cuadrado = ,060 (R cuadrado corregida = ,013)

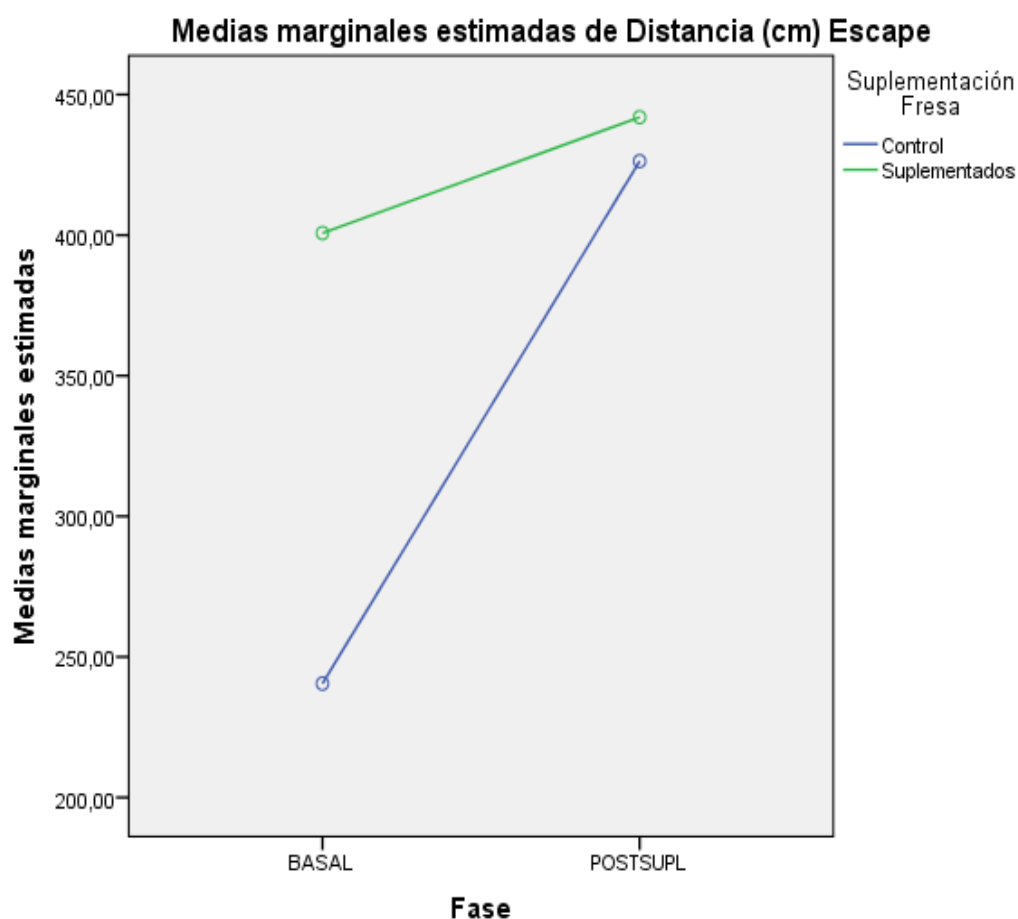


Ilustración 63. Capacidad de reversión. Efecto fresa determinaciones basal y posterior a la suplementación. Estudio A



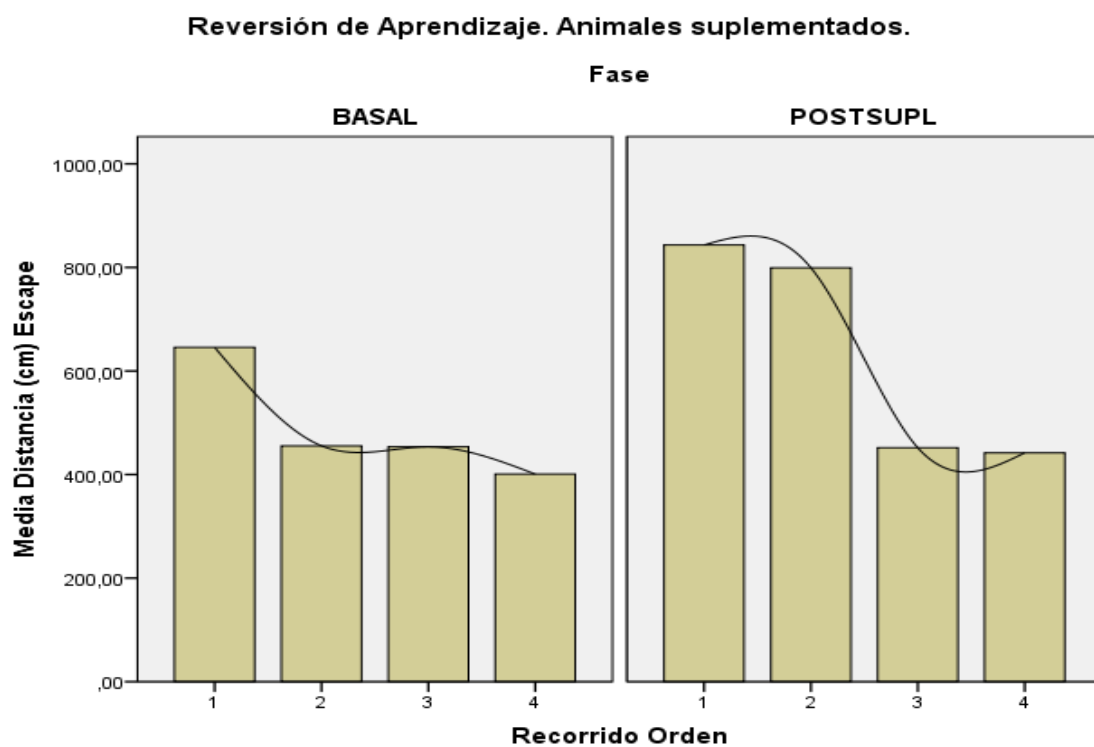
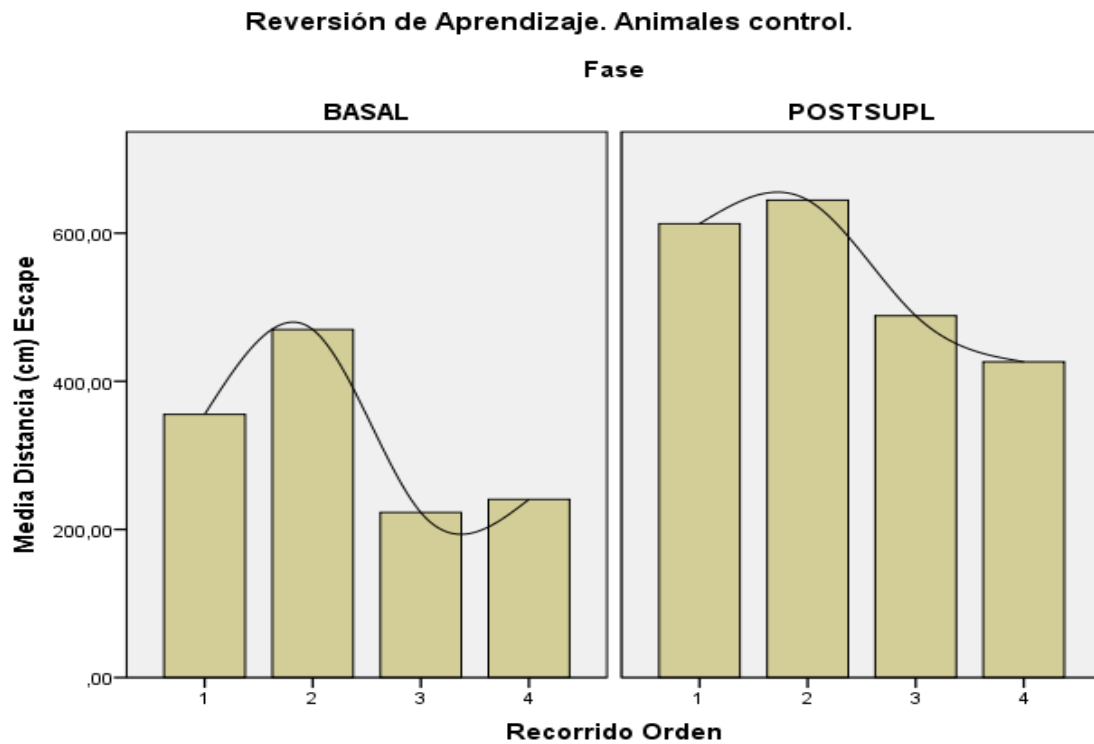


Ilustración 64. Aprendizaje. Capacidad de reversión de aprendizaje estudio gráficos de distancias en los intentos primeros al cuarto del quinto día de ensayo. Comparando fases basal y posterior a suplementación, animales controles y suplementados con fresa.

- Evolución durante el envejecimiento capacidad de reversión.

Respecto a las latencias de escape entre el intento 4º y en el ensayo del día 5º de extinción, donde cambiamos la plataforma al cuadrante opuesto, este parámetro no se ve influenciado ni por la edad ni por la suplementación de fresas.

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	30,476	40,972		,744	,469
	Edad	,196	1,631	,033	,120	,906
	Suplementación Fresa	-3,701	15,547	-,065	-,238	,815

a. Variable dependiente: Latencia (sg) Escape

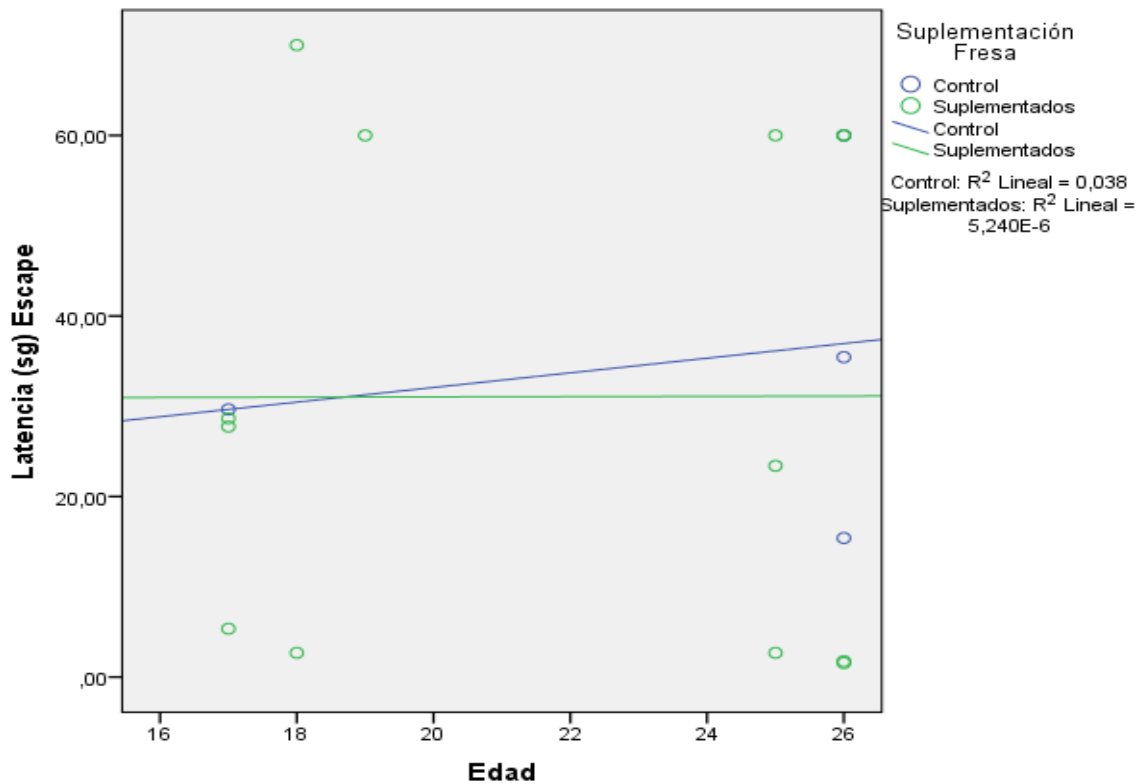
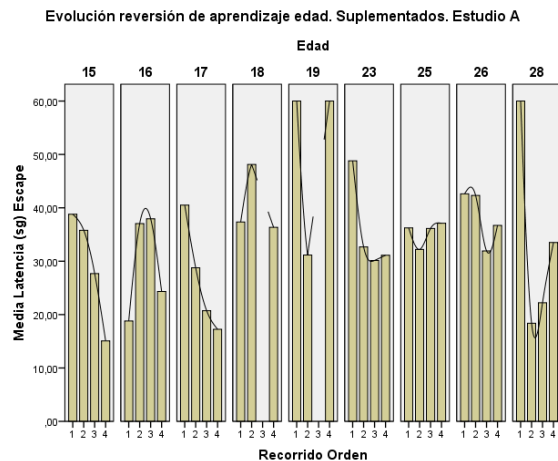
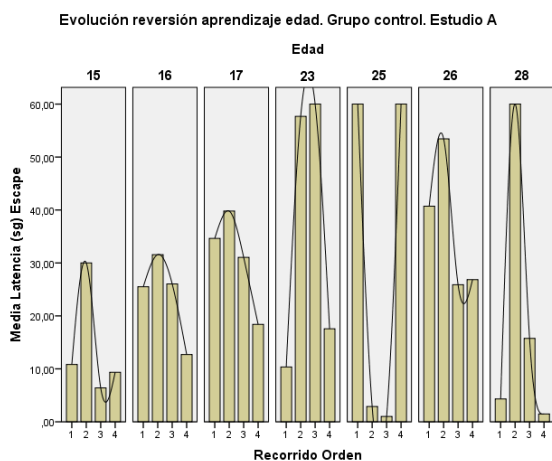


Ilustración 65. Capacidad de reversión. Latencia de escape del 4º intento, 5º día de ensayo. Evolución con la edad de animales control y suplementados. Estudio A.



Respecto a la distancia de escape entre el intento 4º del 5º día de extinción este parámetro no se ve influenciado ni por la edad ni por la suplementación de fresas.

Coefficientes

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
	B	Error típ.	Beta	t	
(Constante)	931,320	490,202		1,900	,078
Edad	-21,263	19,515	-,285	-1,090	,294
Suplementación Fresa	-23,216	186,003	-,033	-,125	,902

a. Variable dependiente: Distancia (cm) Escape

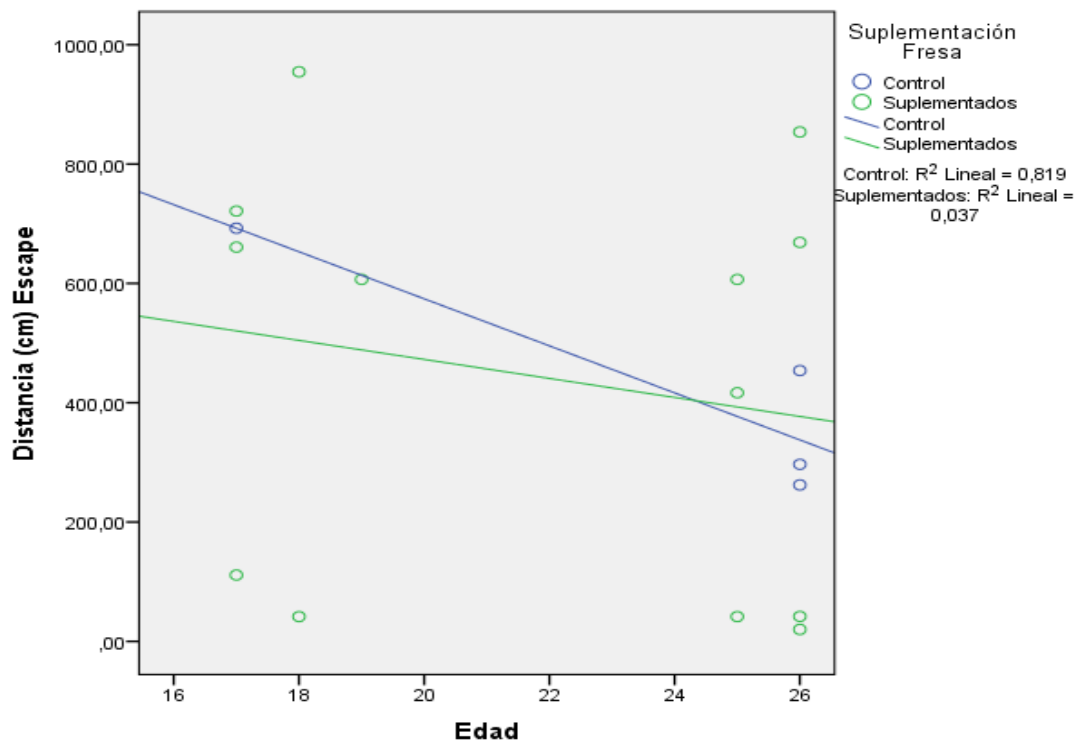
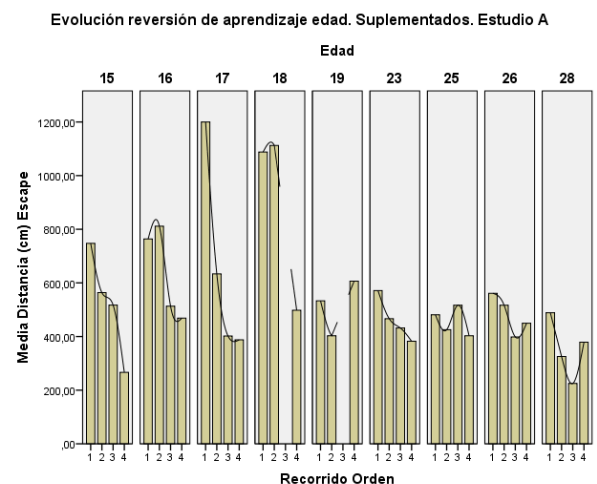
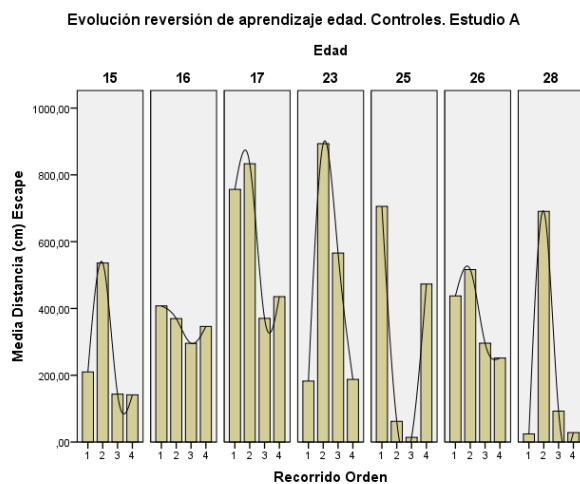


Ilustración 66. Capacidad de reversión. Distancia de escape del 4º intento, 5º día de ensayo. Evolución con la edad de animales control y suplementados.



4.3.2.2.2 *Ansiedad, Actitud Exploratoria y Capacidad Física; Parámetros en Campo Abierto. Estudio A.*

Entre las generalidades, en la evolución del animal con el envejecimiento y la dieta vemos que todos los animales no mejoran en la segunda prueba; sin embargo, el grupo de animales que recibieron dieta con fresa, manifiesta una leve tendencia a mejorar la actividad exploratoria y dinamismo comparado con los animales control cuando se estudian estos parámetros a lo largo de los distintos grupos de edad.

4.3.2.2.2.1 *Permanencia en la zona periférica en Campo Abierto. Signo de tigmotaxis en campo abierto.*

- Porcentaje de tiempos en las zonas de periférica y central.

Se observa una tendencia a aumentar el porcentaje de tiempo en la zona periférica en el grupo control y a disminuir en el grupo tratado en la repetición de la prueba aunque la diferencia en tiempo de estos comportamientos no resulta significativa $p > 0,05$.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Tiempo (%) Zona Periférica

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	300,801 ^a	3	100,267	,320	,811
Intersección	556778,698	1	556778,698	1775,073	,000
FRESA	14,323	1	14,323	,046	,831
FASE	172,748	1	172,748	,551	,460
FRESA * FASE	292,475	1	292,475	,932	,336
Error	32621,189	104	313,665		
Total	1007234,428	108			
Total corregida	32921,990	107			

a. R cuadrado = ,009 (R cuadrado corregida = -,019)

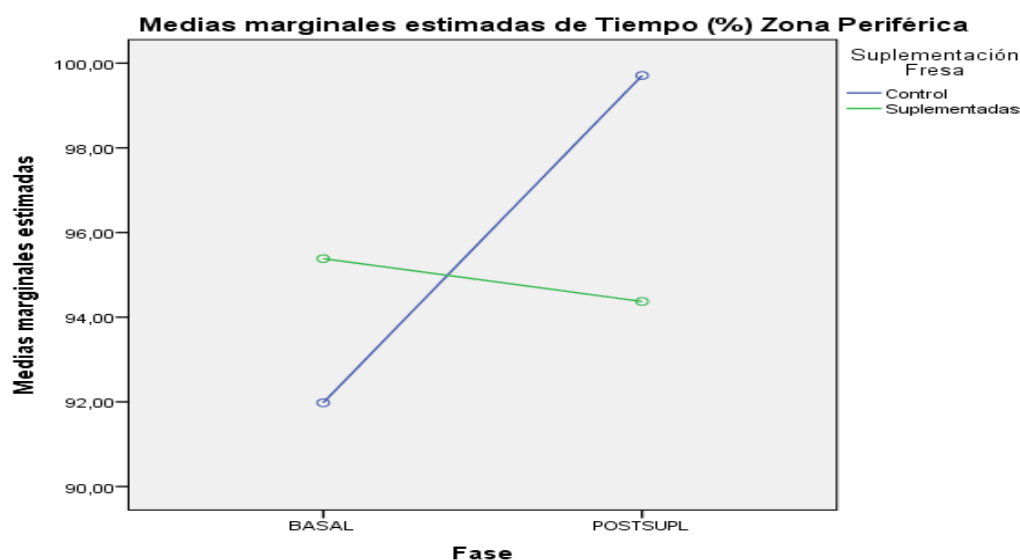


Ilustración 67. Ansiedad. % tiempo de permanencia en zona periférica en campo abierto (OF), comparación entre fases basal y posterior y animales controles y suplementados con fresa. Estudio A



- Evolución durante el envejecimiento.

Durante el envejecimiento obtiene una leve diferencia entre los controles y los suplementados pero esta no es significativa $p > 0.05$.

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	89,116	17,866		4,988	,000
	Edad	,456	,705	,098	,646	,522
	Suplementación Fresa	-4,222	7,963	-,080	-,530	,599

a. Variable dependiente: Tiempo (%) Zona Periférica

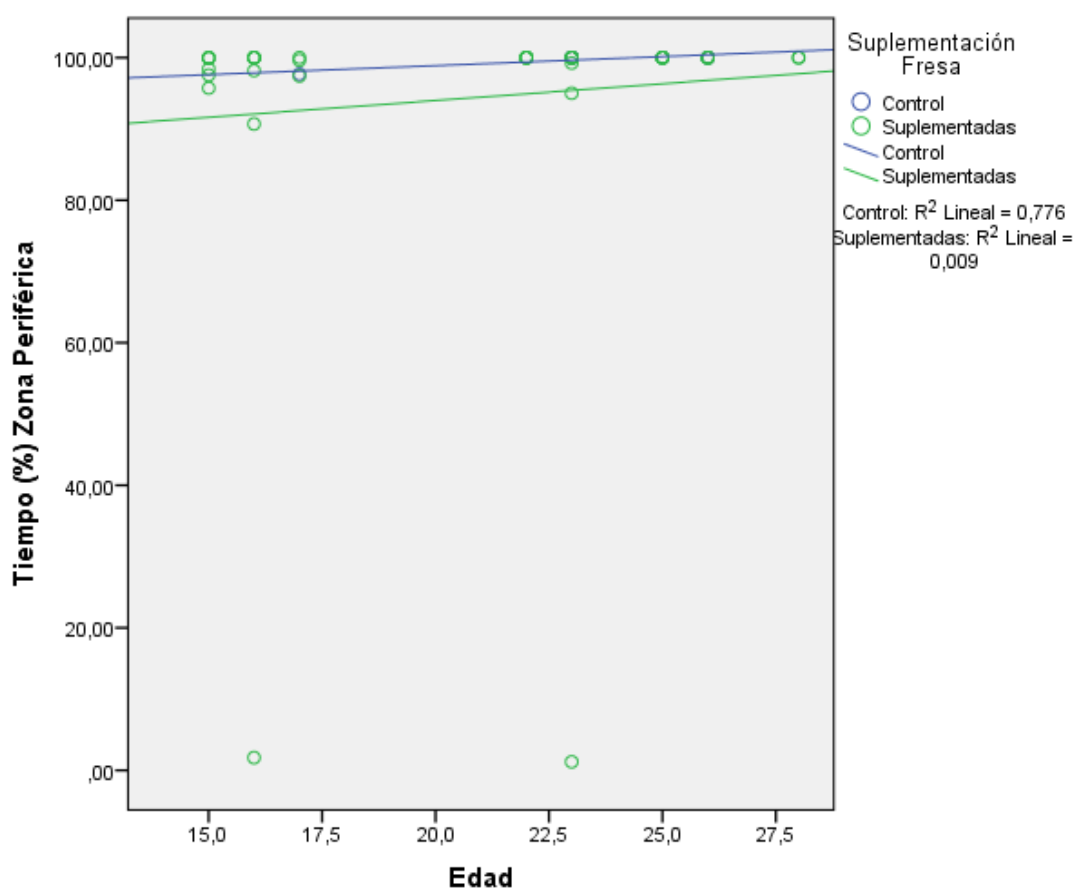


Ilustración 68. Ansiedad. % de Tiempo de permanencia en zona periférica OF Evolución con la edad de los animales controles y tratados.

4.3.2.2.2.1.1 Signo de tigmotaxis.

Como ya se apunta en el estudio de caracterización de la cepa es muy difícil de evaluar signos de tigmotaxis ya que los animales permanecen en su mayor parte de tiempo y recorrido en la periferia desde muy jóvenes. Ilustración 23

4.3.2.2.2.2 Conductas en Campo Abierto.

En la segunda prueba las actitudes de intranquilidad o ansiosas aumentan, dando signos de que los animales padecen mas agitación, que la primera vez que hacen la prueba. No obstante no son resultados estadísticamente significativos en la mayoría de los casos.

Estudiado en los distintos grupos de edad, tras el tratamiento con fresa estas actitudes no mejoran significativamente más que en los animales, solo podemos apreciar determinadas tendencias del grupo de animales suplementados.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: REARING

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	34,558 ^a	3	11,519	2,564	,059
Intersección	181,197	1	181,197	40,336	,000
FRESA	,054	1	,054	,012	,913
FASE	11,468	1	11,468	2,553	,113
FRESA * FASE	2,046	1	2,046	,455	,501
Error	467,183	104	4,492		
Total	836,000	108			
Total corregida	501,741	107			

a. R cuadrado = .069 (R cuadrado corregida = .042)

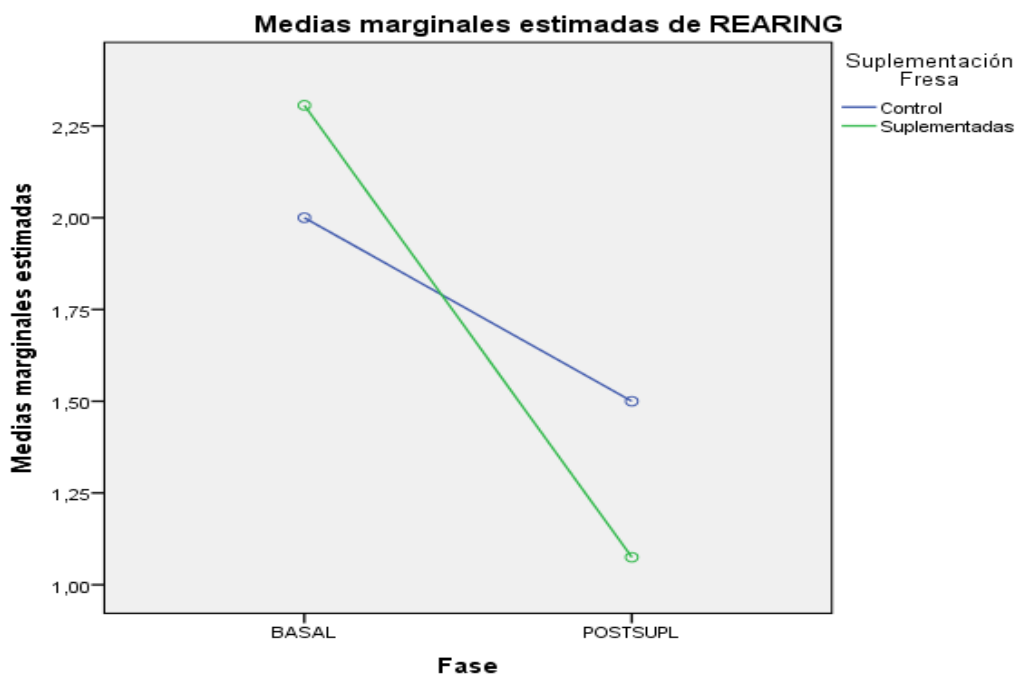


Ilustración 69. Actitud y motivación exploratoria. Conductas en OF. Episodios de rearing. Estudio A.



Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: GROOMING

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,394 ^a	3	,465	,396	,756
Intersección	30,605	1	30,605	26,110	,000
FRESA	,025	1	,025	,021	,884
FASE	1,252	1	1,252	1,068	,304
FRESA * FASE	1,030	1	1,030	,879	,351
Error	121,903	104	1,172		
Total	174,000	108			
Total corregida	123,296	107			

a. R cuadrado = ,011 (R cuadrado corregida = -,017)

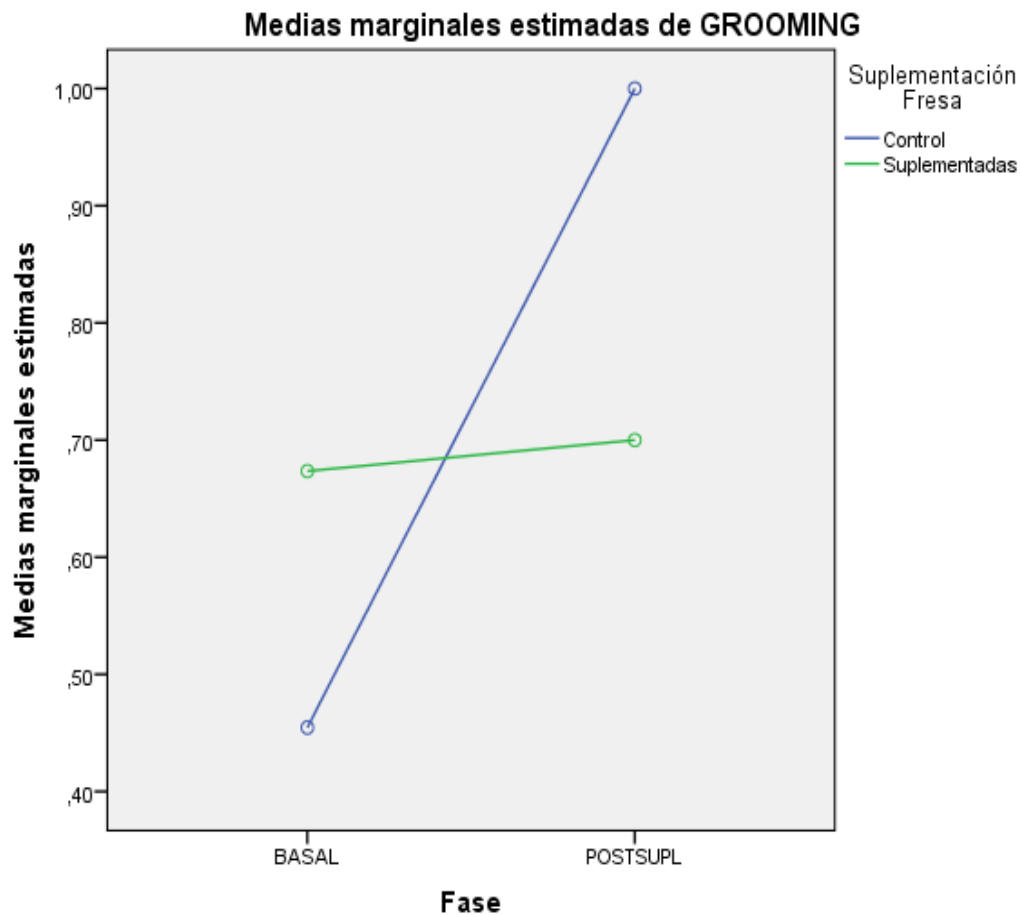


Ilustración 70. Ansiedad y miedo. Conductas en OF. Episodios de grooming. Estudio A.

En este parámetro se observa una disminución con significación estadística respecto a los cambios antes después $p < 0,05$.

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: DEFECATION

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1,685 ^a	3	,562	2,713	,049
Intersección	4,306	1	4,306	20,801	,000
FRESA	,300	1	,300	1,451	,231
FASE	1,203	1	1,203	5,813	,018
FRESA * FASE	,300	1	,300	1,451	,231
Error	21,528	104	,207		
Total	29,000	108			
Total corregida	23,213	107			

a. R cuadrado = ,073 (R cuadrado corregida = ,046)

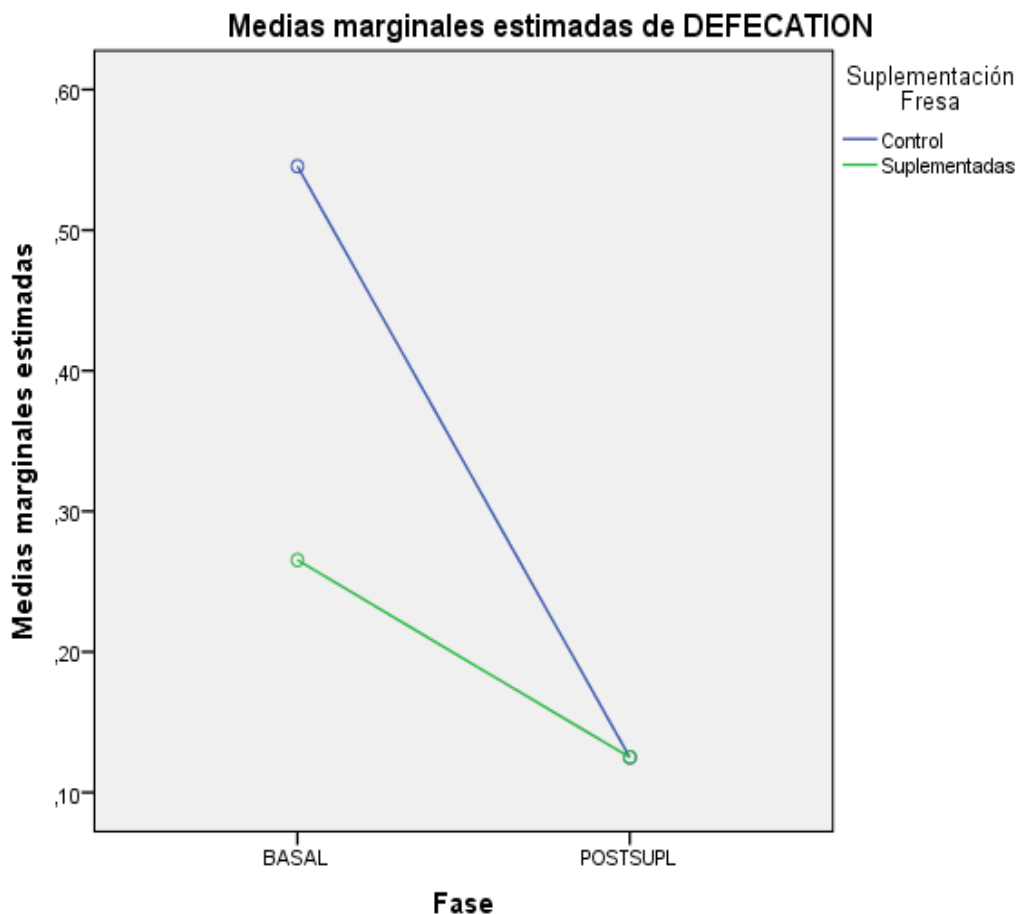


Ilustración 71. Ansiedad y miedo. Conductas en OF. Episodios de deposiciones. Estudio A.

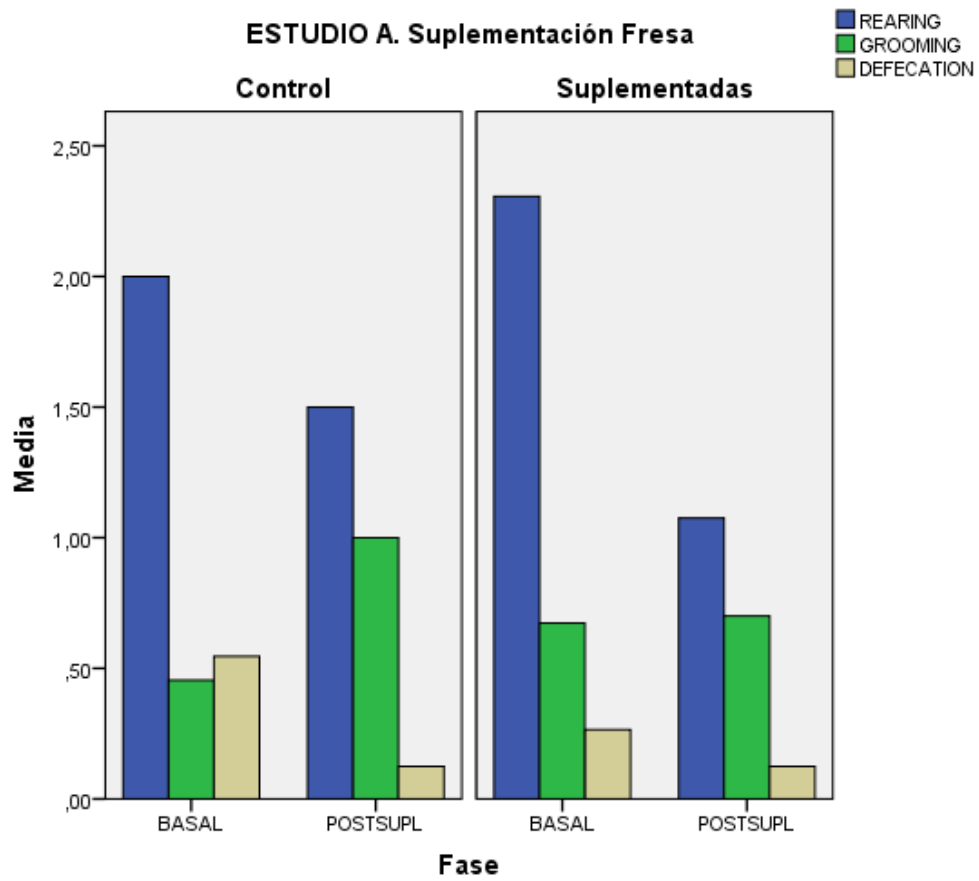


Ilustración 72. Estudio de conductas en OF. Episodios de rearing, grooming y defecation. Estudio A.

- Evolución durante el envejecimiento.

Respecto a la conducta de rearing se observa una disminución en los dos grupos con una asociación muy significativa ($p < 0,01$) con la edad y también con una asociación a la administración de fresa aunque de menor significación ($p < 0,05$)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
		B	Error típ.	Beta	t	
1	(Constante)	7,971	1,217		6,552	,000
	Edad	-,278	,048	-,667	-5,795	,000
	Suplementación Fresa	-1,107	,542	-,235	-2,041	,047

a. Variable dependiente: REARING

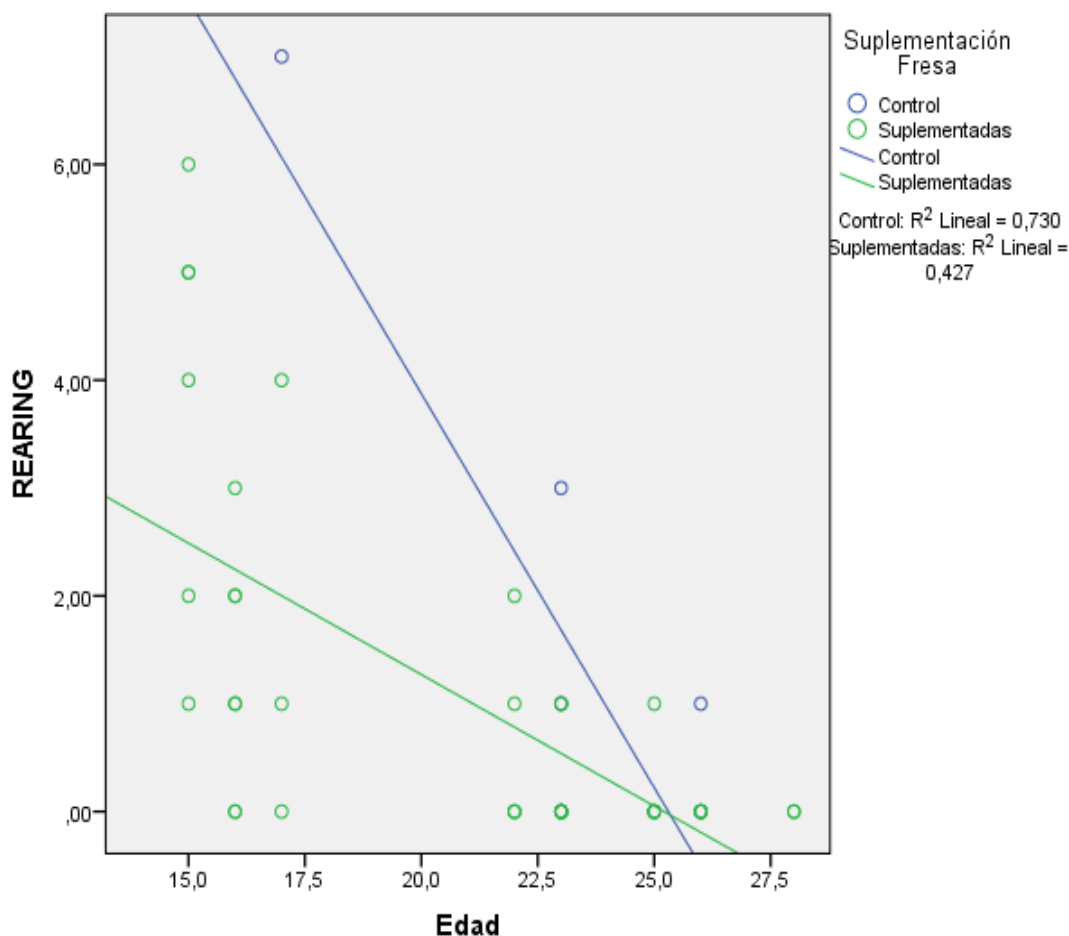


Ilustración 73. Actitud exploratoria. Evolución de las conductas en OF con la edad. Episodios de rearing. Estudio A.



Coeficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
		B	Error típ.	Beta	t	
1	(Constante)	,753	,883		,853	,398
	Edad	,011	,035	,046	,305	,762
	Suplementación Fresa	-,274	,394	-,105	-,696	,490

a. Variable dependiente: GROOMING

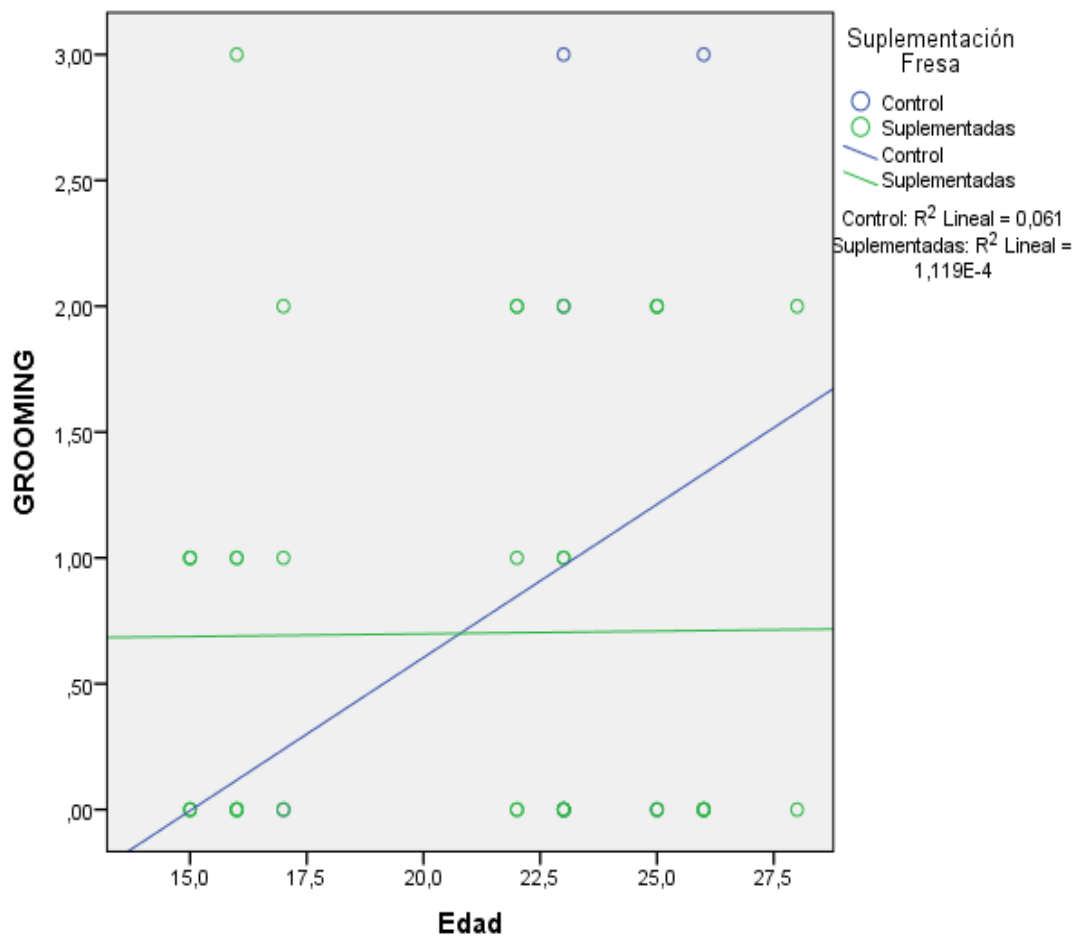


Ilustración 74. Ansiedad y miedo. Evolución de las conductas en OF con la edad. Episodios de grooming. Estudio A.

4.3.2.2.3 *Distancia total recorrida en Campo Abierto.*

La distancia recorrida voluntariamente por los animales en el campo abierto desciende en la 2ª fase (POSTSUPL), vemos que los animales suplementados con fresa no mejoran respecto a los no suplementados.

Durante el envejecimiento, los animales suplementados desarrollan una tendencia a positiva sobre los animales control pero no hay significación, $p > 0,05$.

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: Distancia (cm) Total

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	175400,953 ^a	3	58466,984	,747	,527
Intersección	7275788,335	1	7275788,335	92,942	,000
FRESA	9467,717	1	9467,717	,121	,729
FASE	76776,360	1	76776,360	,981	,324
FRESA * FASE	2088,513	1	2088,513	,027	,871
Error	8141445,860	104	78283,133		
Total	22084180,680	108			
Total corregida	8316846,813	107			

a. R cuadrado = ,021 (R cuadrado corregida = -,007)

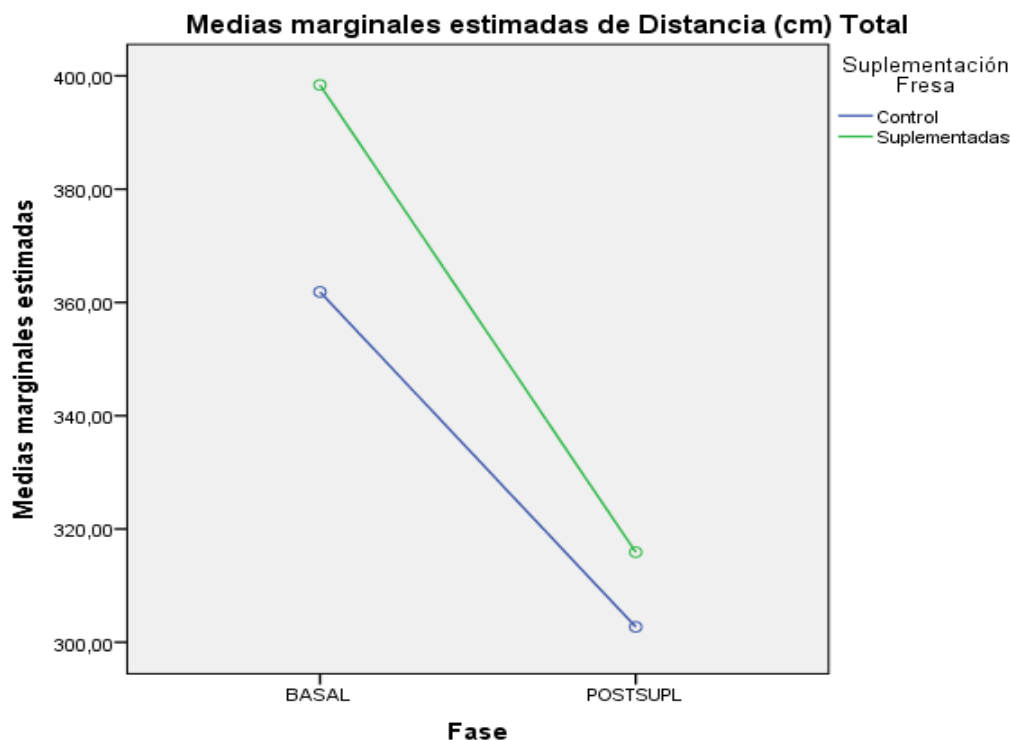


Ilustración 75. Actitud y motivación exploratoria. .Distancia recorrida voluntariamente en campo abierto. Comparación entre fases basal y posterior a la suplementación y entre animales tratados y controles. Estudio A.



- Evolución durante el envejecimiento.

Respecto a la distancia total se observa una tendencia en los dos grupos a disminuir con la edad y esta tendencia está asociada de manera muy significativa a la edad $p < 0.01$ pero no se ve afectada por la ingesta de fresas aunque ésta disminución es menos pronunciada en los animales suplementados con fresas.

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
	B	Error típ.	Beta	t	
1 (Constante)	1190,403	183,996		6,470	,000
Edad	-38,180	7,263	-,632	-5,257	,000
Suplementación Fresa	-80,352	82,005	-,118	-,980	,332

a. Variable dependiente: Distancia (cm) Total

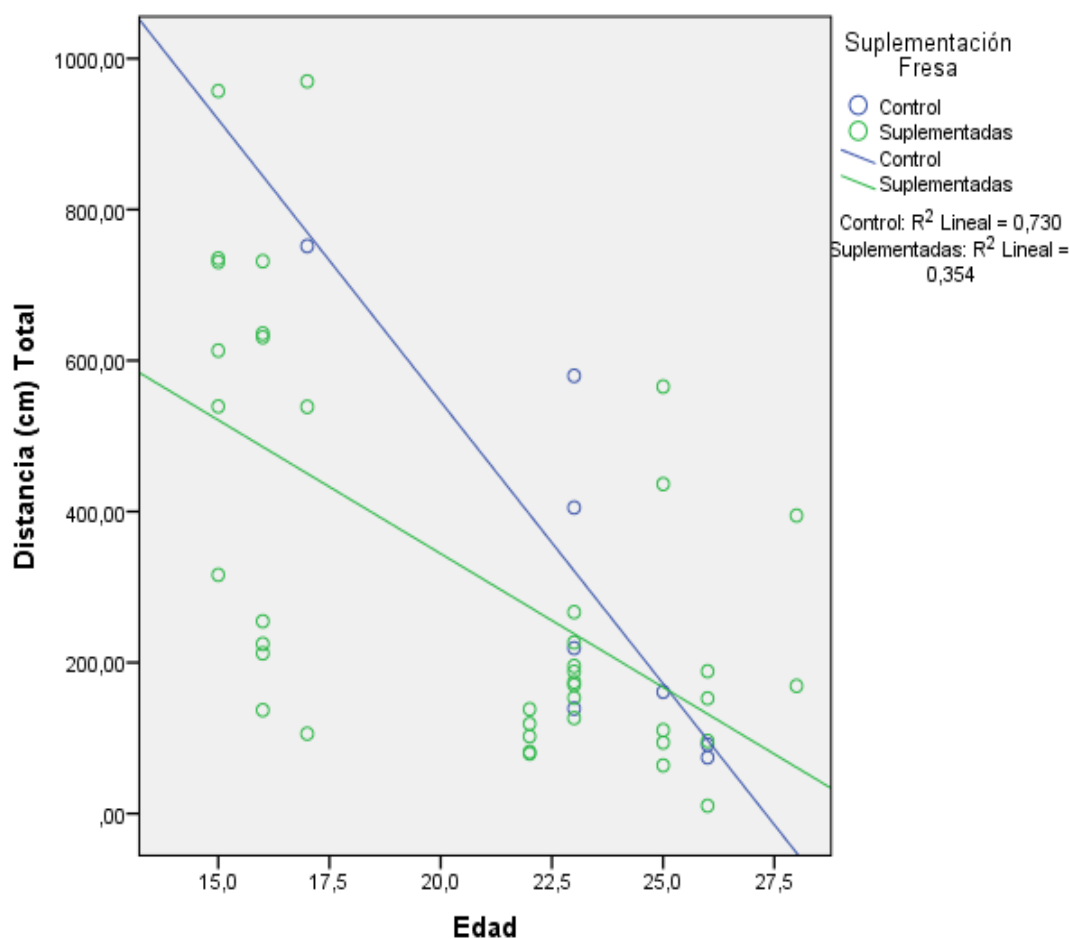


Ilustración 76. Actitud exploratoria. Evolución de las distancias recorridas voluntariamente en OF con la edad. Estudio A.

4.3.2.2.4 Velocidades medias de desplazamiento en el Campo Abierto andando.

La velocidad media de recorrido en campo abierto de la primera a la segunda prueba es levemente menor aunque no es una diferencia en este caso significativa. No hay diferencia significativa entre los que han tomado suplementación con fresa sobre los que no $p > 0,05$. En la zona central las velocidades aumentan en la segunda prueba pero no lo hacen de manera significativa.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Velocidad media (cm/sg) Periférico

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	4,504 ^a	3	1,501	,518	,671
Intersección	246,332	1	246,332	84,917	,000
FRESA	1,044	1	1,044	,360	,550
FASE	2,194	1	2,194	,756	,387
FRESA * FASE	,007	1	,007	,003	,960
Error	301,688	104	2,901		
Total	787,399	108			
Total corregida	306,192	107			

a. R cuadrado = ,015 (R cuadrado corregida = -,014)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Velocidad Media (cm/sg) Central

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	31,631 ^a	3	10,544	,642	,593
Intersección	430,811	1	430,811	26,235	,000
FRESA	1,752	1	1,752	,107	,746
FASE	10,784	1	10,784	,657	,423
FRESA * FASE	,558	1	,558	,034	,855
Error	591,160	36	16,421		
Total	1944,372	40			
Total corregida	622,791	39			

a. R cuadrado = ,051 (R cuadrado corregida = -,028)

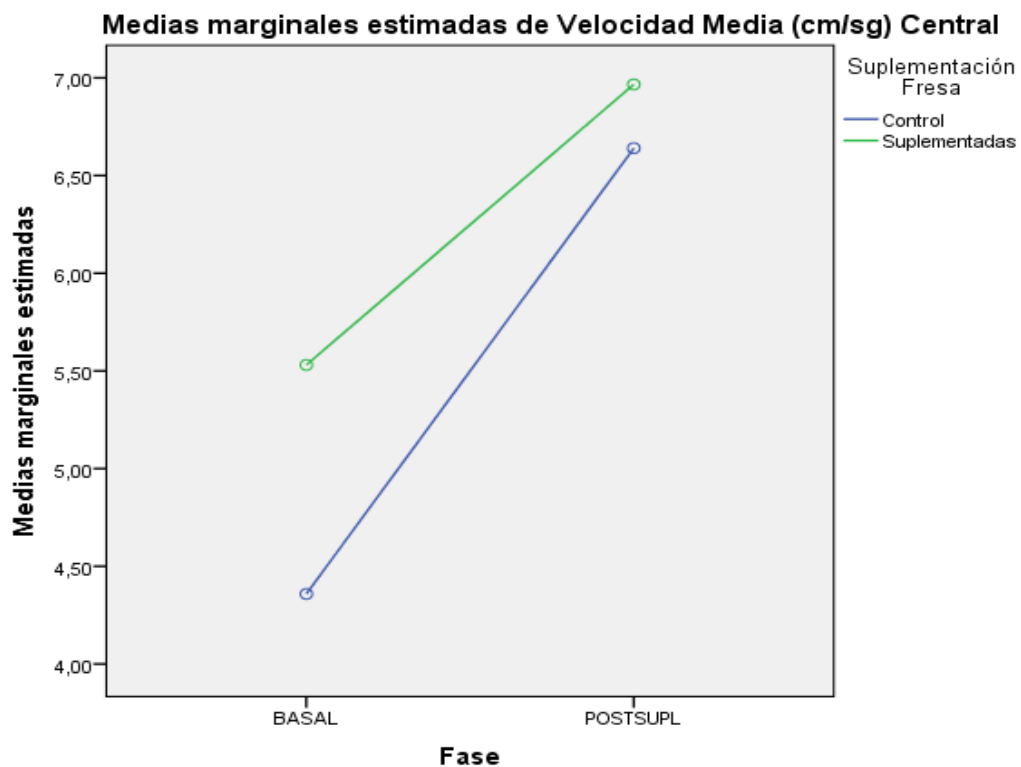
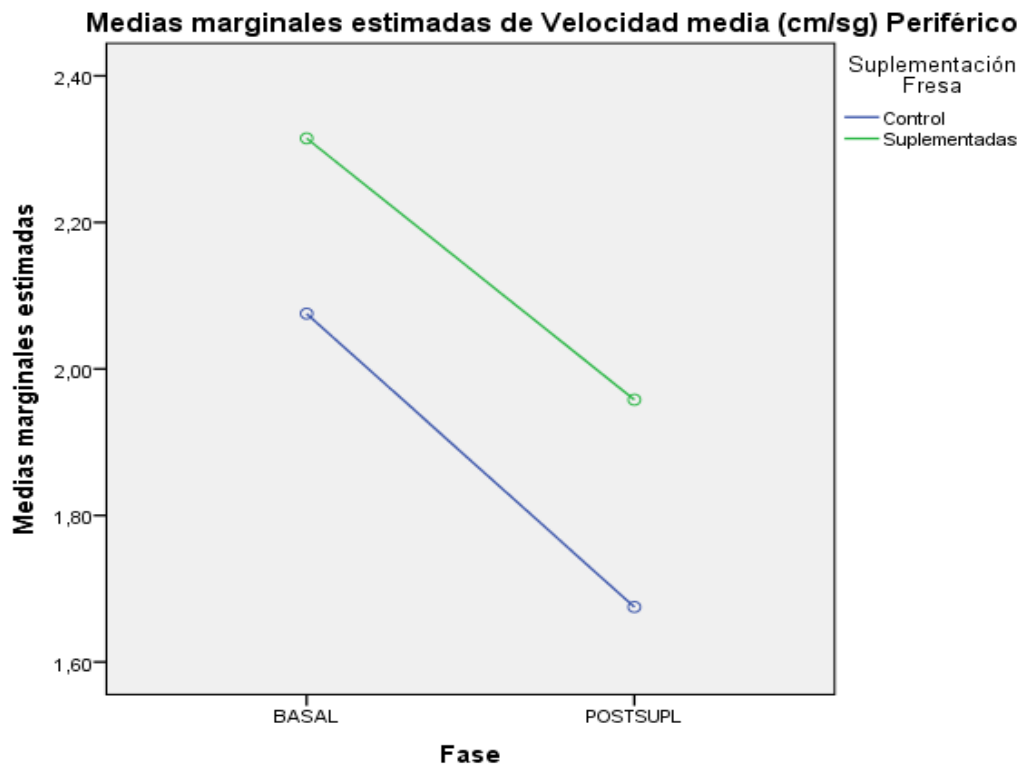


Ilustración 77. Capacidad Física Velocidad media de desplazamiento voluntario en campo abierto. Cuadro 1 resultados previos y posteriores; cuadro 2 evolución durante el envejecimiento.

- Evolución durante el envejecimiento.

Respecto a la velocidad media en la zona periférica se observa una tendencia a disminuir con la edad en el grupo de animales suplementados con fresa y a aumentar en el grupo control y esta tendencia está asociada de manera muy significativa a la edad $p < 0.01$ pero no presenta una asociación significativa con la ingesta de fresa.

Coefficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
	B	Error típ.	Beta	t	
1 (Constante)	6,743	1,260		5,353	,000
Edad	-,218	,050	-,559	-4,384	,000
Suplementación Fresa	-,251	,561	-,057	-,447	,657

a. Variable dependiente: Velocidad media (cm/sg) Periférico

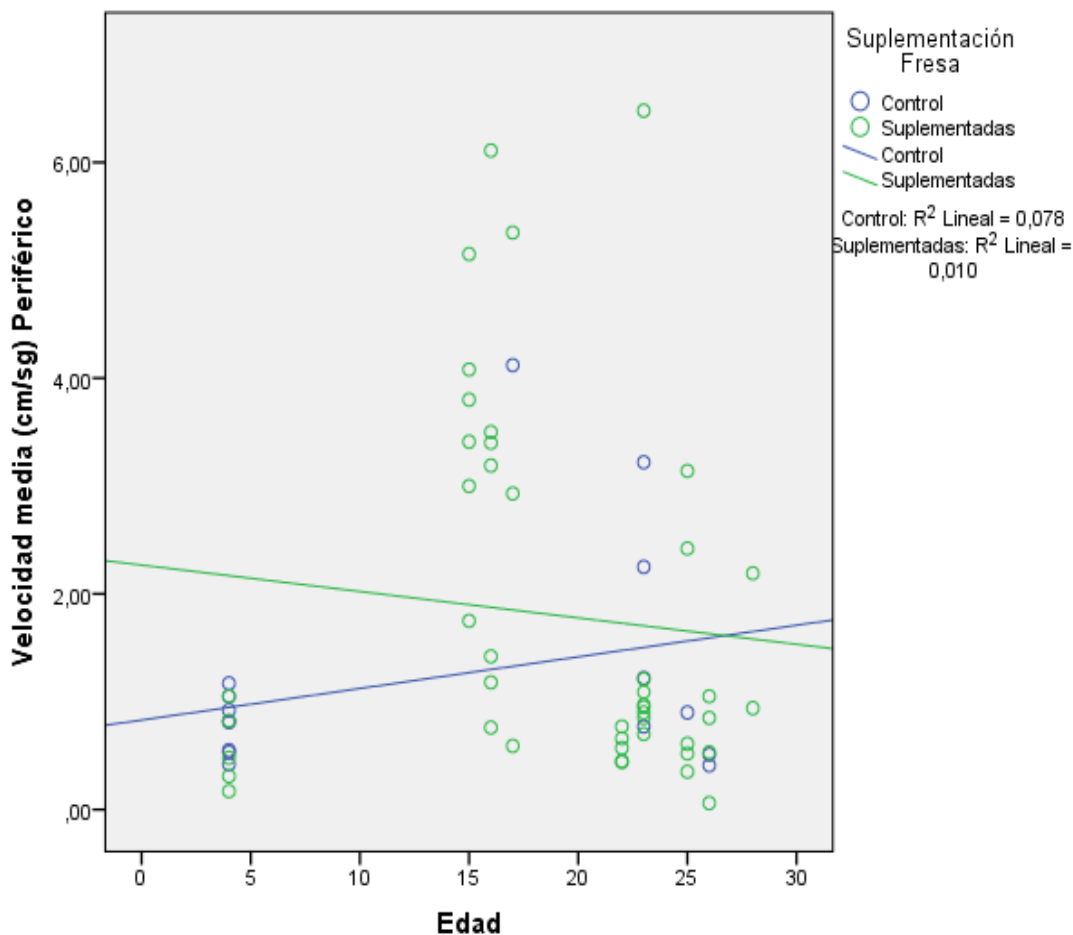
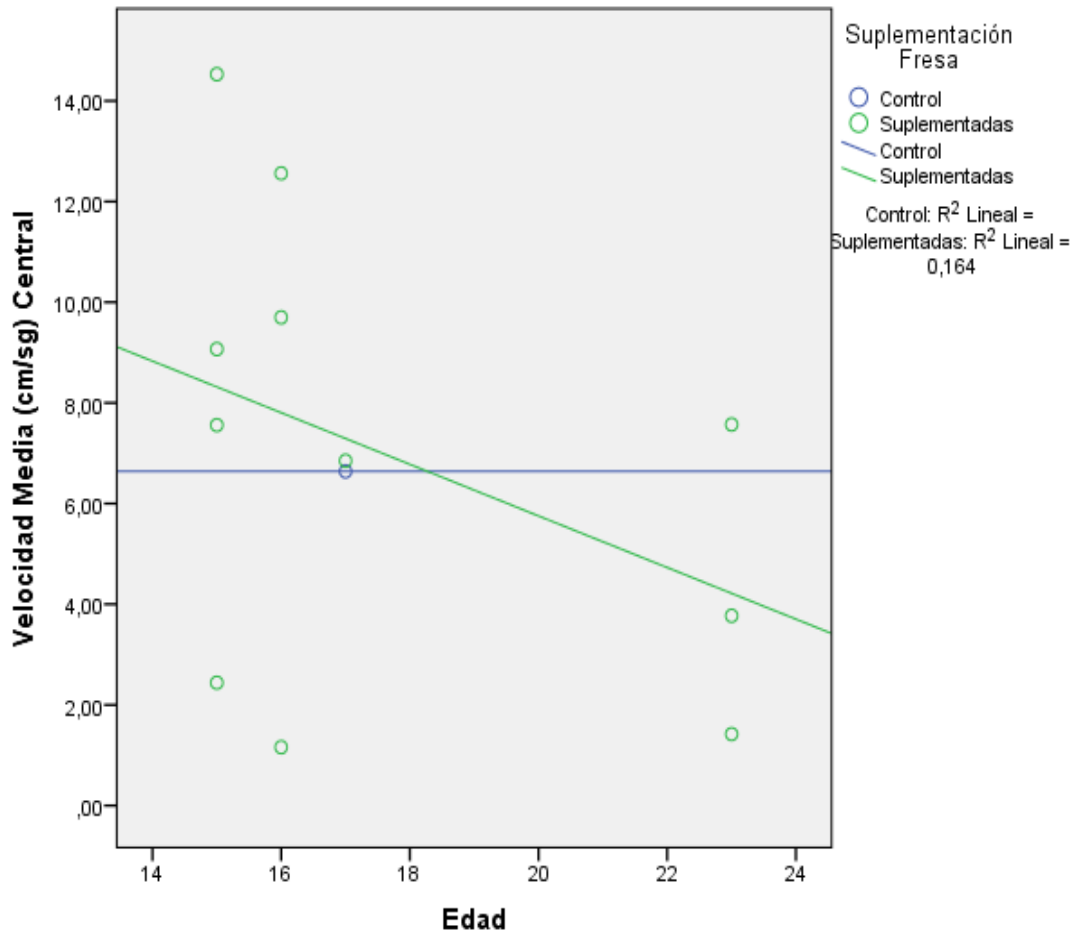


Ilustración 78. Capacidad Física Velocidad media de desplazamiento voluntario en campo abierto. Cuadro 1 resultados previos y posteriores; cuadro 2 evolución durante el envejecimiento.

Coeficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
		B	Error típ.	Beta	t	
1	(Constante)	15,355	7,825		1,962	,081
	Edad	-,513	,386	-,406	-1,329	,217
	Suplementación Fresa	,653	4,467	,045	,146	,887

a. Variable dependiente: Velocidad Media (cm/sg) Central



4.3.2.2.5 Actividad Global en Campo Abierto.

Se observa una tendencia a disminuir en los dos grupos en la repetición de la prueba en la segunda fase (POSTSUPL) aunque estos comportamientos no resultan significativo $p > 0,05$.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Actividad Global (cm2/sg) OF

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	11979605,368 ^a	3	3993201,789	1,148	,333
Intersección	308096353,540	1	308096353,540	88,563	,000
FASE	6969127,873	1	6969127,873	2,003	,160
FRESA	122,848	1	122,848	,000	,995
FASE * FRESA	725,521	1	725,521	,000	,989
Error	361800253,289	104	3478848,589		
Total	935901448,875	108			
Total corregida	373779858,657	107			

a. R cuadrado = ,032 (R cuadrado corregida = ,004)

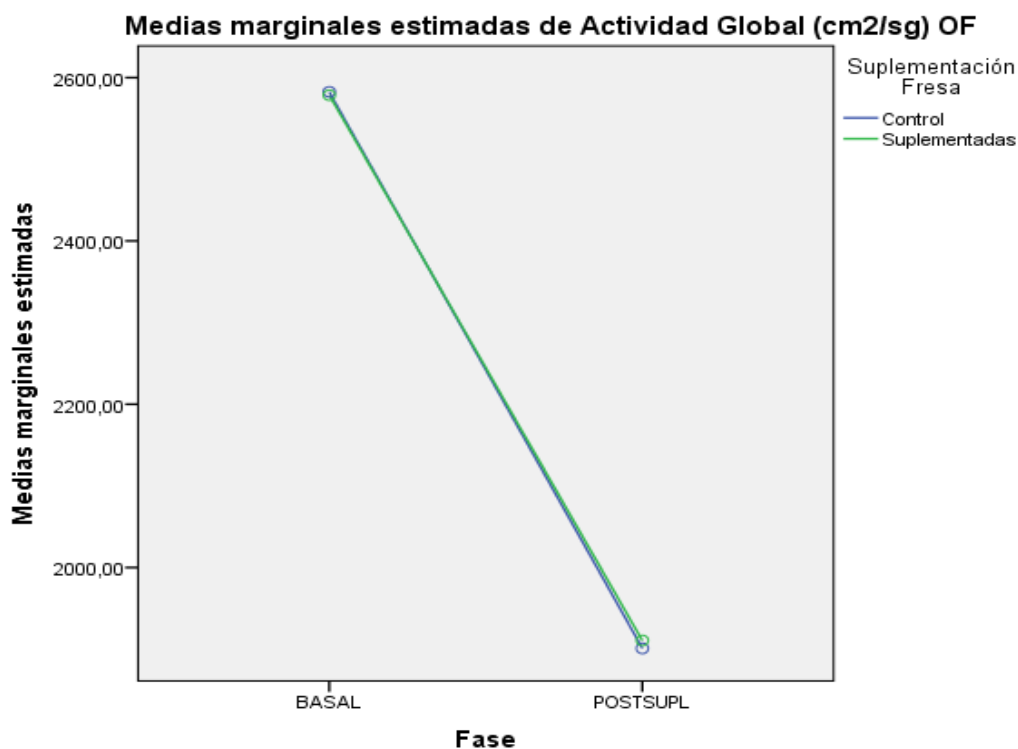


Ilustración 79. Capacidad física. Actividad Global total (cm2/sg) en campo abierto. Comparativa entre fases basal y posterior a suplementación con fresa y animales control y suplementados con fresa. Estudio A.

- Evolución durante el envejecimiento.

Respecto a la actividad global en campo abierto (OF), ésta disminuye con la edad encontrándose una gran asociación ($p < 0,01$) con la edad, pero que no se vería influenciada por la ingesta de fresa

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
		B	Error típ.	Beta	t	
1	(Constante)	7828,898	1227,418		6,378	,000
	Edad	-254,965	48,450	-,632	-5,262	,000
	Suplementación Fresa	-614,947	547,049	-,135	-1,124	,267

a. Variable dependiente: Actividad Global (cm2/sg) OF

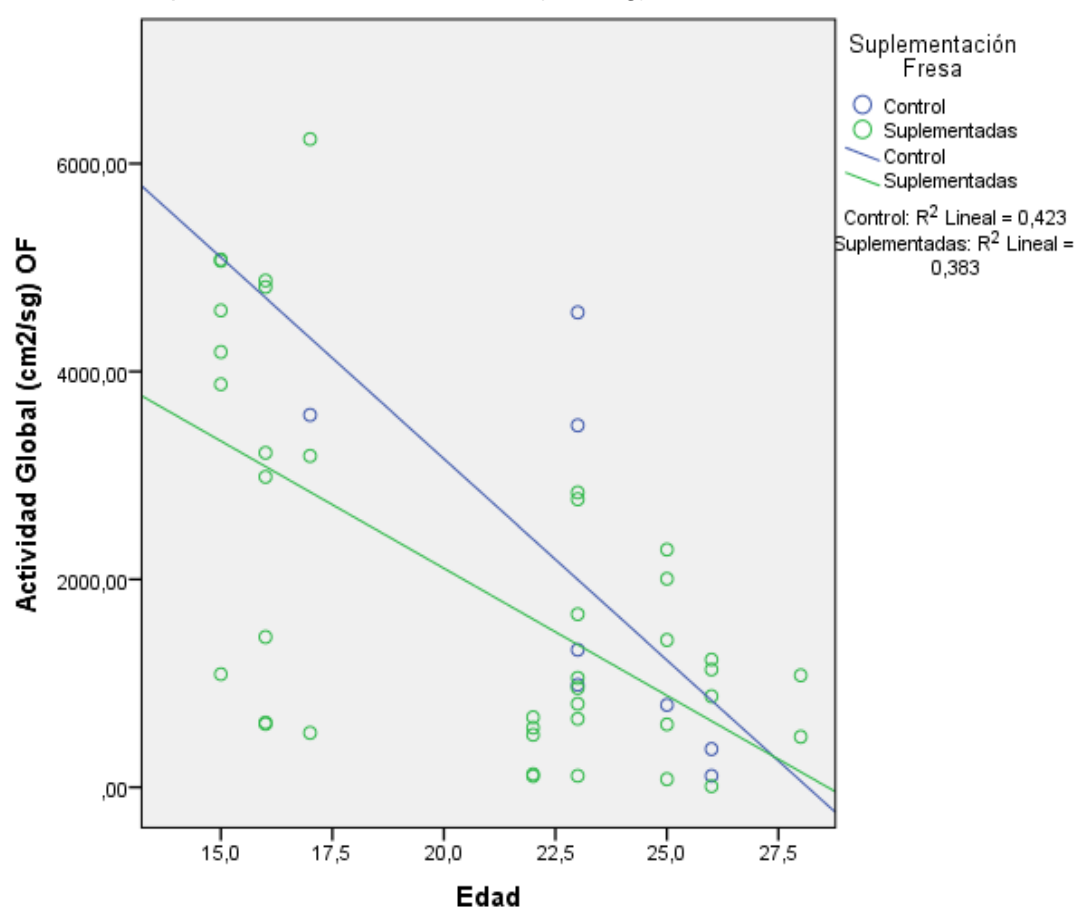


Ilustración 80. Capacidad física. Actividad Global total (cm2/sg) en campo abierto. Evolución con la edad. Estudio A

4.3.2.2.2.6 *Signos neuromotores anómalos en el Campo Abierto.*

Aparecen signos de temblor y descoordinación esporádicos pero sin diferencias respecto al momento anterior a la toma de fresas. Algunos animales que los presentaban antes de la prueba no llegaron a la segunda fase y en uno apareció después. En cualquier caso en un hallazgo que no tienen cuantificación y no se puede realizar un estudio.

4.3.2.2.3 *Motilidad y capacidad física. Ansiedad; Parámetros medidos en Laberinto Acuático de Morris. Estudio A*

4.3.2.2.3.1 *Permanencia en zona periférica en Laberinto Acuático. Signo de tigmotaxis en Laberinto Acuático.*

- Tiempo de permanencia en zona periférica.

No observan diferencias significativas en los grupos, antes y después de la suplementación con fresas y entre los animales suplementados y los que no. En cuanto a la evolución con la edad no hay diferencias entre el patrón de envejecimiento de animales que han tomado fresa sobre los que no.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Tiempo (%) Zona Periférica

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	608,718 ^a	3	202,906	,416	,742
Intersección	5912635,099	1	5912635,099	12121,381	,000
Fase	2,274	1	2,274	,005	,946
FRESA	598,782	1	598,782	1,228	,268
Fase * FRESA	50,634	1	50,634	,104	,747
Error	874599,551	1793	487,786		
Total	8712402,247	1797			
Total corregida	875208,269	1796			

a. R cuadrado = ,001 (R cuadrado corregida = -,001)

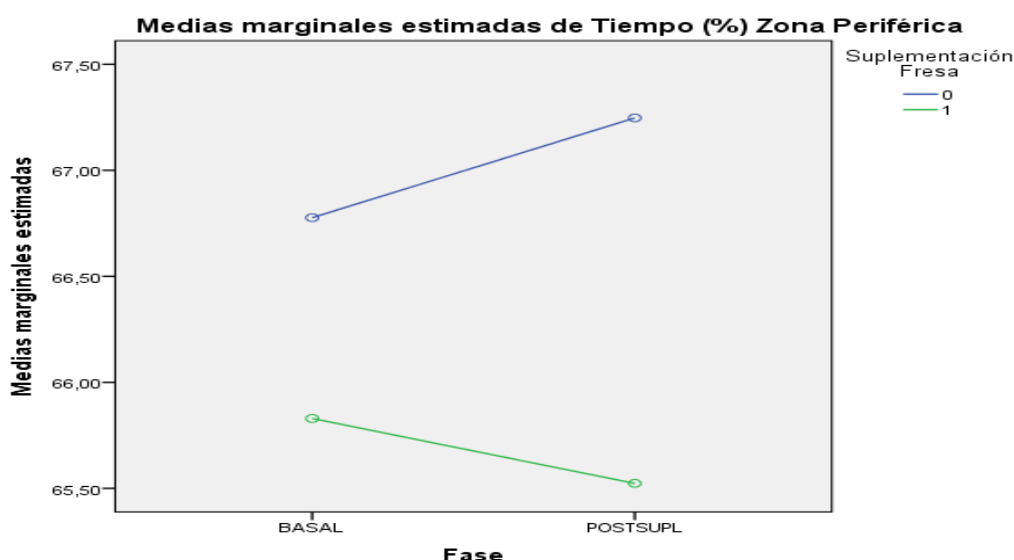


Ilustración 81. Ansiedad. % Tiempo de permanencia en la periferia. Efecto de suplementación con fresas. Resultados fase basal y posterior comparación entre animales controles y suplementado con fresa. Estudio A



- Distancia recorrida en zona periférica.

Aumenta de forma significativa la distancia recorrida en zona periférica del laberinto acuático en la fase 2º (POSTSUPL) $p < 0,001$. No aparecen diferencias significativas entre los suplementados con fresa y lo controles.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Distancia (%) Zona Periférica

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	8146,152 ^a	3	2715,384	5,765	,001
Intersección	5515499,516	1	5515499,516	11709,790	,000
Trial_Fase	3549,728	1	3549,728	7,536	,006
FRESA	12,525	1	12,525	,027	,870
Trial_Fase * FRESA	967,707	1	967,707	2,055	,152
Error	844531,878	1793	471,016		
Total	8123318,211	1797			
Total corregida	852678,029	1796			

a. R cuadrado = ,010 (R cuadrado corregida = ,008)

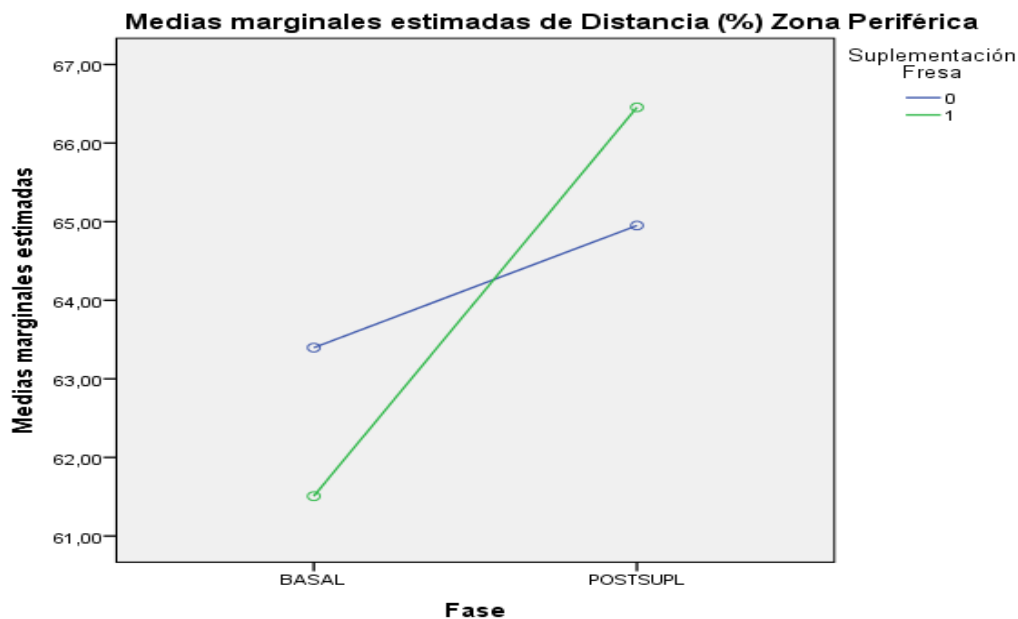


Ilustración 82. Ansiedad. % Distancia recorrida en la periferia laberinto acuático de Morris. Efecto de la suplementación con fresas. Resultados basales y posteriores. Estudio A

- Evolución durante el envejecimiento.

Estudiando la evolución con la edad, los animales tienden a pasar mas tiempo en la zona periférica $p < 0,001$ pero la suplementación con fresa no parece afectar en este parámetro.

Coefficientes

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	54,461	1,639		33,218	,000
	Rango Edad	2,263	,243	,281	9,309	,000
	Suplementación Fresa	,479	1,459	,010	,329	,743

a Variable dependiente: Velocidad Media (cm/sg)

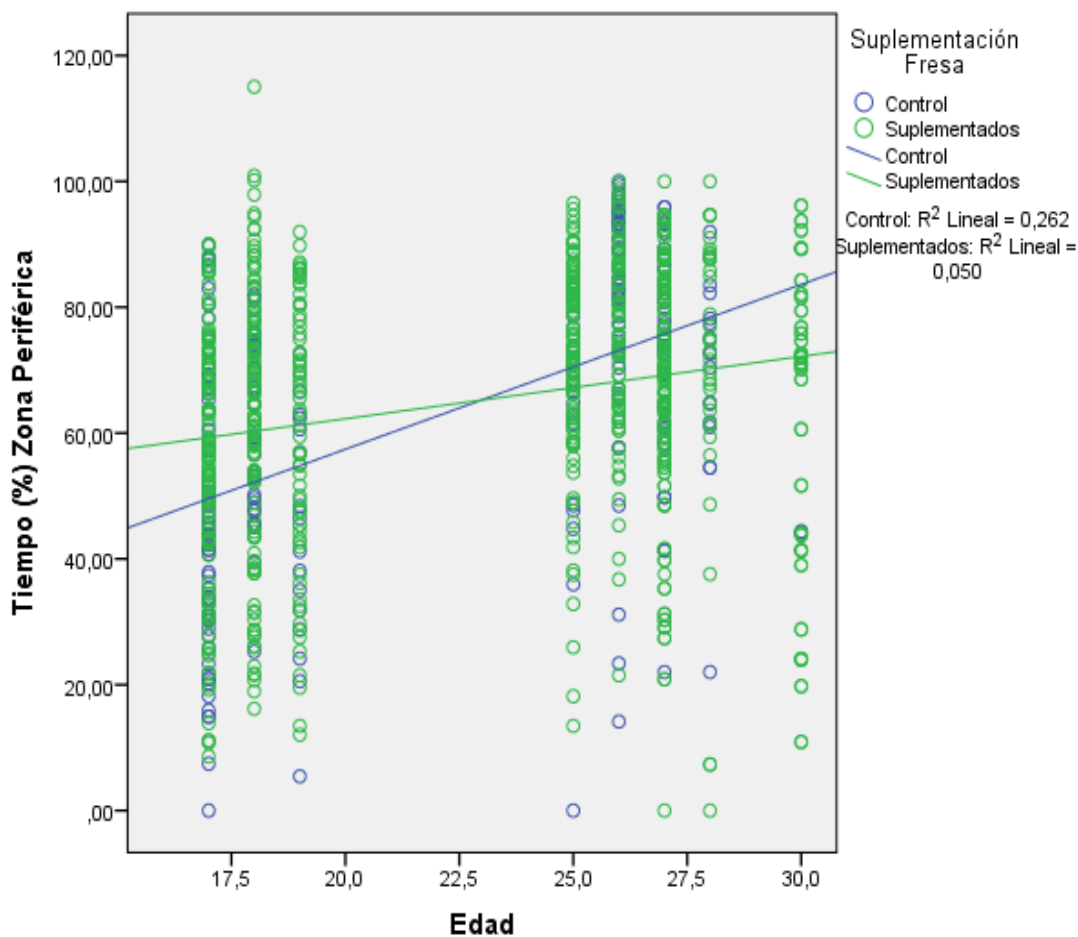


Ilustración 83. Ansiedad. % Tiempo de permanencia en la periferia de MWM. Estudio con la edad. Comparación entre animales controles y suplementado con fresa. Estudio A.

Respecto al porcentaje de distancia recorrida en la zona periférica se observa un aumento en los dos grupos aunque menos pronunciada en el grupo con suplementación de fresa, con una asociación muy significativa ($p < 0,01$) con la edad y también con una asociación a la administración de fresa aunque de menor significación ($p < 0,05$)

Coeficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		Sig.
		B	Error típ.	Beta	t	
1	(Constante)	54,424	1,758		30,959	,000
	Rango Edad	1,788	,261	,211	6,860	,000
	Suplementación Fresa	3,690	1,564	,072	2,359	,019

a. Variable dependiente: Distancia (%) Zona Periférica

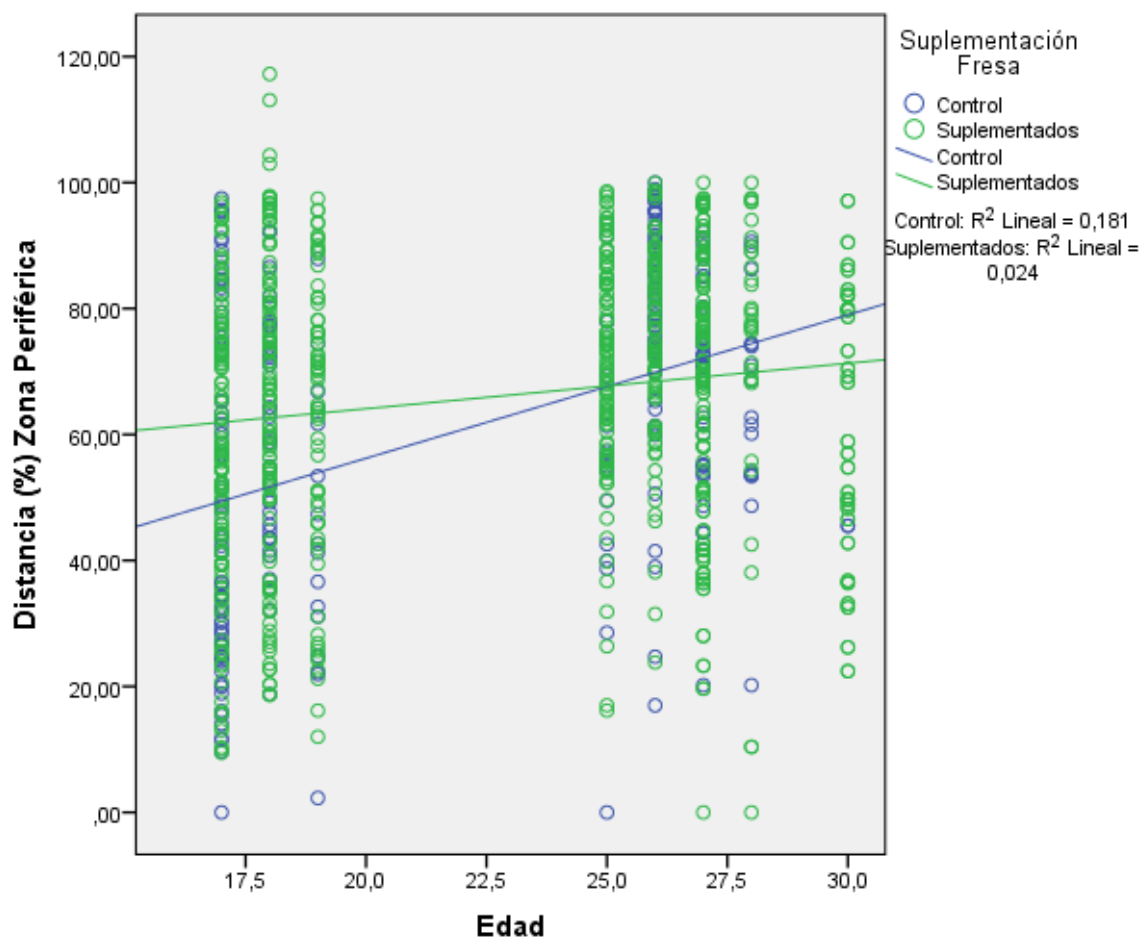


Ilustración 84. Ansiedad. % Distancia recorrida en la periferia de MWM. Estudio con la edad. Comparación entre animales controles y suplementado con fresa. Estudio A

4.3.2.2.3.1.1 Signo de tigmotaxis en laberinto acuático.

4.3.2.2.3.2 Velocidad media de natación en Laberinto Acuático.

Disminuye la velocidad media en el grupo control pero no en el grupo experimental en la repetición de la prueba presentado diferencias significativas en ambos casos.

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: Velocidad media (cm/s)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	842,361 ^a	3	280,787	7,034	,000
Intersección	397465,083	1	397465,083	9957,193	,000
Trial_Fase	301,451	1	301,451	7,552	,006
FRESA	579,639	1	579,639	14,521	,000
Trial_Fase * FRESA	226,302	1	226,302	5,669	,017
Error	71571,870	1793	39,917		
Total	626755,007	1797			
Total corregida	72414,231	1796			

a. R cuadrado = ,012 (R cuadrado corregida = ,010)

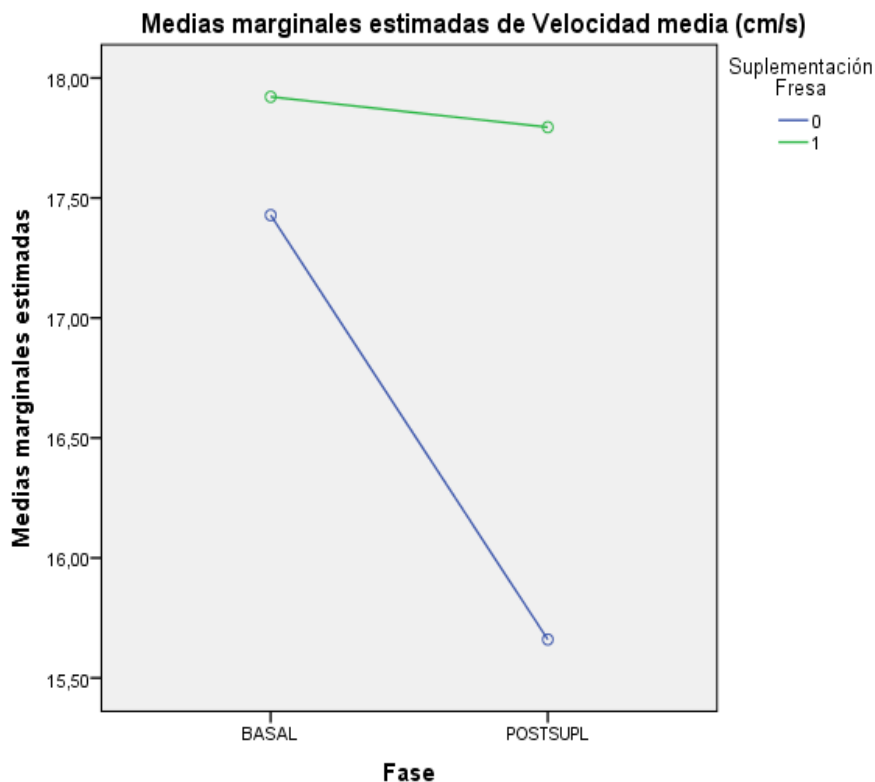


Ilustración 85. Motilidad y capacidad física. Efecto de suplementación de fresas en la velocidad media de natación en laberinto acuático. Resultados basal y posteriores a la suplementación.



- Evolución durante el envejecimiento.

Respecto a la velocidad media se observa una disminución en los dos grupos aunque menos pronunciada en el grupo con suplementación de fresa, con una asociación muy significativa ($p < 0,01$) con la edad y también con una asociación muy significativa a la administración de fresa ($p < 0,01$)

Coefficientesa

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	33,748	,717		47,065	,000
	Edad	-,779	,029	-,638	-26,449	,000
	Suplementación Fresa	1,584	,309	,124	5,129	,000

a. Variable dependiente: Velocidad Media (cm/sg)

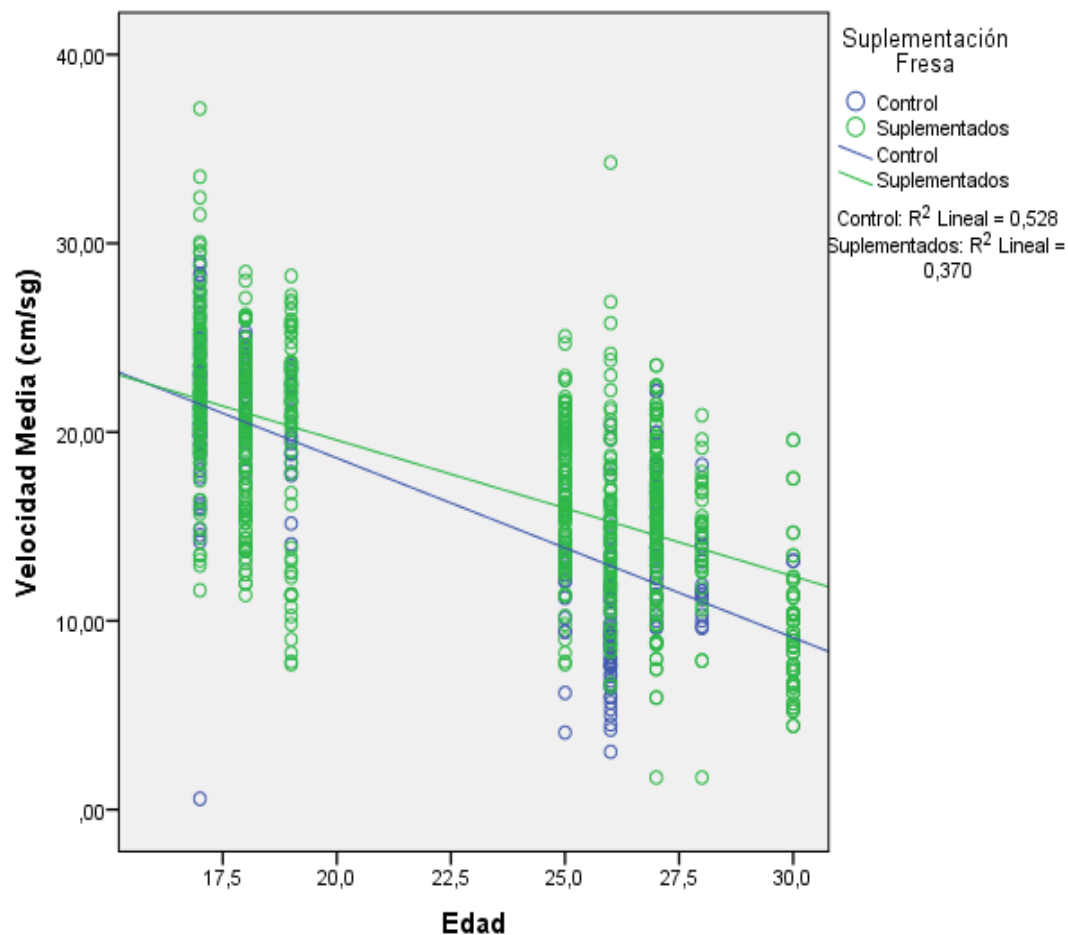


Ilustración 86. Motilidad y capacidad física. Velocidad Media Natación en Laberinto Acuático de Morris MWM. Evolución con la edad de animales controles y suplementados. Estudio A

4.3.2.2.3.3 Actividad total en Laberinto Acuático.

La actividad global en el laberinto acuático aumenta de la determinación en fase basal a la 2ª fase $p < 0,001$. No hay diferencia entre los animales controles y suplementados.

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: Actividad Global Total

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3412333239,500 ^a	3	1137444413,167	37,631	,000
Intersección	7471542372,807	1	7471542372,807	247,184	,000
Trial_Fase	2951027349,495	1	2951027349,495	97,630	,000
FRESA	137089,981	1	137089,981	,005	,946
Trial_Fase * FRESA	42781523,964	1	42781523,964	1,415	,234
Error	54196373773,348	1793	30226644,603		
Total	65339571462,163	1797			
Total corregida	57608707012,848	1796			

a. R cuadrado = ,059 (R cuadrado corregida = ,058)

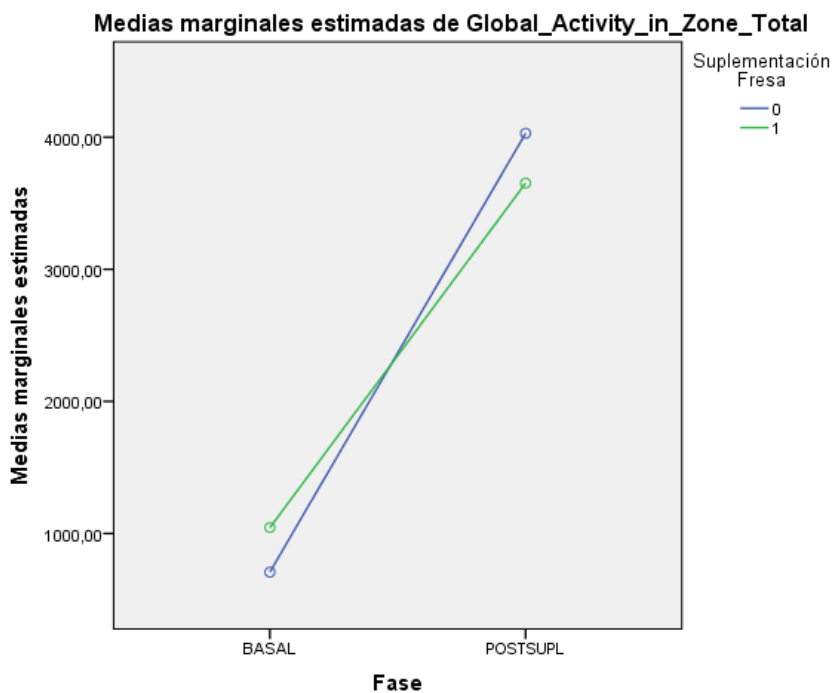


Ilustración 87. Actividad total en laberinto acuático. Cuadro 1 resultados previos y posteriores; cuadro 2 evolución durante el envejecimiento.



- Evolución durante el envejecimiento.

La actividad global se ve afectada significativamente por la edad $p < 0,01$. No se ven diferencias significativas de la suplementación con fresa manteniéndose constante a lo largo de todas las edades estudiadas.

Coeficientes

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
1 (Constante)	6315,010	808,561		7,810	,000
Edad	-165,353	33,207	-,155	-4,979	,000
Suplementación Fresa	-241,090	348,215	-,022	-,692	,489

a. Variable dependiente: Actividad Global (cm²/sg) L A Morris

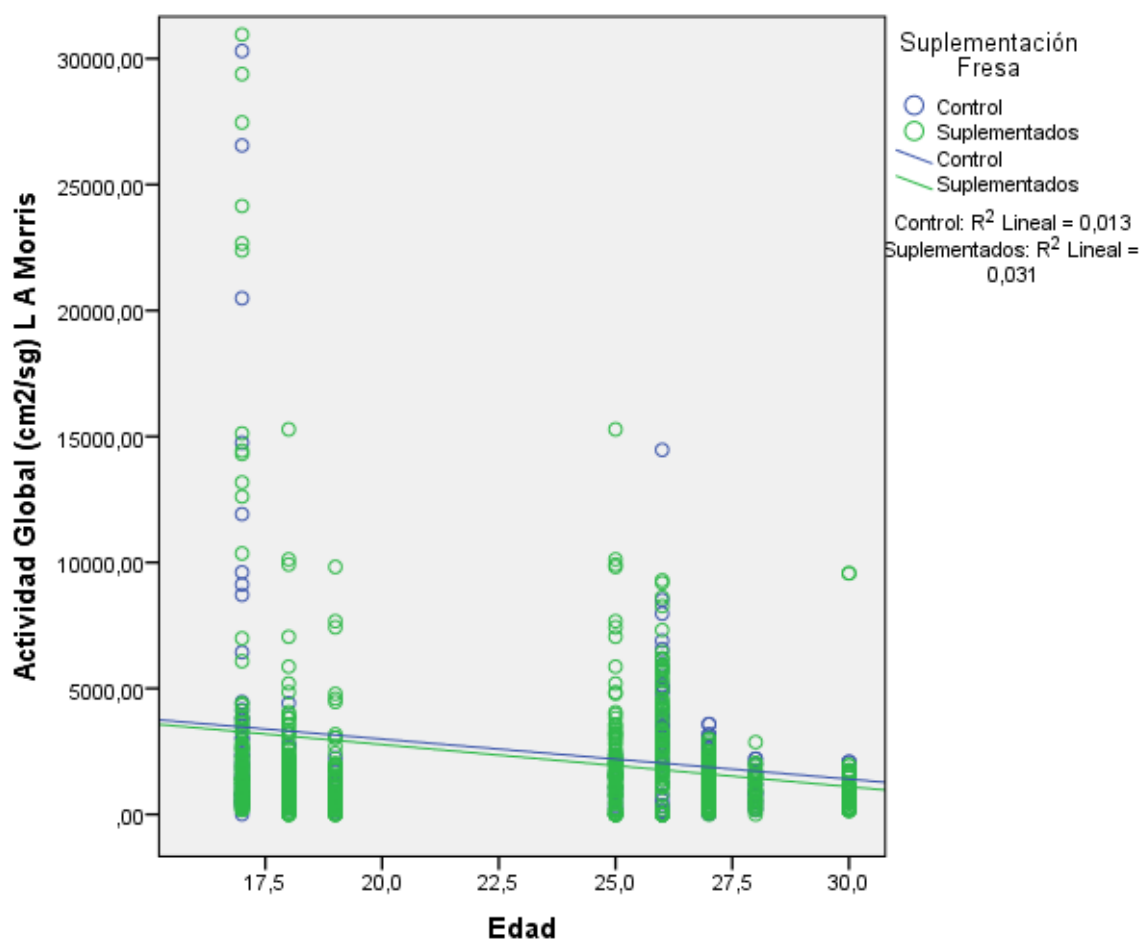


Ilustración 88. Motilidad y capacidad física. Actividad global Total Laberinto Acuático de Morris. Evolución Envejecimiento Animales controles y suplementados. Estudio A

4.3.2.2.3.4 Signos neuromotores anómalos en Laberinto Acuático.

Se observan episodios esporádicos de incoordinación o avance ineficiente en la natación. No se puede establecer diferencias en ese capítulo.

4.3.2.3 Estudio de parámetros de evaluación neurológica: Estudio B.

Parámetros sensitivos:

Parámetros de somestesis, temperatura, olfato y audición.

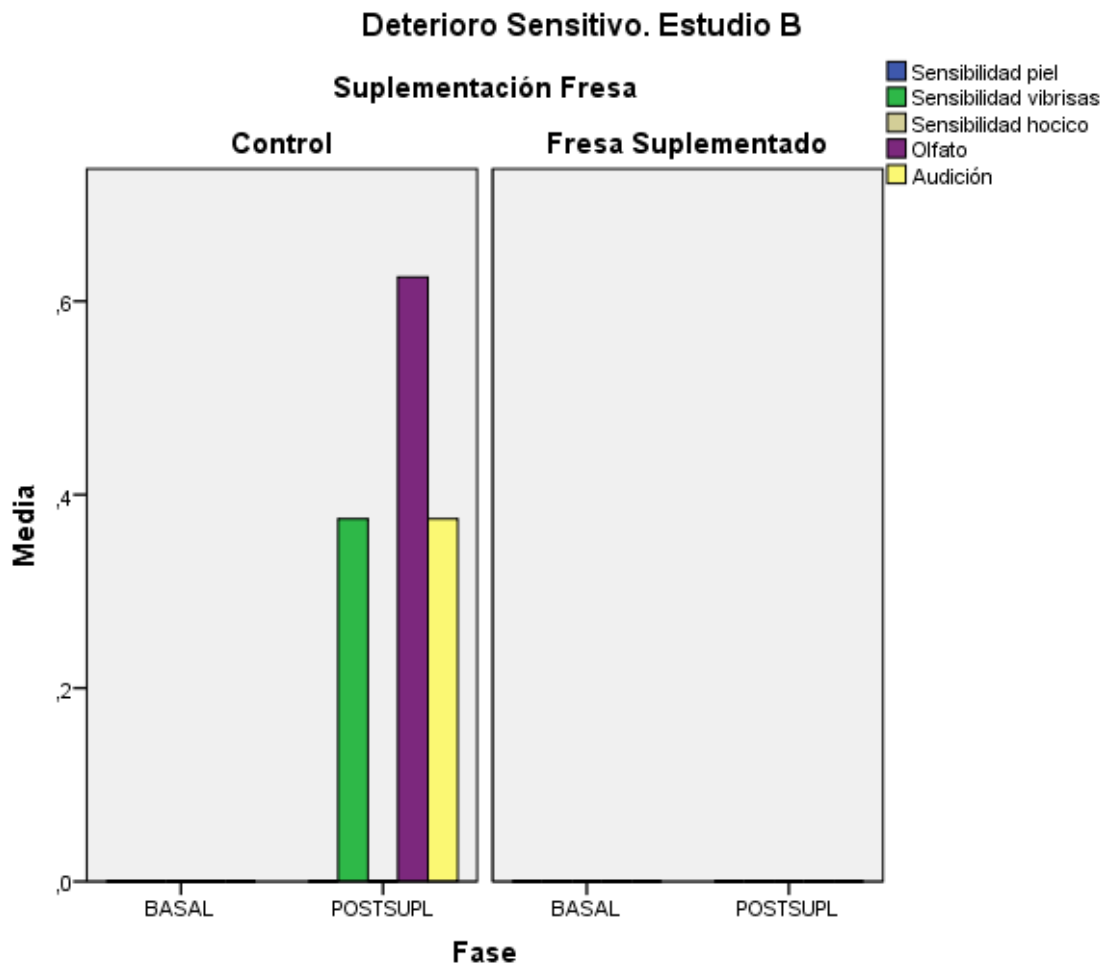


Ilustración 89. Evaluación neurológica. Estudio gráfico Somestesis, sensibilidad de la piel. Estudio B

Deterioro Reflejos Propiocepción y Equilibrio. Estudio B

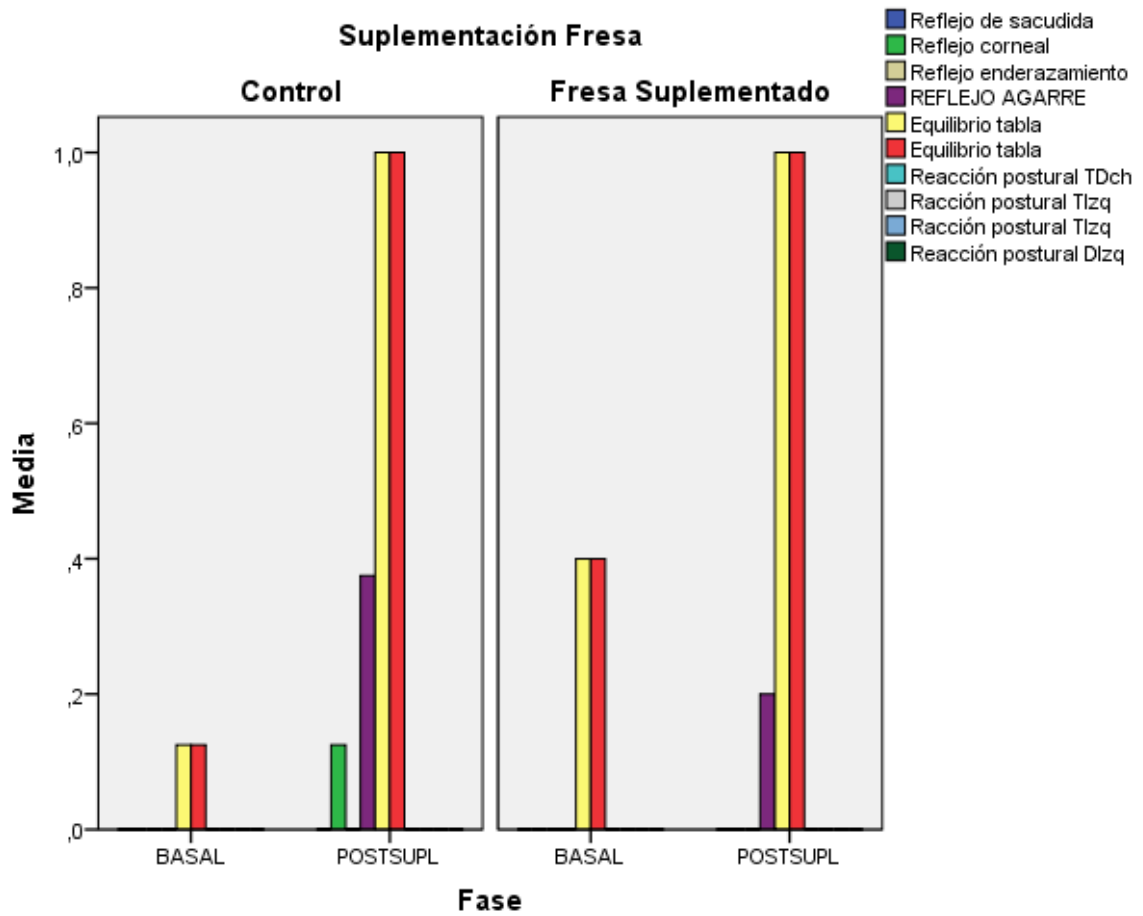


Ilustración 90. Evaluación neurológica. Equilibrio Reflejos relacionados con la propiocepción. Estudio B.

Algesia.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	HOTPLATEANT_seg	121,112 ^a	3	40,371	4,412	,014
corregido	HOTPLATEpost_seg	19,229 ^b	3	6,410	,496	,689
Intersección	HOTPLATEANT_seg	4559,769	1	4559,769	498,325	,000
	HOTPLATEpost_seg	6055,182	1	6055,182	468,142	,000
FRESAS	HOTPLATEANT_seg	23,146	1	23,146	2,530	,126
	HOTPLATEpost_seg	,608	1	,608	,047	,830
FASE	HOTPLATEANT_seg	90,135	1	90,135	9,851	,005
	HOTPLATEpost_seg	18,594	1	18,594	1,438	,243
FRESAS * FASE	HOTPLATEANT_seg	24,147	1	24,147	2,639	,119
	HOTPLATEpost_seg	,694	1	,694	,054	,819
Error	HOTPLATEANT_seg	201,304	22	9,150		
	HOTPLATEpost_seg	284,559	22	12,934		
Total	HOTPLATEANT_seg	4981,601	26			
	HOTPLATEpost_seg	6729,181	26			
Total corregida	HOTPLATEANT_seg	322,417	25			
	HOTPLATEpost_seg	303,788	25			

a. R cuadrado = ,376 (R cuadrado corregida = ,290)

b. R cuadrado = ,063 (R cuadrado corregida = -,064)

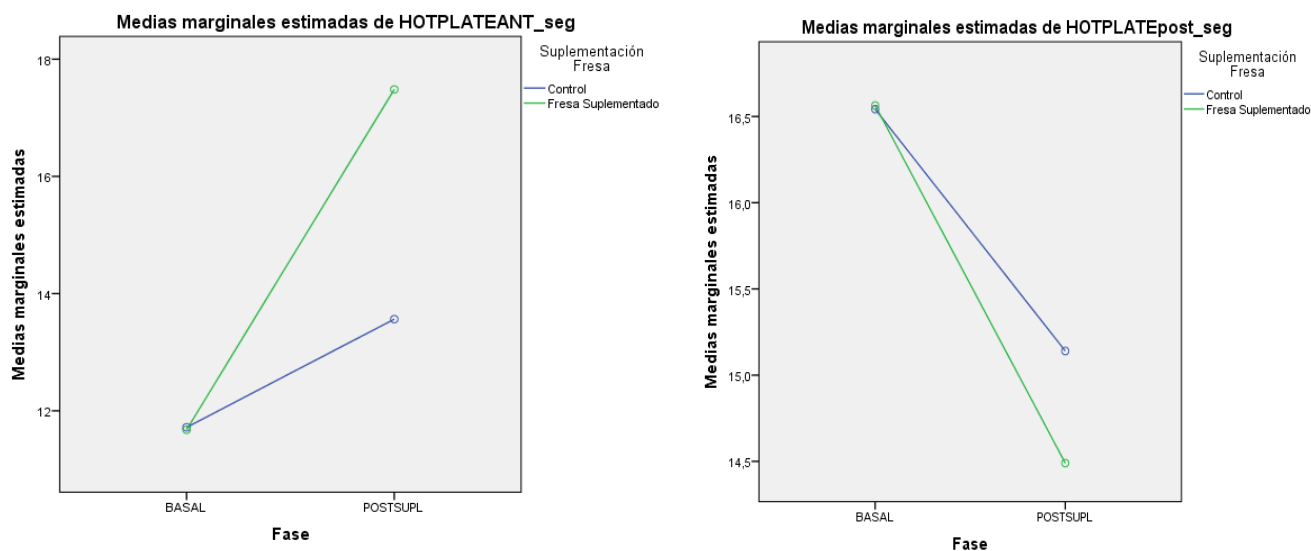


Ilustración 91. Evaluación neurológica. Termalgesia. Tiempos de retirada en HP. Comparativa entre fases basal y posterior a la suplementación y animales controles suplementados con fresa. Estudio B

Esfuerzo de agarre

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: ESFUERZO AGARRE

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	494,505 ^a	3	164,835	14,207	,000
Intersección	915,713	1	915,713	78,923	,000
FASE	478,560	1	478,560	41,246	,000
FRESAS	15,626	1	15,626	1,347	,258
FASE * FRESAS	20,239	1	20,239	1,744	,200
Error	255,256	22	11,603		
Total	1659,547	26			
Total corregida	749,761	25			

a. R cuadrado = ,660 (R cuadrado corregida = ,613)

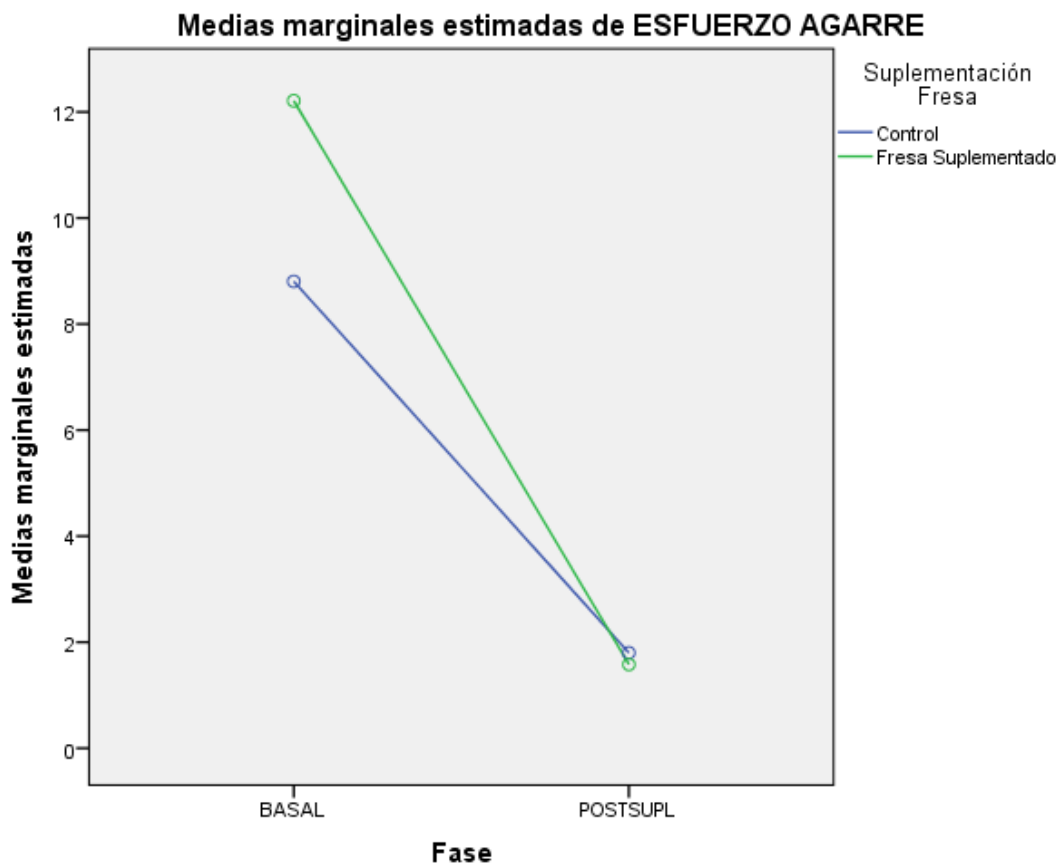


Ilustración 92. Evaluación neurológica. Capacidad física y Esfuerzo. Tiempos de permanencia agarrado al alambre. Comparativa entra fases basal y posterior a la suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B



4.3.2.4 Estudio de parámetros cognitivos: Estudio B.

Comparamos los resultados antes y después de tomar fresas en los animales con dieta y controles.

4.3.2.4.1.1 Memoria. Estudio B

4.3.2.4.1.1.1 Latencia de escape en Laberinto Acuático.

En segunda prueba (POSTSUPL: edad 15 meses) se observa un aumento del tempo de latencia media de 3,1 sg, pero con nivel de significación $p > 0,05$.

Entre animales tratados y controles no hay diferencia $p > 0,05$

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: Latencia Escape (sg)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	322,848 ^a	3	107,616	1,083	,360
Intersección	9714,189	1	9714,189	97,768	,000
Trial_Fase	314,957	1	314,957	3,170	,078
FRESA	,462	1	,462	,005	,946
Trial_Fase * FRESA	14,393	1	14,393	,145	,704
Error	10532,082	106	99,359		
Total	20631,389	110			
Total corregida	10854,930	109			

a. R cuadrado = ,030 (R cuadrado corregida = ,002)

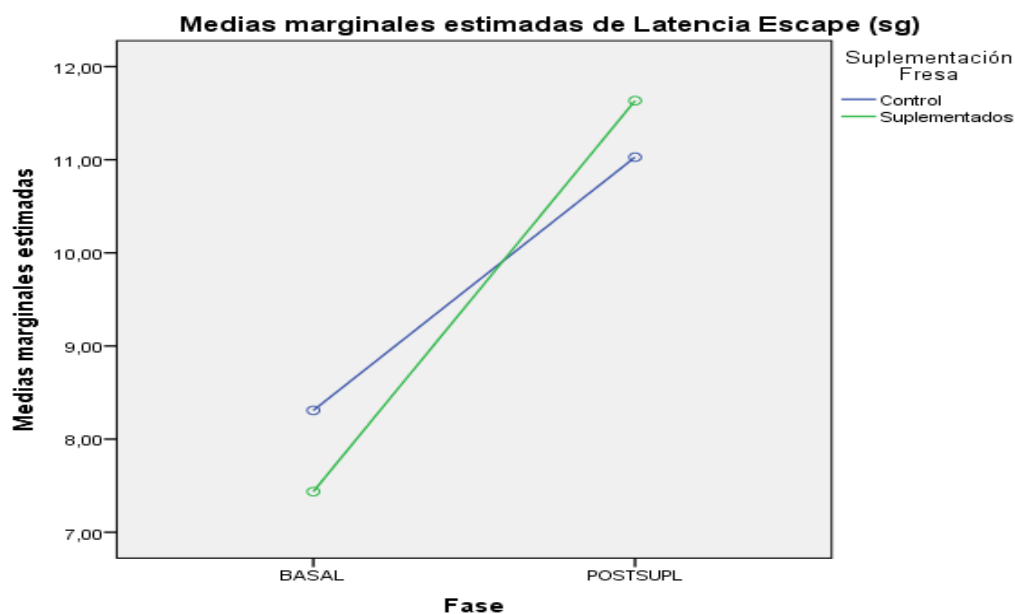


Ilustración 93. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Latencia de escape. Estudio B.

4.3.2.4.1.1.2 Distancia recorrida de escape en Laberinto Acuático.

En segunda prueba (POSTSUPL: edad 15 meses) se observa un aumento de la distancia recorrida de escape. Distancia media previa 284,03 cm, Distancia media posterior 376,96 cm. con nivel de significación $p > 0,05$

Entre animales tratados y controles no hay diferencia significativa $p > 0,05$.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Distancia Escape (cm)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	df	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	602046,348 ^a	3	200682,116	4,008	,010
Intersección	3613336,113	1	3613336,113	72,165	,000
Trial_Fase	600409,515	1	600409,515	11,991	,001
FRESA	9603,833	1	9603,833	,192	,662
Trial_Fase * FRESA	27067,212	1	27067,212	,541	,464
Error	5307443,132	106	50070,218		
Total	9307900,484	110			
Total corregida	5909489,480	109			

a. R cuadrado = ,102 (R cuadrado corregida = ,076)

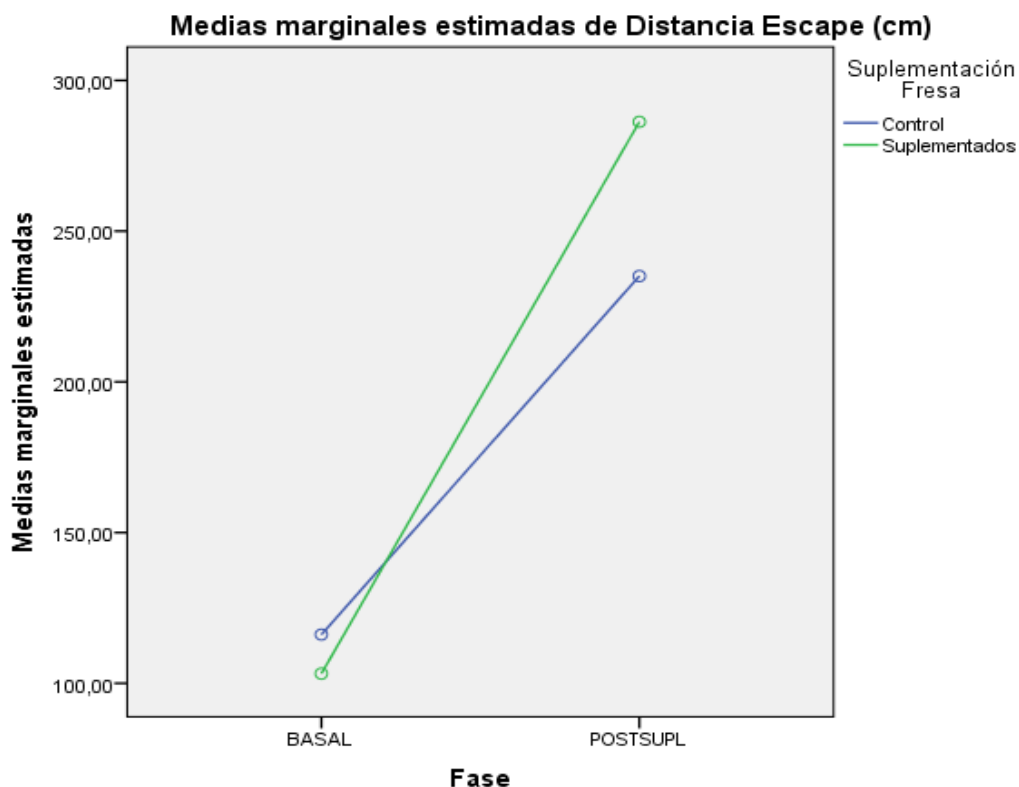


Ilustración 94. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Distancia de escape. Estudio

B.



4.3.2.4.1.1.3 Curva de aprendizaje.

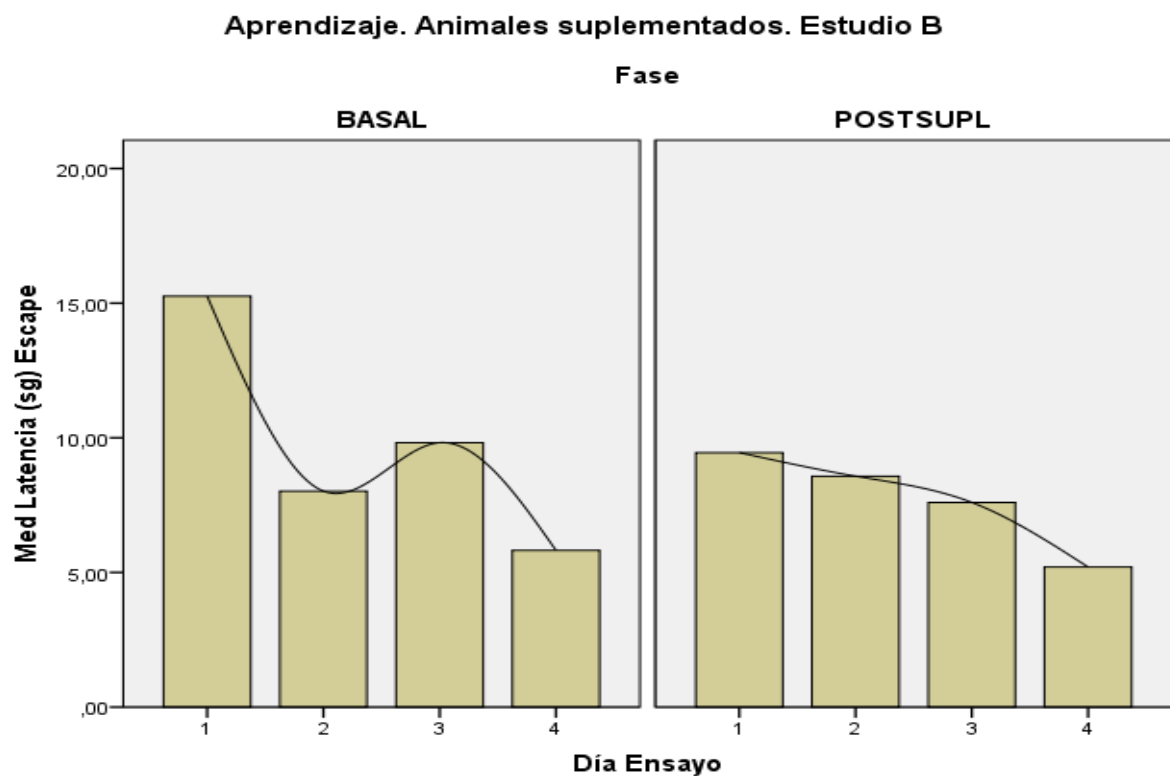
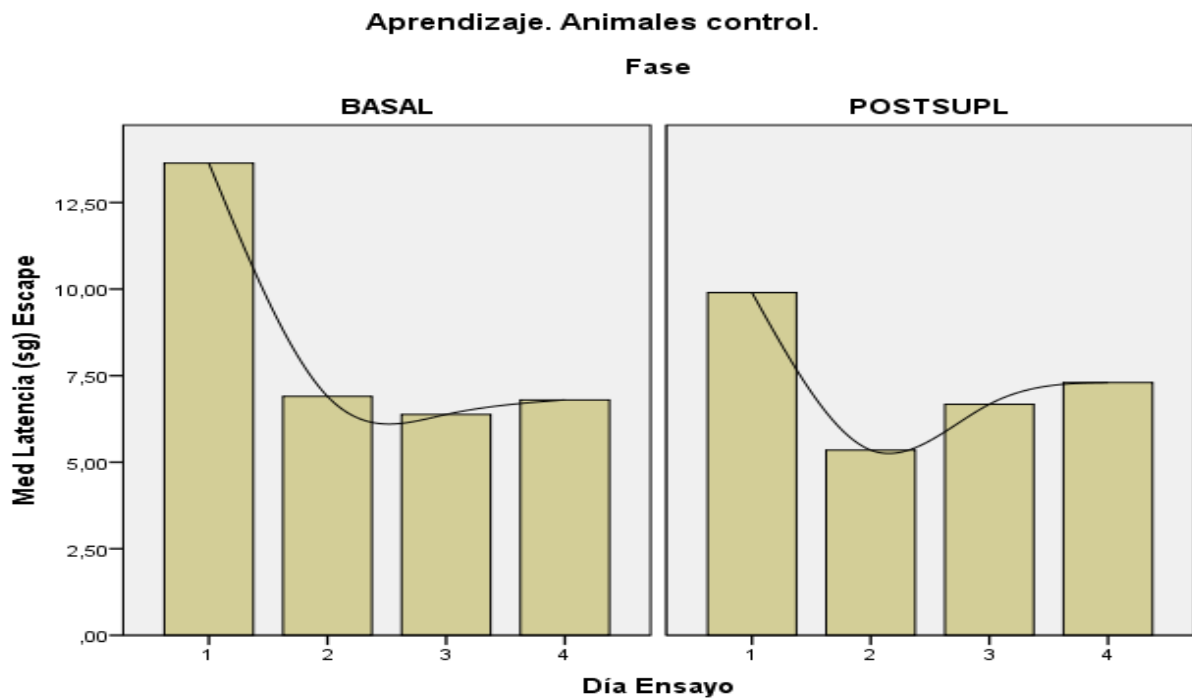


Ilustración 95. Aprendizaje. Comparación de las latencias de escape recorridas entre el primer y cuarto día en las fases basal y posterior a la suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B.

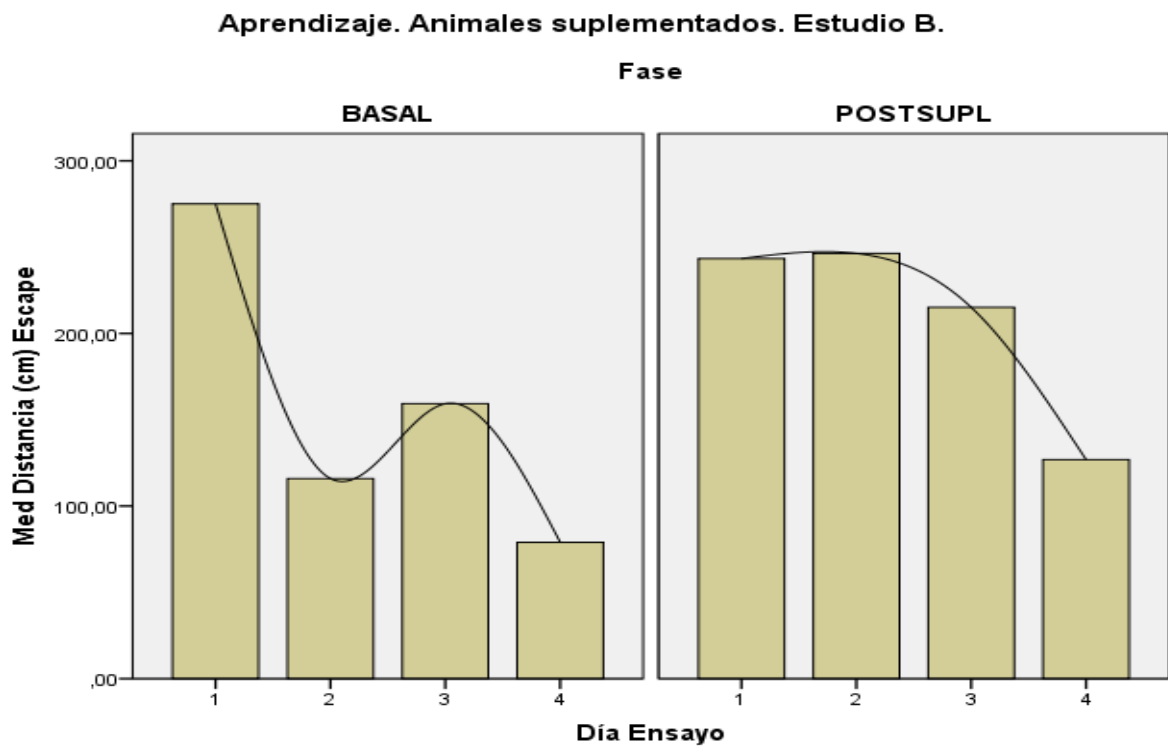
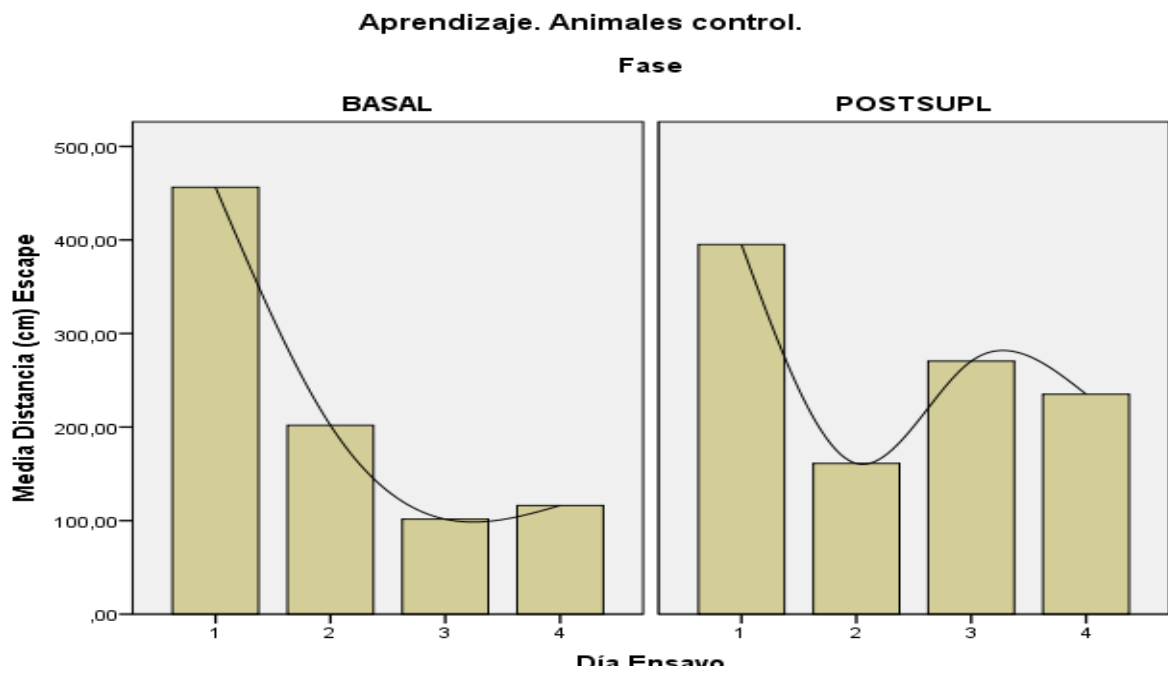


Ilustración 96. Aprendizaje. Comparación de las distancias de escape recorridas entre el primer y cuarto día en las fases basal y posterior a la suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B



4.3.2.4.1.1.4 Estrategia de búsqueda en Laberinto Acuático.

En segunda prueba (postsuplementación: edad 15 meses) se observa una disminución del porcentaje de estrategias espaciales. Entre animales tratados y controles no hay diferencia Porcentaje de estrategias espaciales de suplementados: 32 % Porcentaje medio de estrategias espaciales de controles: 32%.

Tabla 6. Tabla de frecuencias y porcentaje de estrategias de búsqueda.

Suplementación Fresa			Fase		Total
			BASAL	POSTSUPL	
Control	Estrategia Búsqueda	Recuento	1	5	6
		CHAI % dentro de Estrategia Búsqueda	16,7%	83,3%	100,0%
		% dentro de Fase	3,1%	16,1%	9,5%
		Recuento	1	6	7
		CIRC % dentro de Estrategia Búsqueda	14,3%	85,7%	100,0%
		% dentro de Fase	3,1%	19,4%	11,1%
		Recuento	0	3	3
		PERI % dentro de Estrategia Búsqueda	0,0%	100,0%	100,0%
		% dentro de Fase	0,0%	9,7%	4,8%
		Recuento	1	5	6
		RAND % dentro de Estrategia Búsqueda	16,7%	83,3%	100,0%
		% dentro de Fase	3,1%	16,1%	9,5%
		Recuento	1	2	3
		SEAR % dentro de Estrategia Búsqueda	33,3%	66,7%	100,0%
		% dentro de Fase	3,1%	6,5%	4,8%
		Recuento	14	6	20
		SPAD % dentro de Estrategia Búsqueda	70,0%	30,0%	100,0%
		% dentro de Fase	43,8%	19,4%	31,7%
		Recuento	6	0	6
		SPAFC % dentro de Estrategia Búsqueda	100,0%	0,0%	100,0%
% dentro de Fase	18,8%	0,0%	9,5%		
Recuento	8	4	12		
SPAI % dentro de Estrategia Búsqueda	66,7%	33,3%	100,0%		
% dentro de Fase	25,0%	12,9%	19,0%		
Recuento	32	31	63		
Total	% dentro de Estrategia Búsqueda	50,8%	49,2%	100,0%	
	% dentro de Fase	100,0%	100,0%	100,0%	
	Recuento	0	2	2	
	CHAI % dentro de Estrategia Búsqueda	0,0%	100,0%	100,0%	
	% dentro de Fase	0,0%	10,5%	4,3%	
	Recuento	1	7	8	
	CIRC % dentro de Estrategia Búsqueda	12,5%	87,5%	100,0%	
	% dentro de Fase	3,6%	36,8%	17,0%	
	Recuento	0	4	4	
	RAND % dentro de Estrategia Búsqueda	0,0%	100,0%	100,0%	
	% dentro de Fase	0,0%	21,1%	8,5%	
	Recuento	2	0	2	
	SEAR % dentro de Estrategia Búsqueda	100,0%	0,0%	100,0%	
	% dentro de Fase	7,1%	0,0%	4,3%	
	Recuento	13	4	17	
	SPAD % dentro de Estrategia Búsqueda	76,5%	23,5%	100,0%	
	% dentro de Fase	46,4%	21,1%	36,2%	
	Recuento	4	0	4	
	SPAFC % dentro de Estrategia Búsqueda	100,0%	0,0%	100,0%	
	% dentro de Fase	14,3%	0,0%	8,5%	
	Recuento	8	2	10	
	SPAI % dentro de Estrategia Búsqueda	80,0%	20,0%	100,0%	
	% dentro de Fase	28,6%	10,5%	21,3%	
	Recuento	28	19	47	
Total	% dentro de Estrategia Búsqueda	59,6%	40,4%	100,0%	
	% dentro de Fase	100,0%	100,0%	100,0%	

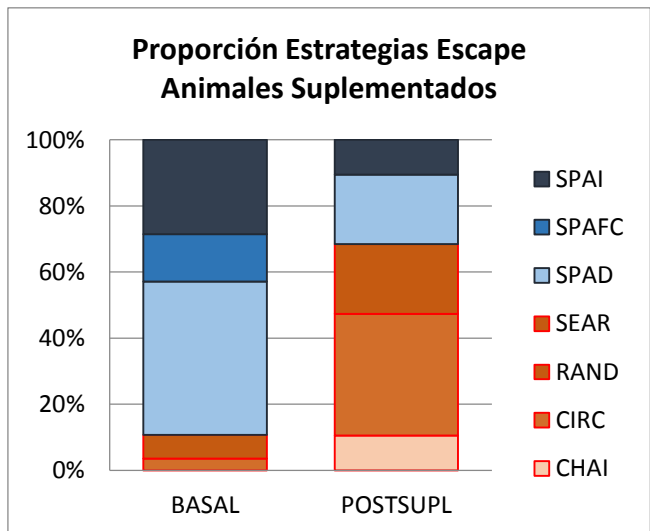
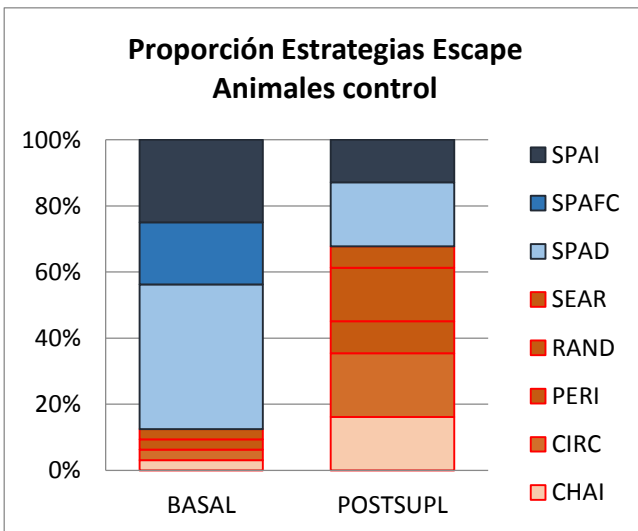
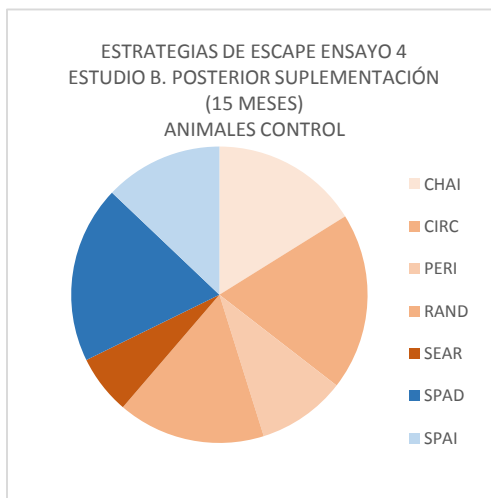
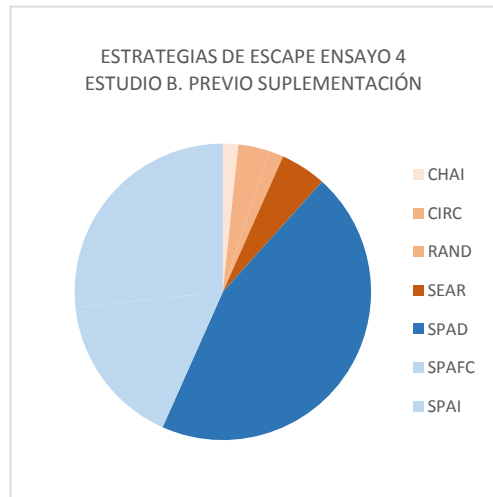


Ilustración 97. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Proporción estrategias de búsqueda. Azul estrategias espaciales.



Permanencia en el cuadrante de escape en Laberinto Acuático.

En segunda prueba (POSUPL: edad 15 meses) se observa un aumento de la distancia que recorren en el cuadrante de escape en el ensayo 5º de extinción. Diferencia distancia en cuadrante de escape previa -78,0303 cm. Con nivel de significación $p > 0,05$

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Tiempo (%) Cuadrante Escape

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	523,393 ^a	3	174,464	1,263	,310
Intersección	57529,537	1	57529,537	416,581	,000
Trial_Fase	368,214	1	368,214	2,666	,116
FRESA	16,032	1	16,032	,116	,736
Trial_Fase * FRESA	170,370	1	170,370	1,234	,278
Error	3176,286	23	138,099		
Total	67596,102	27			
Total corregida	3699,679	26			

a. R cuadrado = ,141 (R cuadrado corregida = ,029)

Medias marginales estimadas de Tiempo (%) Cuadrante Escape

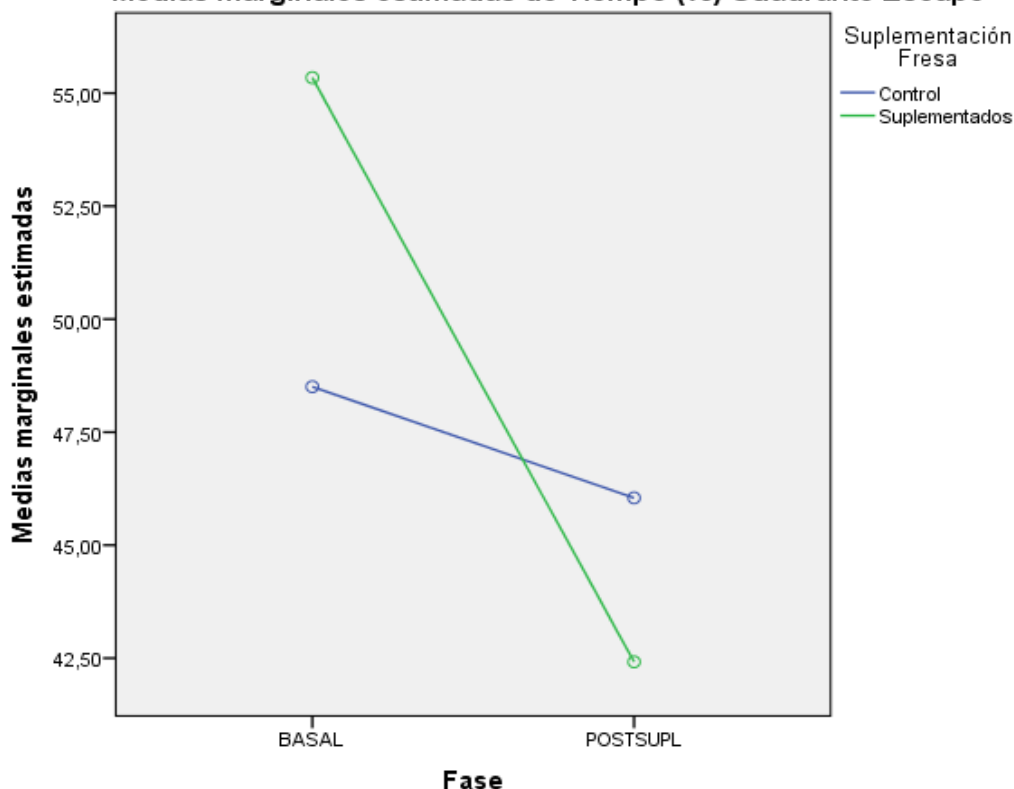


Ilustración 98. Memoria espacial. % Tiempo permanencia en el cuadrante de escape 1º intento de 5º día de ensayo. Estudio B

Entre animales tratados y controles no hay diferencia significativa. Distancia media recorrida por animales suplementados: 211,66 cm; Distancia media recorrida por animales controles: 251,32375 cm. Nivel de significación $p > 0,05$

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Distancia (%) Cuadrante Escape

Origen	Suma de los cuadrados tipo III	df	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	506,818 ^a	3	168,939	1,651	,205
Intersección	51664,230	1	51664,230	504,914	,000
Trial_Fase	306,026	1	306,026	2,991	,097
FRESA	56,910	1	56,910	,556	,463
Trial_Fase * FRESA	133,849	1	133,849	1,308	,265
Error	2353,425	23	102,323		
Total	59813,903	27			
Total corregida	2860,243	26			

a. R cuadrado = ,177 (R cuadrado corregida = ,070)

Medias marginales estimadas de Distancia (%) Cuadrante Escape

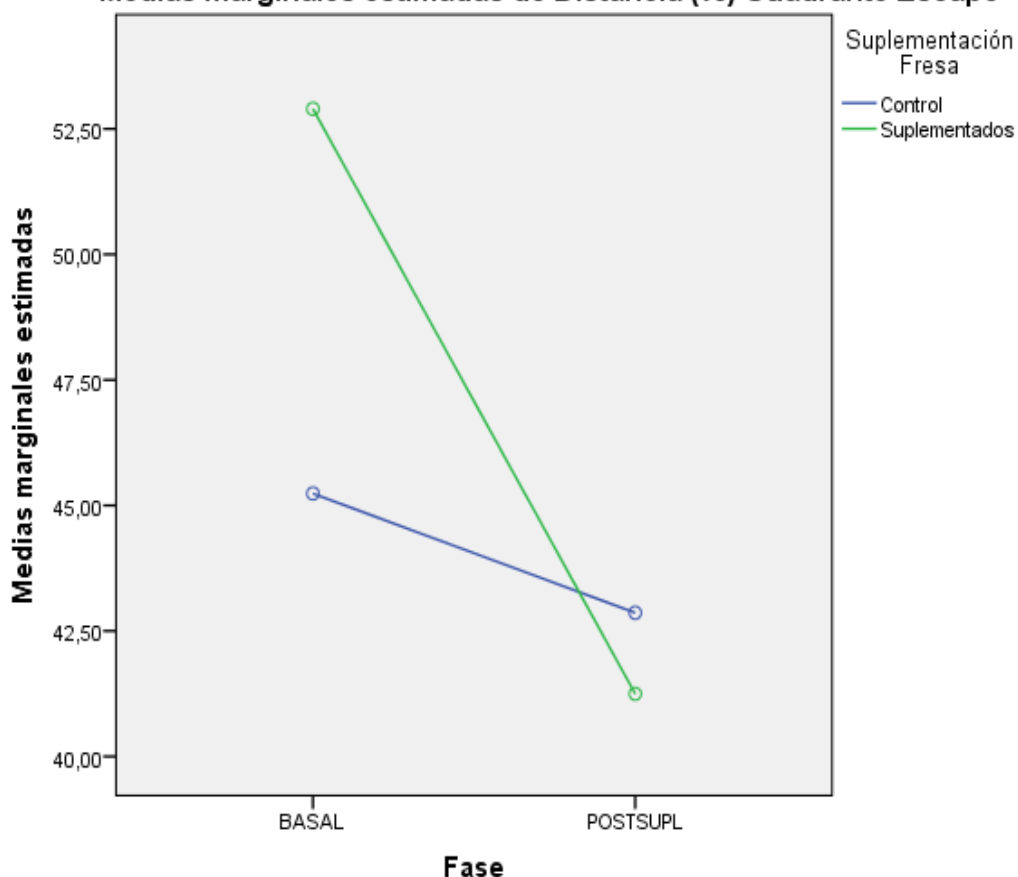


Ilustración 99. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. % Distancia recorridas en el cuadrante correcto. Estudio B.



4.3.2.4.1.1.5 Número de veces que el animal cruza el cuadrante de escape en Laberinto Acuático.

Hay un aumento del parámetro en la fase posterior que afecta a todos los animales y se aprecia una mejora en el segundo muestreo aunque no es significativo $p > 0,05$.

Los animales tratados sobre los controles alcanzan un aumento de entradas pero no tiene significación $p > 0,05$.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Entradas Cuadrante Escape

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3,827 ^a	3	1,276	,403	,752
Intersección	618,893	1	618,893	195,424	,000
Trial_Fase	2,643	1	2,643	,835	,370
FRESA	,754	1	,754	,238	,630
Trial_Fase * FRESA	1,727	1	1,727	,545	,468
Error	72,839	23	3,167		
Total	722,000	27			
Total corregida	76,667	26			

a. R cuadrado = ,050 (R cuadrado corregida = -,074)

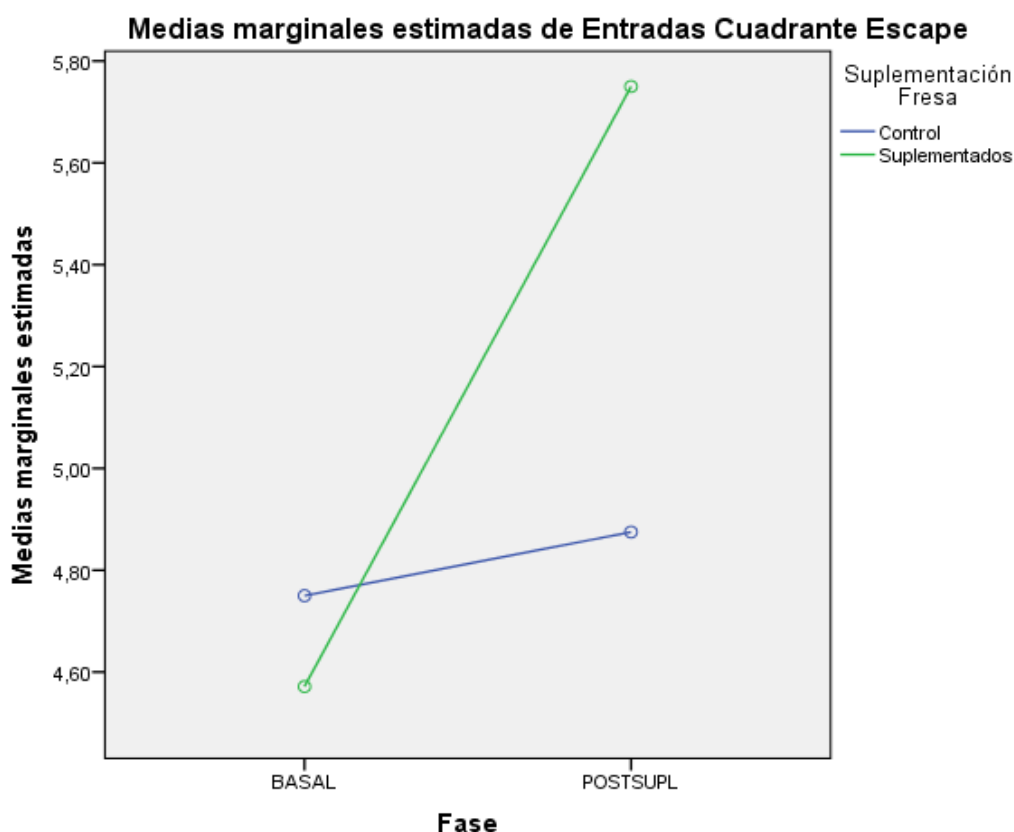


Ilustración 100. Memoria espacial, laberinto acuático de Morris. Entradas en el cuadrante de escape.

4.3.2.4.1.2 Reconocimiento social.

Debido a la conducta de los animales en cuanto a tiempos de conductas de reconocimiento social no podemos hacer por ahora un análisis de este parámetro.

4.3.2.4.1.3 Capacidad de reversión en Laberinto Acuático.

No hay variación significativa en las determinaciones basales y posteriores a la suplementación del tiempo de latencia de escape. Los animales suplementados descienden levemente este tiempo pero no se puede confirmar estadísticamente $p > 0,05$

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Latencia (sg) Escape

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	147,937 ^a	3	49,312	,485	,696
Intersección	2351,570	1	2351,570	23,147	,000
Trial_Fase	21,798	1	21,798	,215	,648
FRESA	97,122	1	97,122	,956	,338
Trial_Fase * FRESA	71,631	1	71,631	,705	,410
Error	2336,587	23	101,591		
Total	5392,793	27			
Total corregida	2484,524	26			

a. R cuadrado = ,060 (R cuadrado corregida = -,063)

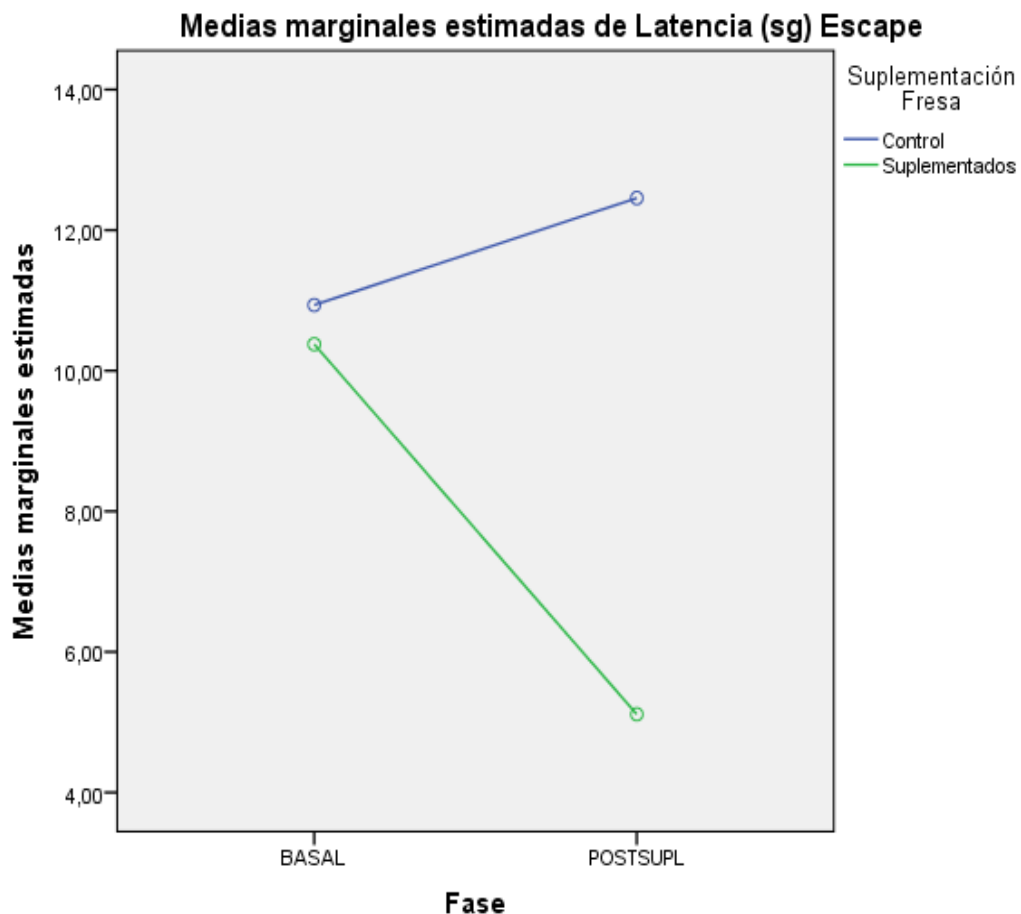


Ilustración 101. Aprendizaje. Reversión de aprendizaje. Latencia de escape en el 4º intento 5º día de ensayo. Estudio B.

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: Distancia (cm) Escape

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	117248,310 ^a	3	39082,770	,831	,491
Intersección	918017,352	1	918017,352	19,509	,000
Trial_Fase	10277,992	1	10277,992	,218	,645
FRESA	54115,980	1	54115,980	1,150	,295
Trial_Fase * FRESA	44482,037	1	44482,037	,945	,341
Error	1082296,435	23	47056,367		
Total	2313592,949	27			
Total corregida	1199544,746	26			

a. R cuadrado = ,098 (R cuadrado corregida = -,020)

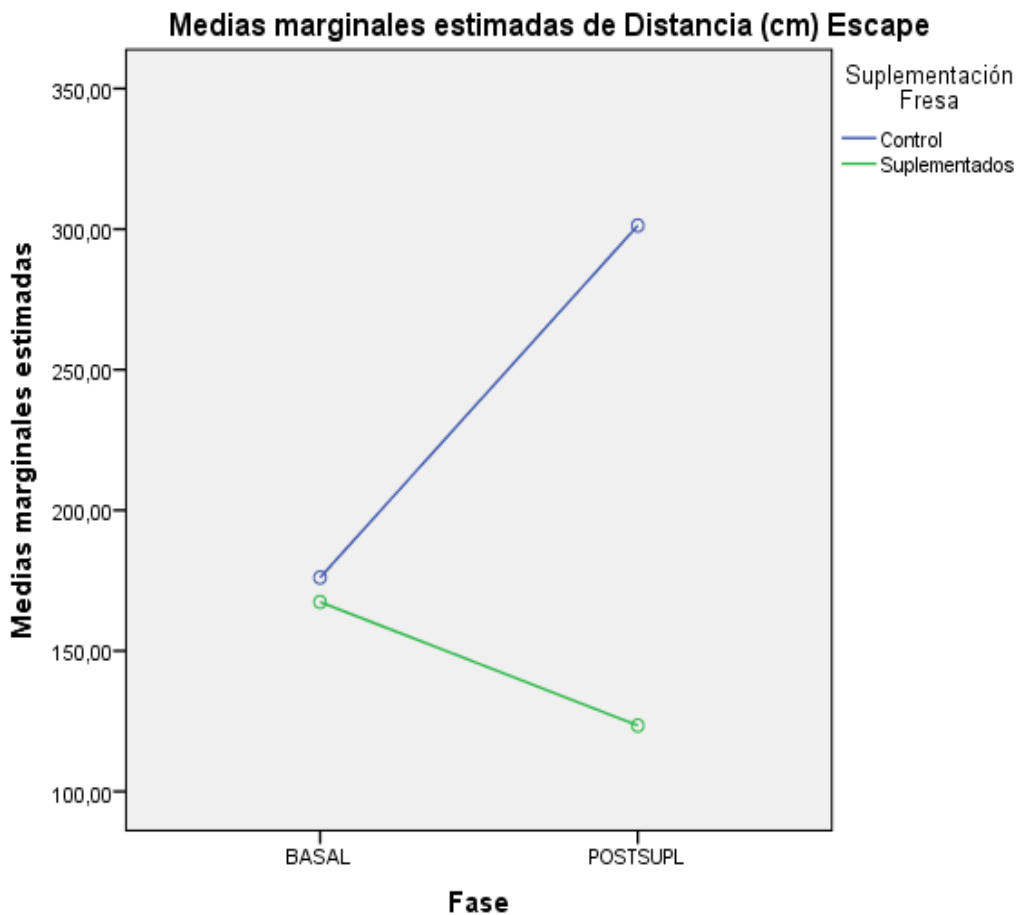


Ilustración 102. Aprendizaje. Reversión de aprendizaje. Distancia de escape en el 4º intento 5º día de ensayo. Estudio B.



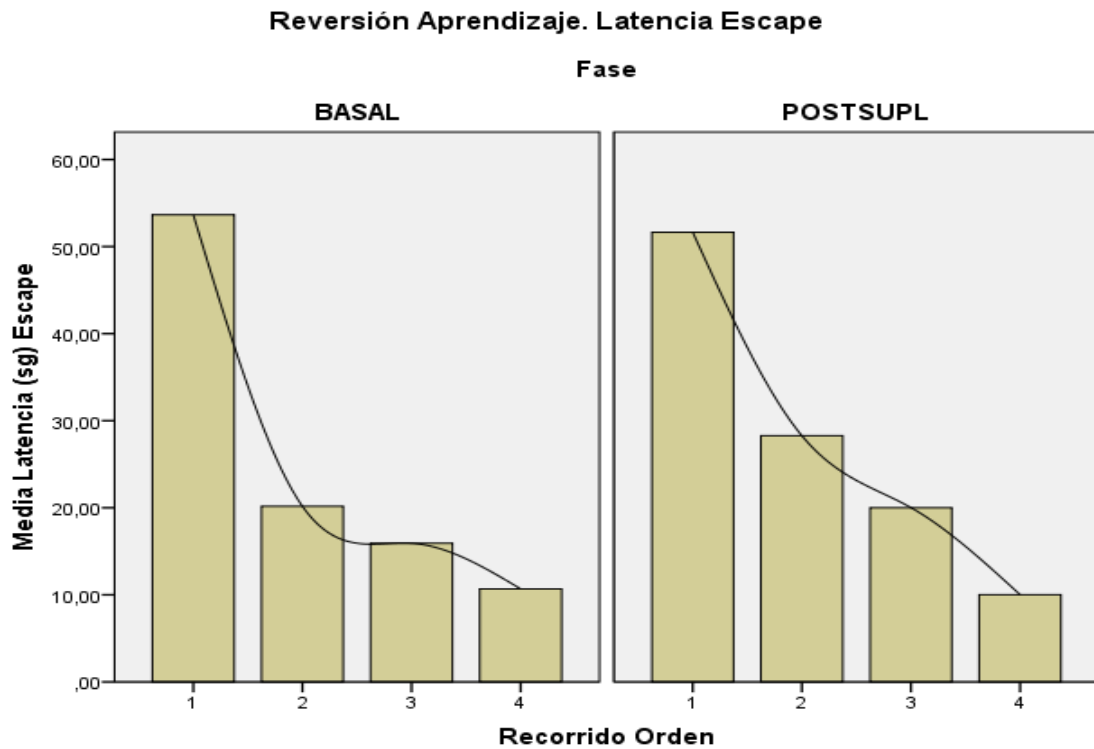


Ilustración 103. Capacidad de reversión. Latencias en los intentos 1-4 del 5º día de ensayo. Animales control. Estudio B

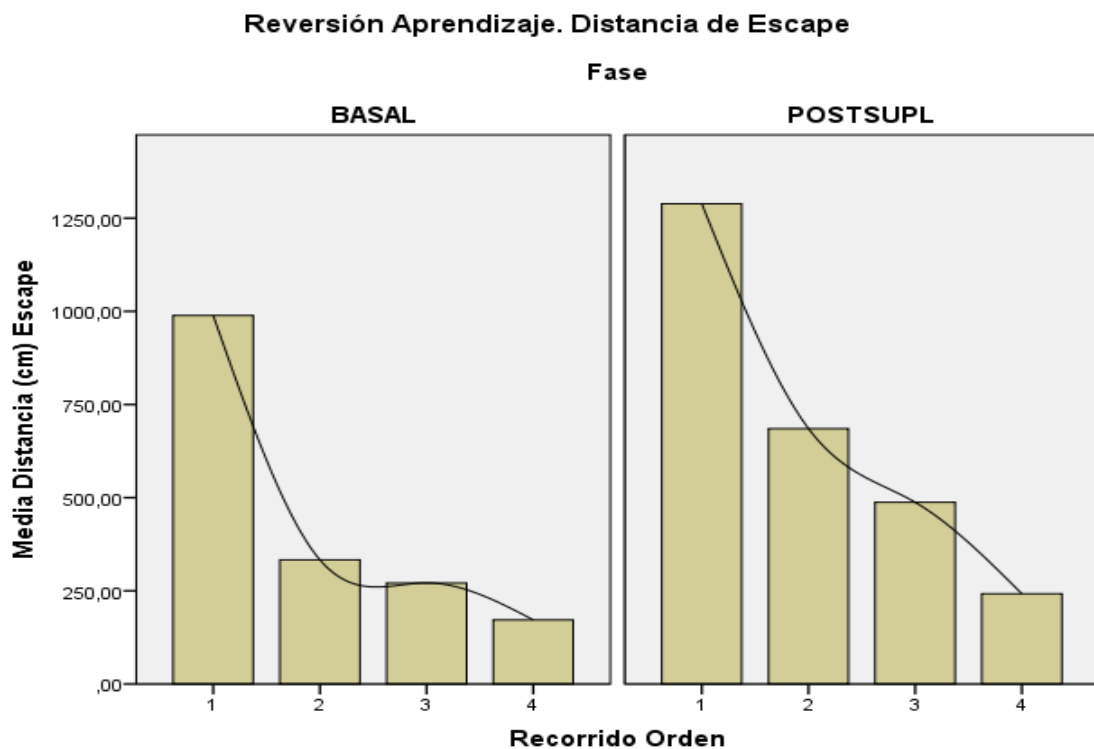


Ilustración 104. Capacidad de reversión. Distancias recorridas en los intentos 1-4 del 5º día de ensayo. Animales suplementados con fresa. Estudio B

4.3.2.4.2 *Ansiedad, Actitud Exploratoria y Capacidad Física; Parámetros en Campo Abierto: Estudio B*

4.3.2.4.2.1 *Permanencia en la zona periférica en Campo Abierto. Signo de tigmotaxis en campo abierto.*

- % de tiempo de permanencia en zonas de periférica y central.

Hay un leve aumento en la segunda fase pero carece de significación $p > 0,05$. Los animales controles y suplementados se comportan de modo estadísticamente similar.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Tiempo (%) Zona Periférica

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	54,444 ^a	3	18,148	,045	,987
Intersección	1093987,296	1	1093987,296	2740,737	,000
Trial_Fase	48,531	1	48,531	,122	,727
FRESA	,628	1	,628	,002	,968
Trial_Fase * FRESA	,768	1	,768	,002	,965
Error	219936,112	551	399,158		
Total	1360444,853	555			
Total corregida	219990,556	554			

a. R cuadrado = ,000 (R cuadrado corregida = -,005)

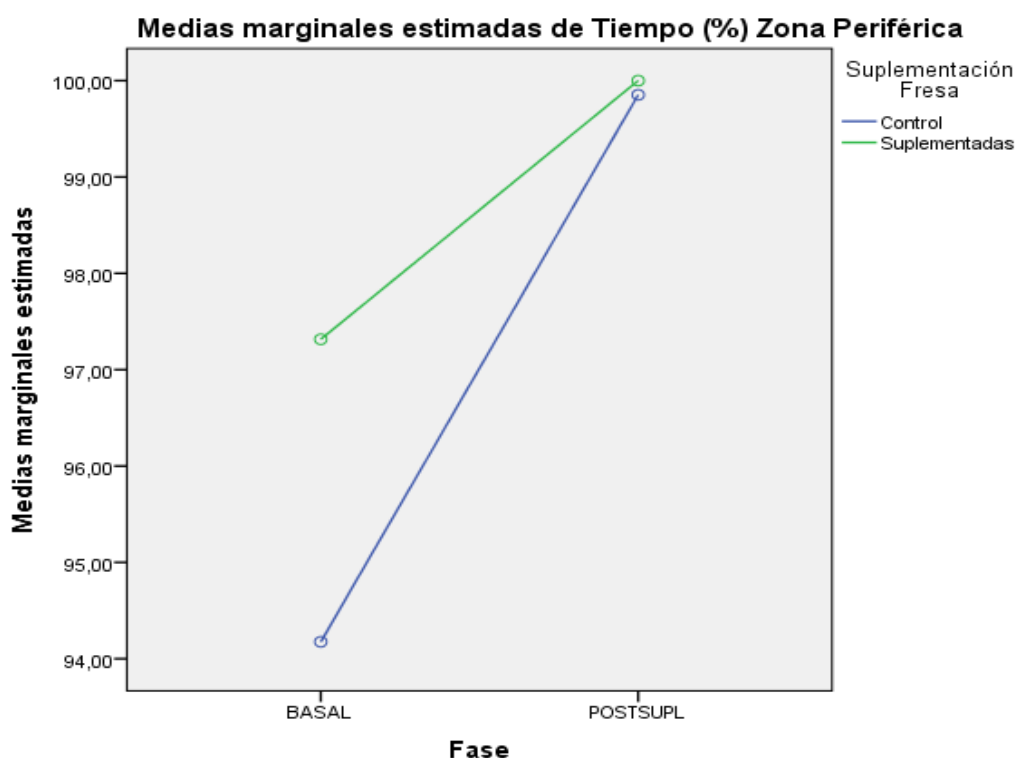


Ilustración 105. Ansiedad y miedo. % de Tiempo de permanencia en la zona periférica en OF. Comparación entre fases basal y posterior a suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B



4.3.2.4.2.1.1 Signo de tigmotaxis.

Como ya se apunta en el estudio de caracterización de la cepa es muy difícil de distinguir signos de tigmotaxis ya que los animales permanecen en su mayor parte de tiempo y recorrido en la periferia desde muy jóvenes.

4.3.2.4.2.2 Conductas en Campo Abierto.

El parámetro, número de conductas de enderezamiento disminuyen en la segunda prueba y el acicalamiento se mantiene constante así como el número de deposiciones.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: REARING

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	376,798 ^a	3	125,599	20,352	,000
Intersección	498,192	1	498,192	80,726	,000
FRESA	,281	1	,281	,046	,833
FASE	360,742	1	360,742	58,454	,000
FRESA * FASE	1,685	1	1,685	,273	,606
Error	141,943	23	6,171		
Total	1061,000	27			
Total corregida	518,741	26			

a. R cuadrado = ,726 (R cuadrado corregida = ,691)

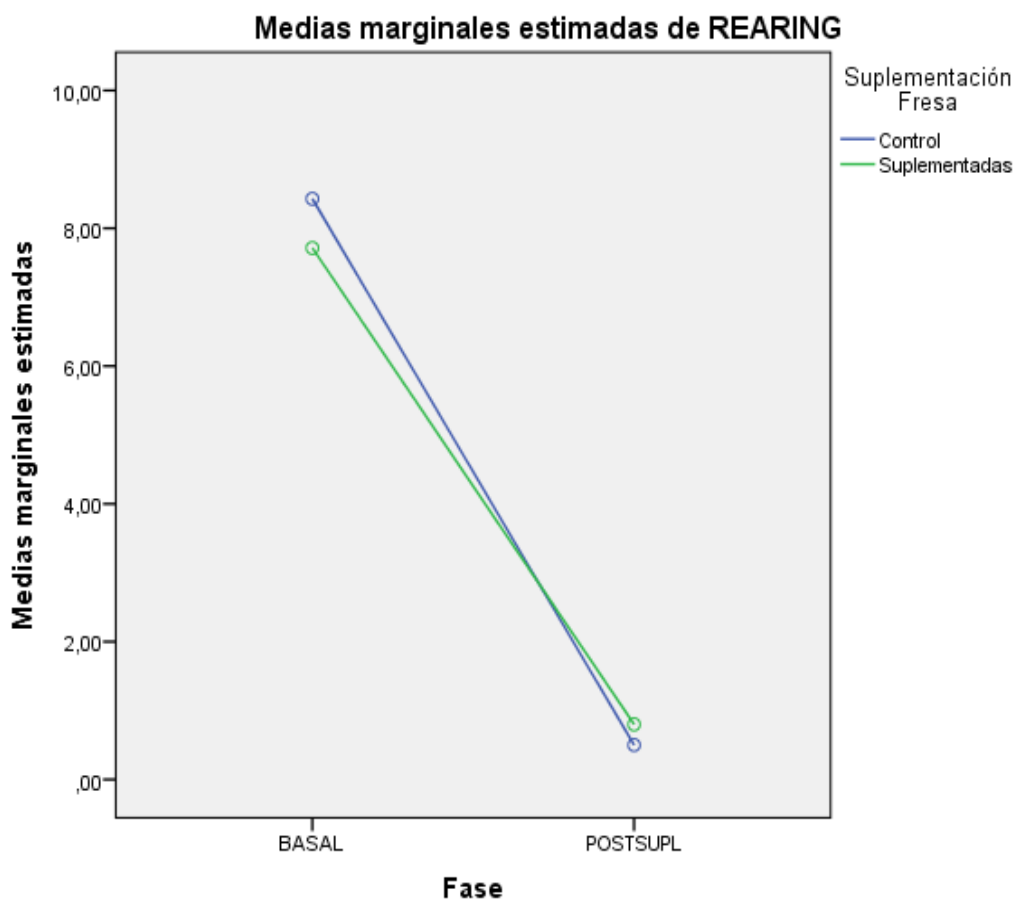


Ilustración 106. Actitud y motivación exploratoria. Conductas en OF. Episodios de rearing. Comparación entre fases basal y posterior a suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B



Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: GROOMING

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2,068 ^a	3	,689	,361	,782
Intersección	24,046	1	24,046	12,589	,002
FRESA	1,379	1	1,379	,722	,404
FASE	,023	1	,023	,012	,914
FRESA * FASE	,654	1	,654	,343	,564
Error	43,932	23	1,910		
Total	73,000	27			
Total corregida	46,000	26			

a. R cuadrado = ,045 (R cuadrado corregida = -,080)

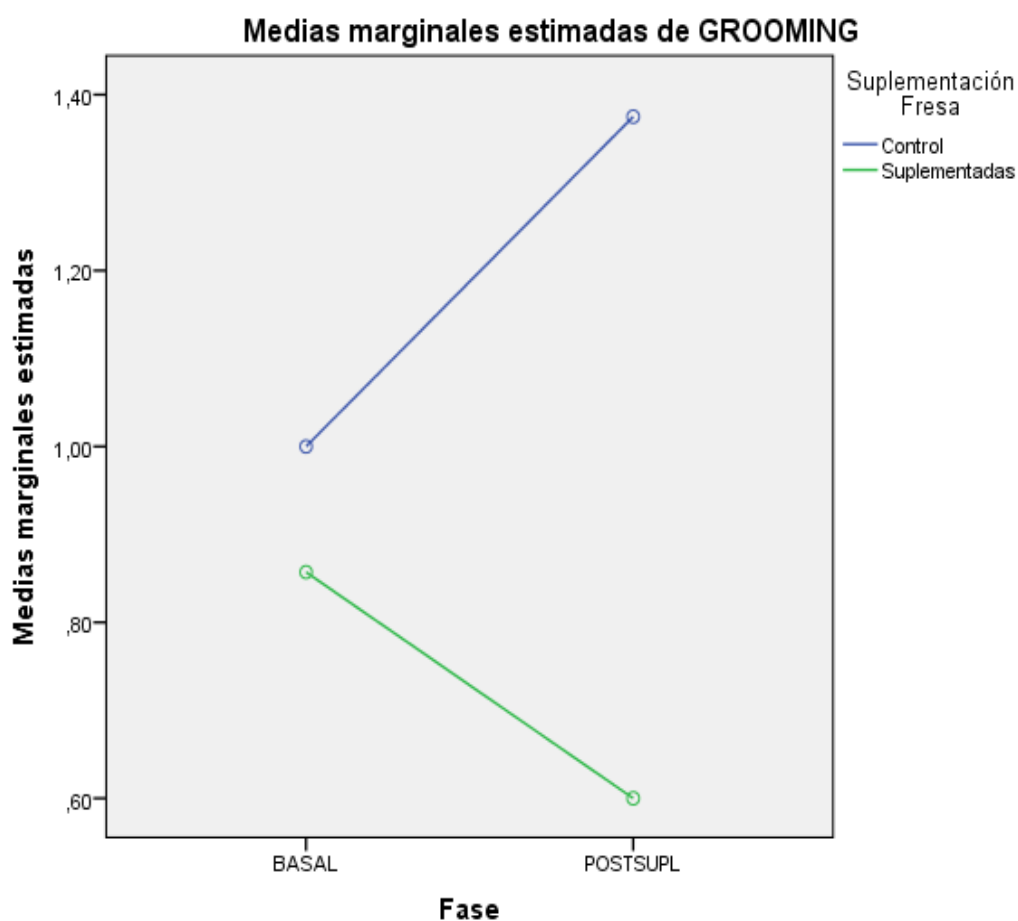


Ilustración 107. Ansiedad y miedo. Conductas en OF. Episodios de grooming. Comparación entre fases basal y posterior a suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B

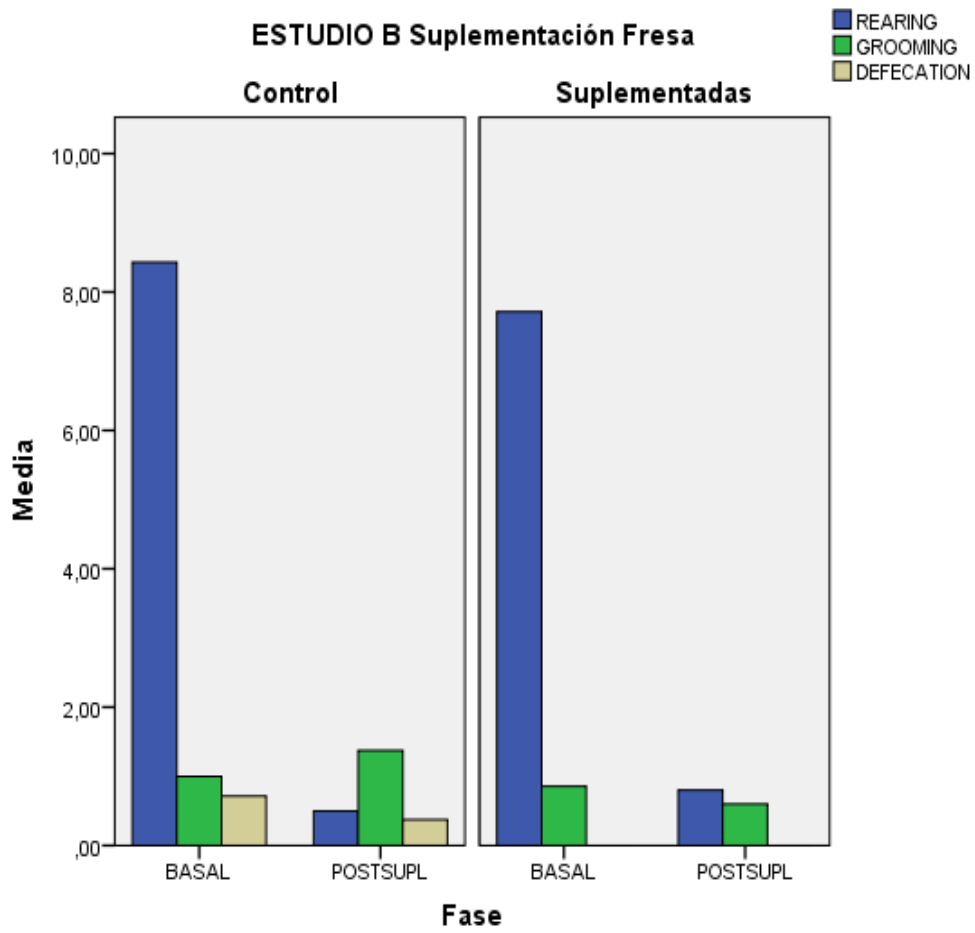


Ilustración 108. Conductas voluntarias en open Field. Estudio B

4.3.2.4.2.3 Distancia total recorrida en Campo Abierto.

La distancia total recorrida voluntariamente en este grupo, 15 meses después disminuye de 775,91 cm a 129,75 de media. La diferencia entre los controles y los suplementados no es significativa $p > 0.05$

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Distancia (cm) Total

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	175400,953 ^a	3	58466,984	,747	,527
Intersección	7275788,335	1	7275788,335	92,942	,000
FRESA	9467,717	1	9467,717	,121	,729
FASE	76776,360	1	76776,360	,981	,324
FRESA * FASE	2088,513	1	2088,513	,027	,871
Error	8141445,860	104	78283,133		
Total	22084180,680	108			
Total corregida	8316846,813	107			

a. R cuadrado = ,021 (R cuadrado corregida = -,007)

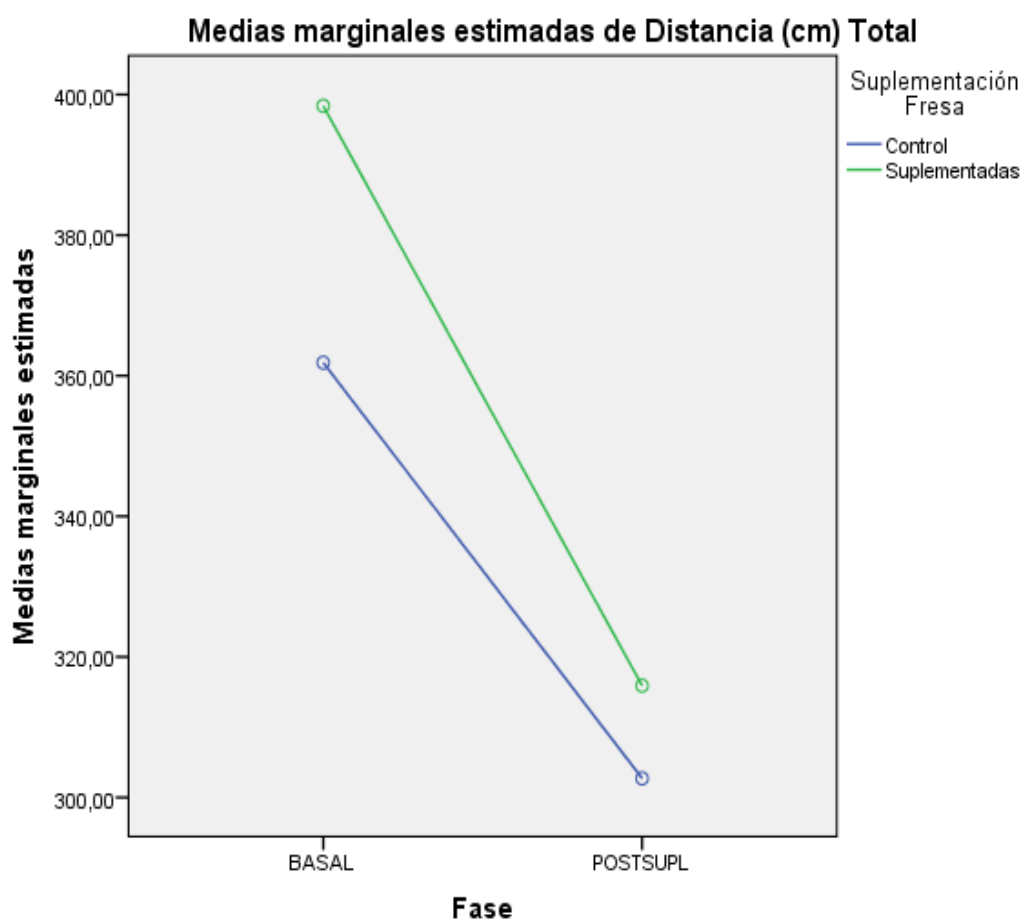


Ilustración 109. Motilidad y capacidad física. Distancia recorrida voluntariamente en OF. Comparación entre fases basal y posterior a suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B.

4.3.2.4.2.4 Velocidades medias de desplazamiento en el Campo Abierto andando.

Las velocidades medias en laberinto descienden de 4,28 m/s en la prueba basal a 0,72 m/s en la posterior $p < 0,001$. La diferencia entre suplementadas 0,7 m/s y no 0,73 m/s no es significativa $p > 0,05$

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Velocidad media (cm/sg) Periférico

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	177,520 ^a	3	59,173	46,319	,000
Intersección	277,019	1	277,019	216,841	,000
FRESA	,220	1	,220	,172	,682
FASE	173,964	1	173,964	136,173	,000
FRESA * FASE	,008	1	,008	,006	,938
Error	29,383	23	1,278		
Total	511,588	27			
Total corregida	206,903	26			

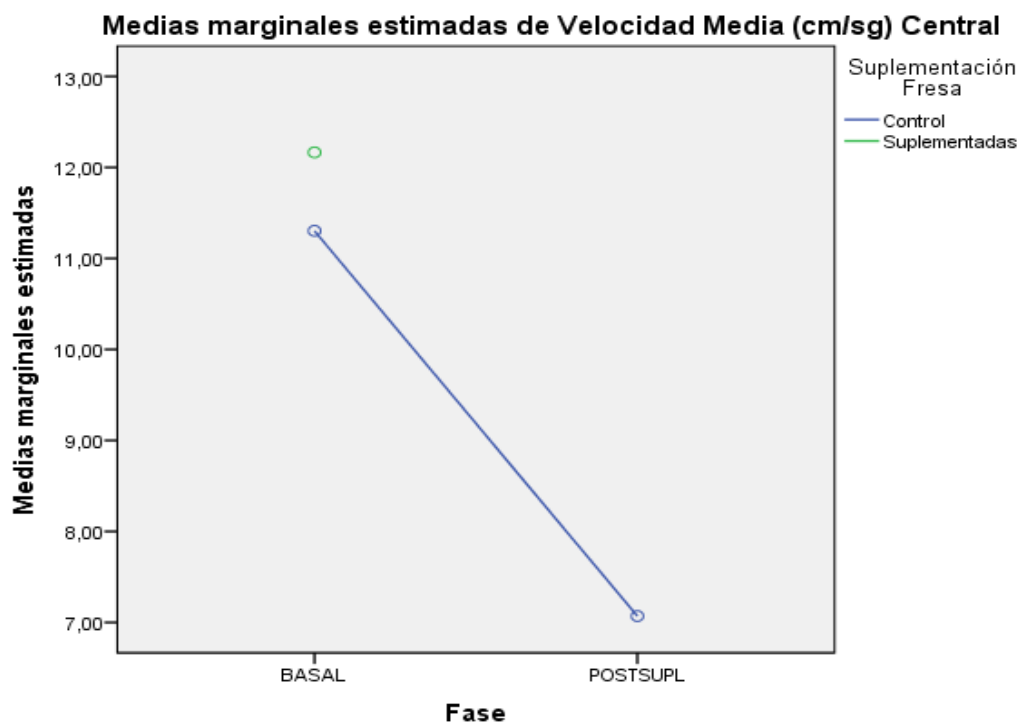
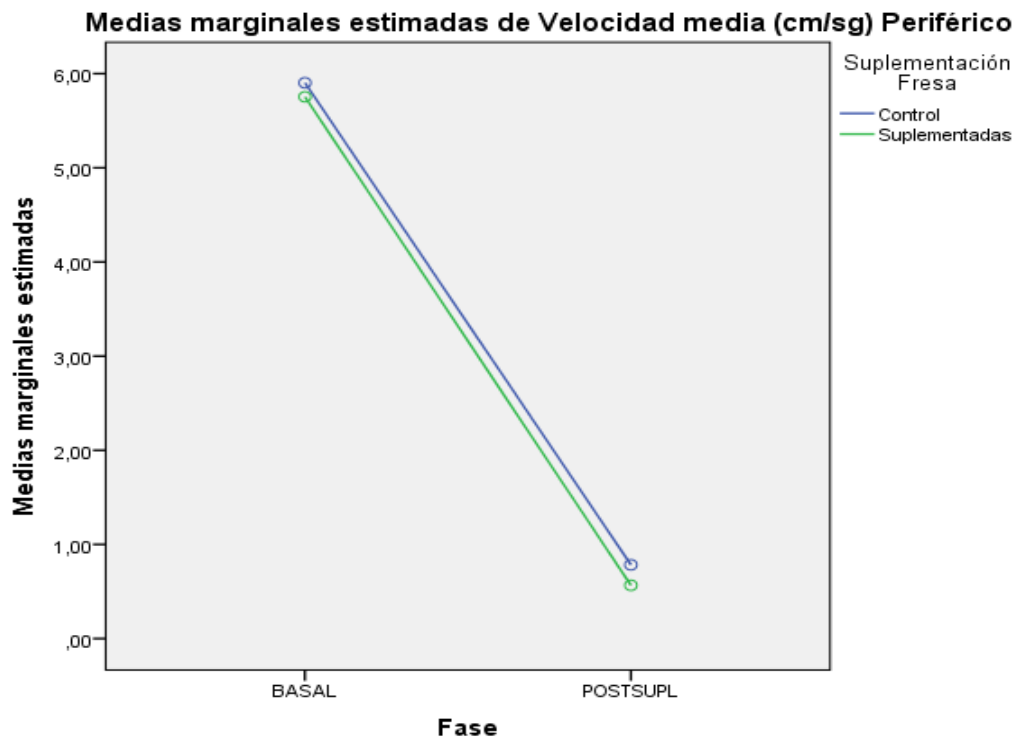
a. R cuadrado = ,858 (R cuadrado corregida = ,839)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Velocidad Media (cm/sg) Central

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	20,839 ^a	2	10,419	,622	,559
Intersección	481,704	1	481,704	28,737	,000
FRESA	1,892	1	1,892	,113	,745
FASE	15,677	1	15,677	,935	,359
FRESA * FASE	,000	0	.	.	.
Error	150,864	9	16,763		
Total	1687,080	12			
Total corregida	171,703	11			

a. R cuadrado = ,121 (R cuadrado corregida = -,074)



Las medias no estimables no se representan

Ilustración 110. Motilidad y capacidad física. Velocidades medias en las zonas periférica y central de desplazamiento

4.3.2.4.2.5 *Actividad Global en Campo Abierto.*

Se produce un descenso de actividad global en la segunda fase (POSTSUPL) 12 meses después $p < 0,05$. La suplementación con fresa parece mantener la actividad física constante en los animales comparado con los animales control que sí que descienden este parámetro $p < 0,05$.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Actividad Global (cm2/sg) OF

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	44954284,779a	3	14984761,593	4,688	,011
Intersección	145211040,979	1	145211040,979	45,428	,000
FASE	23832845,813	1	23832845,813	7,456	,012
FRESA	66701,109	1	66701,109	,021	,886
FASE * FRESA	15345913,081	1	15345913,081	4,801	,039
Error	73518954,553	23	3196476,285		
Total	261174698,266	27			
Total corregida	118473239,332	26			

a. R cuadrado = ,379 (R cuadrado corregida = ,299)

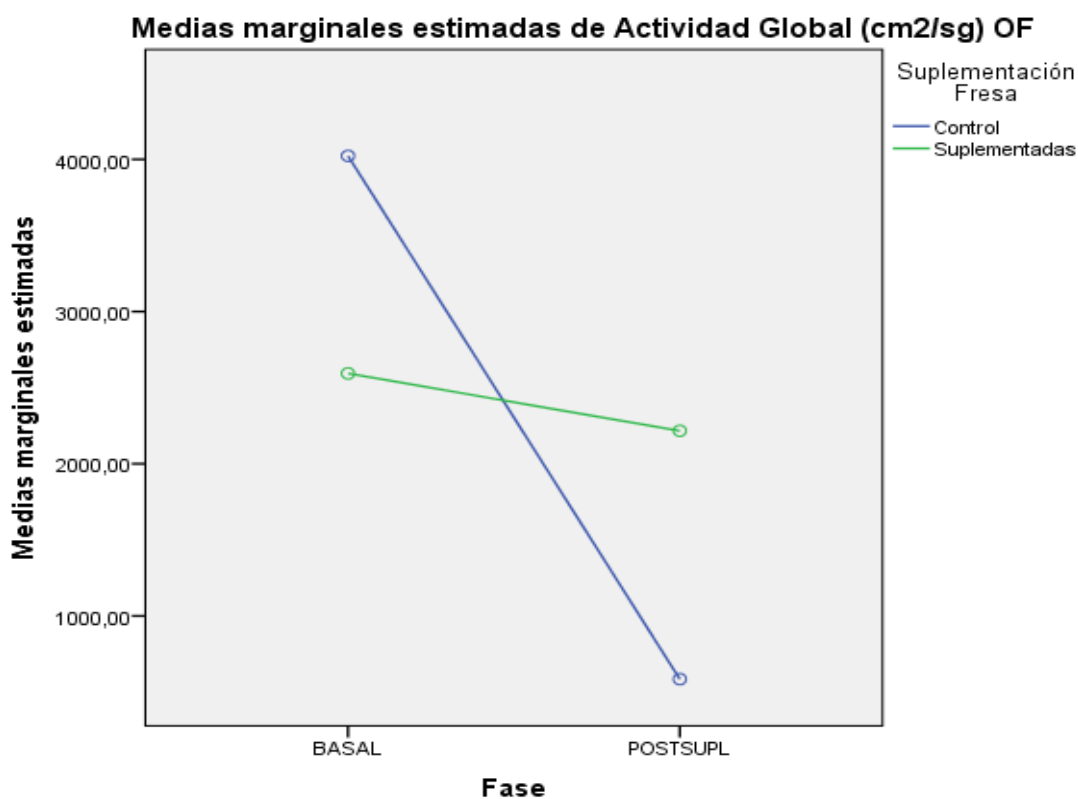


Ilustración 111. Motilidad y capacidad física. Actividad global realizada voluntariamente en OF. Comparación entre fases basal y posterior a suplementación y animales controles y suplementados con fresa. Estudio B.



4.3.2.4.2.6 *Signos neuromotores anómalos en el Campo Abierto.*

En este grupo de animales no hemos encontrado signos neuromotores anómalos como temblores durante la realización de esta prueba. Estos signos son consecuencia de un deterioro neuromotor bastante severo que aparece en animales mucho mayores que la franja de edad donde se encuentra este grupo B.

4.3.2.4.3 *Motilidad y capacidad física. Ansiedad; Parámetros medidos en Laberinto Acuático de Morris. Estudio B.*

4.3.2.4.3.1 *Permanencia en zona periférica en Laberinto Acuático. Signo de tigmotaxis en Laberinto Acuático*

El porcentaje de tiempo mantenido en la zona periférica no disminuye significativamente de la fase basal a la posterior a suplementación. Tampoco lo hacen los animales suplementados respecto a los controles. $p > 0,05$

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Tiempo (%) Zona Periférica

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	54,444 ^a	3	18,148	,045	,987
Intersección	1093987,296	1	1093987,296	2740,737	,000
Trial_Fase	48,531	1	48,531	,122	,727
FRESA	,628	1	,628	,002	,968
Trial_Fase * FRESA	,768	1	,768	,002	,965
Error	219936,112	551	399,158		
Total	1360444,853	555			
Total corregida	219990,556	554			

a. R cuadrado = ,000 (R cuadrado corregida = -,005)

Medias marginales estimadas de Tiempo (%) Zona Periférica

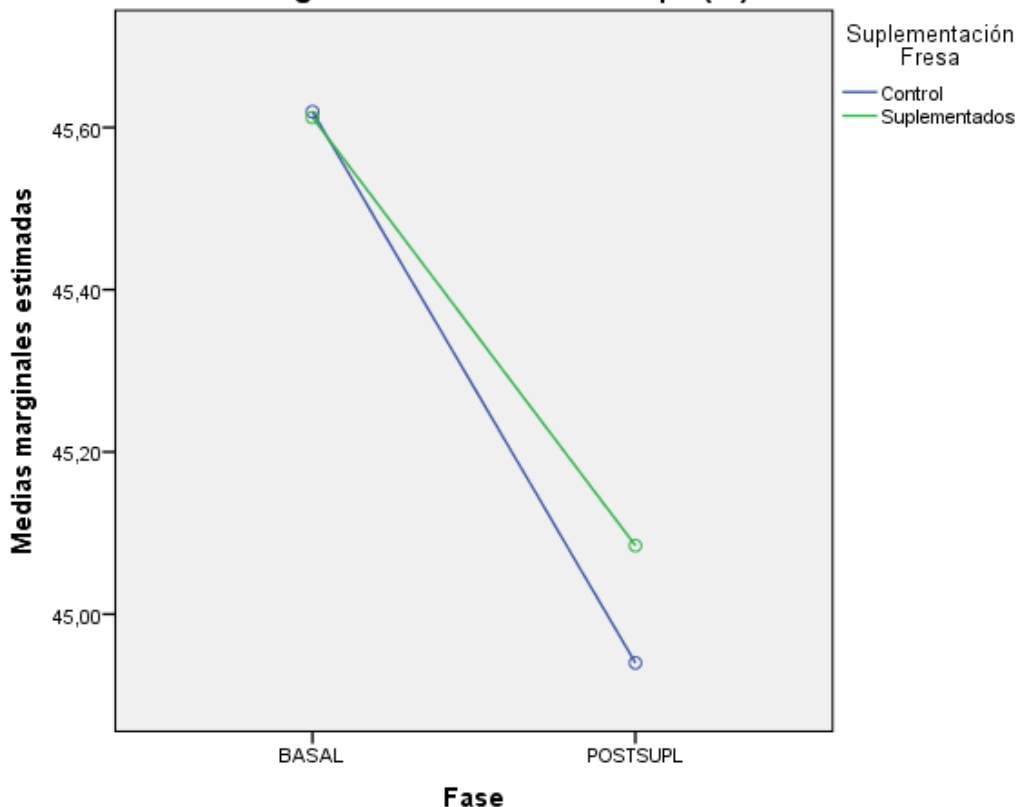


Ilustración 112. Ansiedad y miedo. % Tiempo de permanencia en la zona periférica en MWM. Estudio B



4.3.2.4.3.1.1 Signo de tigmotaxis en laberinto acuático.

No aparecen diferencias en cuanto a signos de tigmotaxis en el desarrollo de las pruebas posteriores a la suplementación con fresas

4.3.2.4.3.2 Velocidad media de natación en Laberinto Acuático.

Encontramos que hay un aumento significativo de la velocidad en la segunda fase del experimento (POSTSUPL) $p < 0,001$. No se observan diferencias entre los controles y suplementados.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Velocidad media (cm/s)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	6143,339a	5	1228,668	75,142	,000
Intersección	174805,442	1	174805,442	10690,578	,000
Trial_Fase	5963,659	2	2981,830	182,360	,000
FRESA	231,268	1	231,268	14,144	,000
Trial_Fase * FRESA	63,549	2	31,774	1,943	,144
Error	10890,003	666	16,351		
Total	235316,455	672			
Total corregida	17033,341	671			

Medias marginales estimadas de Velocidad Media (cm/sg)

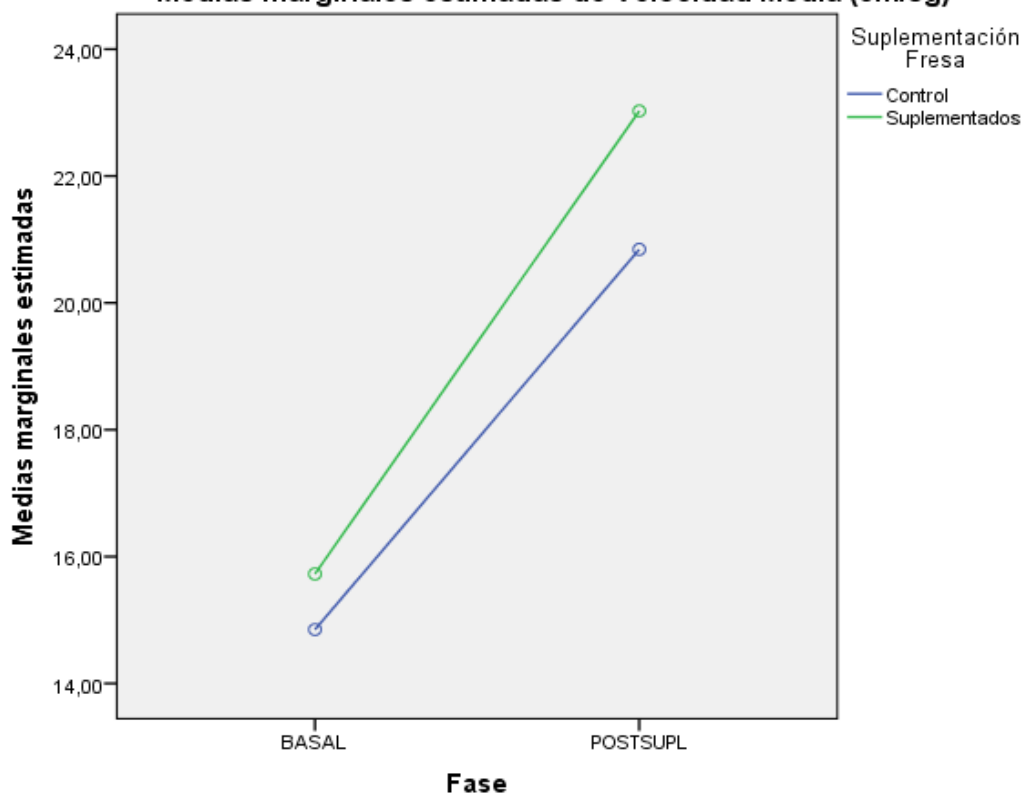


Ilustración 113. Motilidad y capacidad física. Efecto de suplementación de fresas en la velocidad media en desplazamiento en campo abierto. Estudio B.

4.3.2.4.3.3 Actividad total en Laberinto Acuático. Estudio B

Observamos un aumento de la actividad global en la segunda fase respecto a la fase basal. No hay diferencias significativas entre controles y suplementados.

Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: Actividad Global

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	10083304551,076 ^a	3	3361101517,025	9,420	,000
Intersección	41252736625,837	1	41252736625,837	115,613	,000
Trial_Fase	9684787265,969	1	9684787265,969	27,142	,000
FRESA	6318879,023	1	6318879,023	,018	,894
Trial_Fase * FRESA	8131933,693	1	8131933,693	,023	,880
Error	196605627339,427	551	356816020,580		
Total	246288619431,709	555			
Total corregida	206688931890,503	554			

a. R cuadrado = ,049 (R cuadrado corregida = ,044)

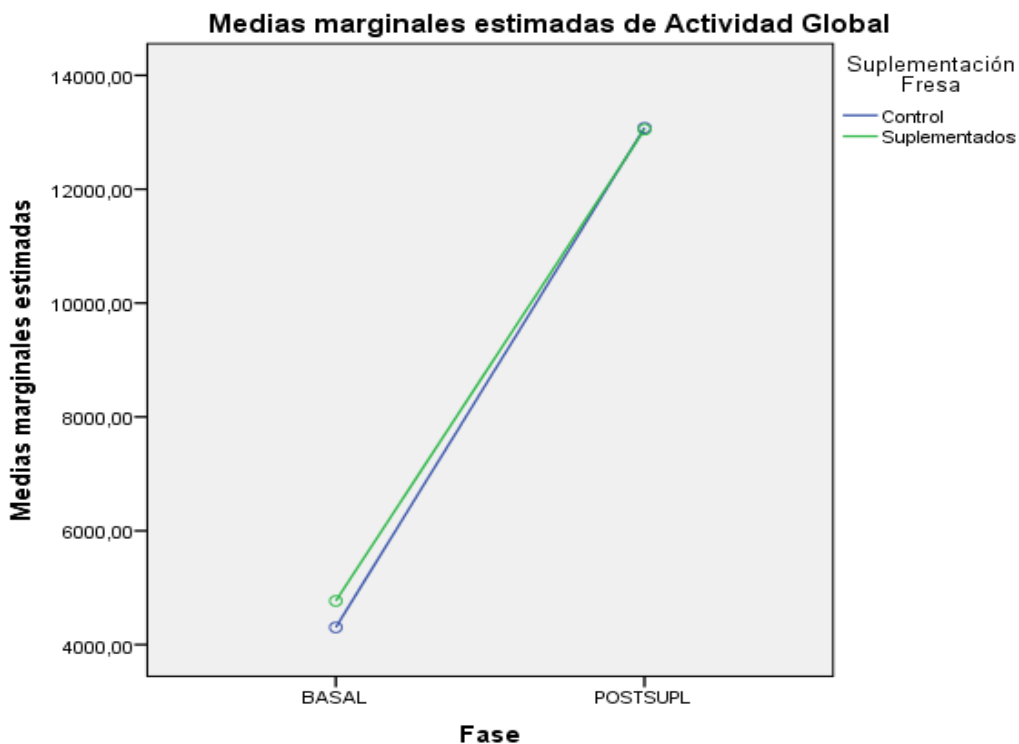


Ilustración 114. Motilidad y capacidad física. Efecto de suplementación de fresas en la actividad global en laberinto acuático. Estudio B.



4.3.2.4.3.4 *Signos neuromotores anómalos en Laberinto Acuático.*

En este grupo de estudio B no encontramos signos neuromotores anómalos en la natación como los encontrados en el grupo A como descoordinación nadar dando pequeños círculos o girar sobre su eje. La causa es que los animales son mas jóvenes al terminar el experimento que la mayoría de los que empezaban en el estudio A.

Discusión

5 Discusión.

5.1 Discusión material y método.

Este estudio se integra dentro de otro estudio que utiliza el modelo animal para ensayar la suplementación dietética de fresas y su efecto sobre la morfología y el metabolismo hepático.

Se utilizan los animales programados a tal fin, para comprobar si esta suplementación, diseñada de esta manera puede tener efectos sobre el deterioro cognitivo y físico de los animales. Por lo tanto siguiendo el principio ético de reducción que rige la filosofía de la experimentación animal se intenta extraer la máxima información posible de los animales utilizados, se adaptan estos ensayos al cuerpo principal de la experimentación, sin variar o afectar el objetivo principal de ésta, que es el estudio hepático.

5.1.1 Animales.

La rata Wistar Kyoto puede ser un modelo animal de envejecimiento adecuado atendiendo a los estudios neuromotores y físicos aquí realizados por sus características cognitivas y de envejecimiento. Como hemos visto, en los resultados de todos los parámetros estudiados se comportan de acuerdo a un declive neurológico, físico y en enfermedades relacionadas con el envejecimiento (321) acorde con los resultados esperados (159,295). La esperanza de vida en esta cepa y sus resultados en cuanto a la cronología del deterioro cognitivo publicados nos permiten ver este efecto de modo acelerado, ya que presentan manifestaciones de déficit cognitivo antes que otras cepas (322).

Este grupo de animales confirma los hallazgos recogidos y explicados en la literatura sobre las alteraciones en el aprendizaje y memoria respecto a otras cepas, como es el mayor progreso del declive cognitivo (323) conforme avanzan en edad (324).

En cuando a la ansiedad hemos comprobado el estado ansioso de estos animales, que las hace constituirse en modelo de estudio de ansiedad. La actitud de estos animales en las pruebas de comportamiento que hemos observado son: descenso en la actividad o incluso inactividad ante retos o situaciones nuevas en lo que coincidimos con algunos autores, tanto en el ámbito social (325) como no social (326), también observamos la baja actividad desarrollada en el campo abierto (323,324).

Estas características, compatibles con las descritas en la literatura, pueden contribuir al fracaso que hemos detectado en la ejecución de determinadas tareas. Es el caso del intento que se realizó en un principio para testear la memoria mediante el test de reconocimiento de objetos. Ante la presentación de objetos inanimados actuaron de forma apática, cuando no con episodios de inmovilidad absoluta que dieron al traste con la obtención de cualquier dato. También hemos visto que la prueba de reconocimiento social, mucho mas estimulante y motivadora, ya que los animales manifestaban mucho interés y una estimulación extraordinaria en el desempeño de la tarea, desarrollando conductas de reconocimiento durante periodos de tiempo considerables, se veía aquejada de altibajos dentro de los grupos de animales, debido posiblemente a esta característica ansiosa que socava el ánimo del animal para repetir la prueba sucesivas veces. En muchas ratas sobre todo en las mas viejas la evolución de la prueba sufrió un descenso en su ejecución justo al final de la misma donde cabía contrastar los resultados de las presentaciones anteriores (Ilustración 16). Los animales

aun estando interesados en explorar al nuevo congénere disminuían el interés bien por agotamiento psicológico o bien por agotamiento físico, dando una variabilidad inesperada e inexplicable que nos hace desechar mucha información obtenida de ella.

En cuanto a la variabilidad de resultados, muchos son los autores que han publicado la variabilidad genética encontrada en la cepa WKY así como la variabilidad encontrada en la expresión del fenotipo conductual (312), y la posible controversia del modelo para ensayos que analizan comportamiento y en los que se requiere estandarización. Esta variabilidad ya se ha confirmado desde el punto de vista genético o de histocompatibilidad (306) y puede razonablemente, extenderse a otros aspectos como el de conducta descrito anteriormente.

En nuestros resultados se confirma que si bien, el desarrollo de la conducta de los animales es bastante regular en edades jóvenes, conforme se va avanzando hacia edades cada vez mayores, la dispersión de los datos obtenidos es mayor. Esta dispersión de datos junto con la pérdida de animales propia del envejecimiento se ha traducido en una pérdida importante de significación estadística a la hora de permitirnos confirmar o descartar con seguridad el efecto de la suplementación con fresas en este experimento.

5.1.2 Tratamiento dietético.

El protocolo de suplementación dietética se diseñó, como ya se ha descrito en el apartado objetivos (pag. 40), atendiendo a facilitar su utilización por la población y así extender sus beneficios. Por eso está sujeto a todas las variaciones descritas. Se ofrece en ayunas con el fin de aprovechar la máxima acción de los ácidos del estómago sobre todos los elementos de la fruta para conseguir la liberación completa de todos ellos, la máxima absorción de sus componentes y la mínima interferencia con otros elementos de la dieta habitual, también consigue de forma paralela una predisposición a tomar una mayor cantidad de fresa de forma voluntaria por la ausencia de alimento durante las horas previas.

La mejora esperada por la suplementación se puede considerar debida, por un lado a la acción directa de los micronutrientes de la fresa sobre el tejido nervioso y conjuntamente, a la detoxificación mas eficiente de un hígado mejorado en sus funciones por efecto de la ingesta de polifenoles de la fresa (327–331), sumado a una sinergia entre todos estos elementos (pag. 28). El tratamiento dietético para la rata, además está planteado de manera que el ayuno no provoque modificaciones en el metabolismo que alteren los beneficios previstos por la suplementación por las características intrínsecas al modelo animal: alta tasa metabólica, y sistema digestivo específico como ya se apunta en el apartado de material y método. Esta estrategia ha sido efectiva ya que los animales no han manifestado adelgazamiento ni ninguna enfermedad relacionada con desnutrición.

Muchos autores utilizan liofilizados y desecados que se suelen añadir a la mezcla de alimentos que forman el pellet consiguiendo una concentración de su producto del 2% de media. Con esta práctica consiguen mayor control en la concentración que se quiere suministrar y cerciorar las cantidades ingeridas (214) (305) (188). Otros utilizan extracto seco congelado (332) de los frutos que van a ensayar con lo que consiguen de otra manera, mejor aprovisionamiento y durante mas tiempo y permite ser administrado también con mayor control.

En nuestro caso estamos sujetos a la temporalidad de la producción, la corta duración de la conservación en fresco, y la variabilidad en el consumo voluntario diario y la biodisponibilidad individual en los animales, resultado de sus mecanismos de

absorción intestinal y factores metabólicos puntuales. (249). Todas estas características imprimen perturbaciones inherentes al diseño experimental, comprenden un factor de variabilidad y de fluctuación sobre la verdadera penetración de los nutrientes beneficiosos de la fresa, en el organismo de la rata, en cuanto a cantidad, absorción y continuidad a lo largo del experimento.

Sin embargo, se ha medido la ingesta media en el estudio y comprobado que las ratas tomaban una cantidad media suficiente de fresas en todos los casos individuales aunque se manifiesta variabilidad en el consumo a lo largo del tiempo.

Ahora bien, existiendo evidencias de una tendencia a la mejora, en algunos casos no parece estar significativamente conectada con la suplementación. Las causas de este hecho puede estar en un periodo insuficiente de suplementación, una dosis de ingesta insuficiente o en una situación de no retorno a partir de cierta edad en cuanto a mejora neurológica mediante esta vía dietética. Por tanto estudios posteriores podrían abarcar suplementaciones más largas o comenzadas desde una más temprana edad, buscando el valor preventivo, más que de tratamiento de una situación ya establecida. La variabilidad en el consumo la asociamos a la variabilidad de resultados y la falta de significación.

5.1.3 Programa.

Se advierte manifiestamente que la realización de una misma prueba con una diferencia de 2 meses de tiempo predispone a los animales a realizar el segundo ensayo con mayor eficiencia que el primero, es decir; queda una impronta o un recuerdo en los animales que afecta a la competencia en la ejecución de la tarea y por tanto a su mayor eficiencia (318). El periodo de estancia, manipulación y habituación puede ser otra explicación añadida de la propensión a realizar las tareas de manera más eficiente. Observamos en nuestro estudio que el efecto del aprendizaje y la práctica, junto con la habituación al personal y el ambiente es poderoso, manteniéndose incluso después del tiempo transcurrido entre ambos ensayos.

En el caso de la realización de la segunda prueba 12 meses después, como resultó en el estudio B, no encontramos este efecto, en contra de los resultados obtenidos por T. van Groen con ratas SD, en las cuales se mantenía esta mejora al menos 12 meses (333).

Algunos trabajos sobre la capacidad de realizar la tarea en el laberinto acuático atribuyen la retención en la memoria de ratas en base al periodo de entrenamiento a que se les haya sometido (143,334,333).

En nuestro caso el periodo de entrenamiento de la tarea es el habitual de 7 días, no pretendiendo producir un refuerzo que hiciera perdurar la estructura procedimental de las tareas en el tiempo, sino solo evaluar el estado cognitivo y general del animal para ver si se produce variación con la edad y con la dieta suplementada con fresas. Con este mismo protocolo experimental realizado con una diferencia de tiempo mayor a los tres meses, hemos observado que esta habituación o recuerdo procedimental de la realización de las tareas tiene un periodo máximo de retención tras el cual desaparece y que en el caso de las Wistar Kyoto está por debajo de los 12 meses. Nos proponemos, en próximos trabajos, cuantificar y determinar este periodo y las bases que rigen estos procesos de memoria ya que en seres humanos es uno de los tipos de memoria que mas perduran en el declive cognitivo asociado al envejecimiento.

5.1.4 Pruebas de conducta.

La batería de pruebas propuesta ha resultado ser una herramienta sensible a los cambios producidos por el declive neurológico y físico producido por el envejecimiento. Vemos que cada parámetro registrado evoluciona de manera coherente en los distintos rangos de edad en esta cepa de ratas.

Se observa una dispersión de las conductas de los animales a partir de las edades de 20 meses posiblemente debido a que: o bien el grado de penetración de las deficiencias neurológicas del envejecimiento es muy heterogéneo en las ratas (268) o que la detección de las mismas por las pruebas descritas lo es. La caracterización del envejecimiento de la cepa, sobre todo si comparamos con los animales muy jóvenes ofrece variaciones estadísticamente significativas a pesar de este aumento de dispersión de los datos, pero al contrastar las diferencias entre tratamientos de suplementación contra los animales controles, esta heterogeneidad dificulta el análisis de los resultados.

En el laberinto acuático de Morris observamos que el rendimiento de la tarea de aprendizaje va disminuyendo con la edad como se ha demostrado en la bibliografía (267–272). El componente levemente aversivo que les supone el escape del agua, les hace realizar la prueba con una motivación que no tendrían en otras circunstancias. Sin embargo el rendimiento final de los animales puede haberse visto afectado por las características ansiosas de cepa (308).

Consecuentemente con los resultados Fischer y col. (73) deducimos que el menor rendimiento en las tareas en el laberinto acuático MWM observado, que revela una importante disminución de la memoria espacial, se debe a una reducción del número de células diana de acetilcolina y también en el tamaño de esas células en núcleos colinérgicos del prosencéfalo. Esos cambios aumentan su correlatividad con la edad. Los cambios morfológicos según este autor, empiezan a desarrollarse más tarde que las alteraciones en el comportamiento por tanto podemos calcular una cronología a modo de previsión para buscar este tipo de cambios morfológicos en futuros estudios.

En el caso de la memoria social no hemos podido utilizar los datos registrados desde el punto de vista cuantitativo. Debido al diseño de la prueba, la estrategia consiste en discriminar el resultado positivo “si recuerda al individuo a los 45 minutos” y el resultado negativo “no recuerda al individuo a los 45 minutos” por la disminución del tiempo que ocupa en examinarlo manifestando conductas reconocimiento social y así destinar a los individuos a una segunda prueba 24 horas después, en la que presentamos a los nuevos sujetos de ensayo con distintos tiempos de retención. Lo hacemos 30 minutos después de la primera presentación, si determinamos que no los recuerdan y a 60 minutos si determinamos que si los recuerdan en el primer día de ensayo. Con esta estrategia se pretende establecer un valor de máxima retención en la memoria social a medio plazo entre los tiempos 30, 45 y 60 minutos con el que comparar los distintos grupos.

Sin embargo los tiempos de conducta social para los individuos contraste, (realizados 60 minutos después de la última presentación en todos los casos) no mostraban en muchos de los casos, sobretudo en los individuos de más edad, una analogía significativa con los de la primera presentación. Esta circunstancia no nos permite afirmar en todos estos casos que la causa de esta disminución del tiempo sea el reconocimiento y por tanto el mantenimiento de la memoria, o sea un estado de desmotivación o desaliento ya que para animales de cierta edad les supone un desgaste físico y emocional que puede mermar la actitud de exploración de un individuo desconocido.

No obstante hacemos un análisis de los resultados de esta prueba para obtener información adicional.

La primera información que se deriva de la realización de la prueba es, precisamente que los animales mas viejos manifiestan una desmotivación clara en la presentación de control, manifestándose en una reducción significativa de los tiempos de conducta social exploratoria, en mi opinión se debe a un desgaste físico y psicológico de estos animales al haber realizado la prueba las dos veces anteriores en el mismo día en un periodo de tiempo de 125 minutos (Ilustración 16). Muchos de estos animales al día siguiente vuelven a aumentar los tiempos de exploración de manera análoga a como lo hicieron el día anterior, por tanto podemos decir en este estudio, que es el agotamiento el que reduce el tiempo de exploración en la presentación de contraste (Ilustración 115). No obstante no podemos discriminar cuanto efecto tiene esta desmotivación en la segunda prueba de reconocimiento y por tanto si la reducción de tiempo se debe a la memoria o a dicha desmotivación o cansancio. En una crítica a la metodología de la prueba es recomendable en estos animales mayores realizar la prueba de contraste al menos 24 h mas tarde, dando tiempo al animal a recuperar la motivación o descansar.

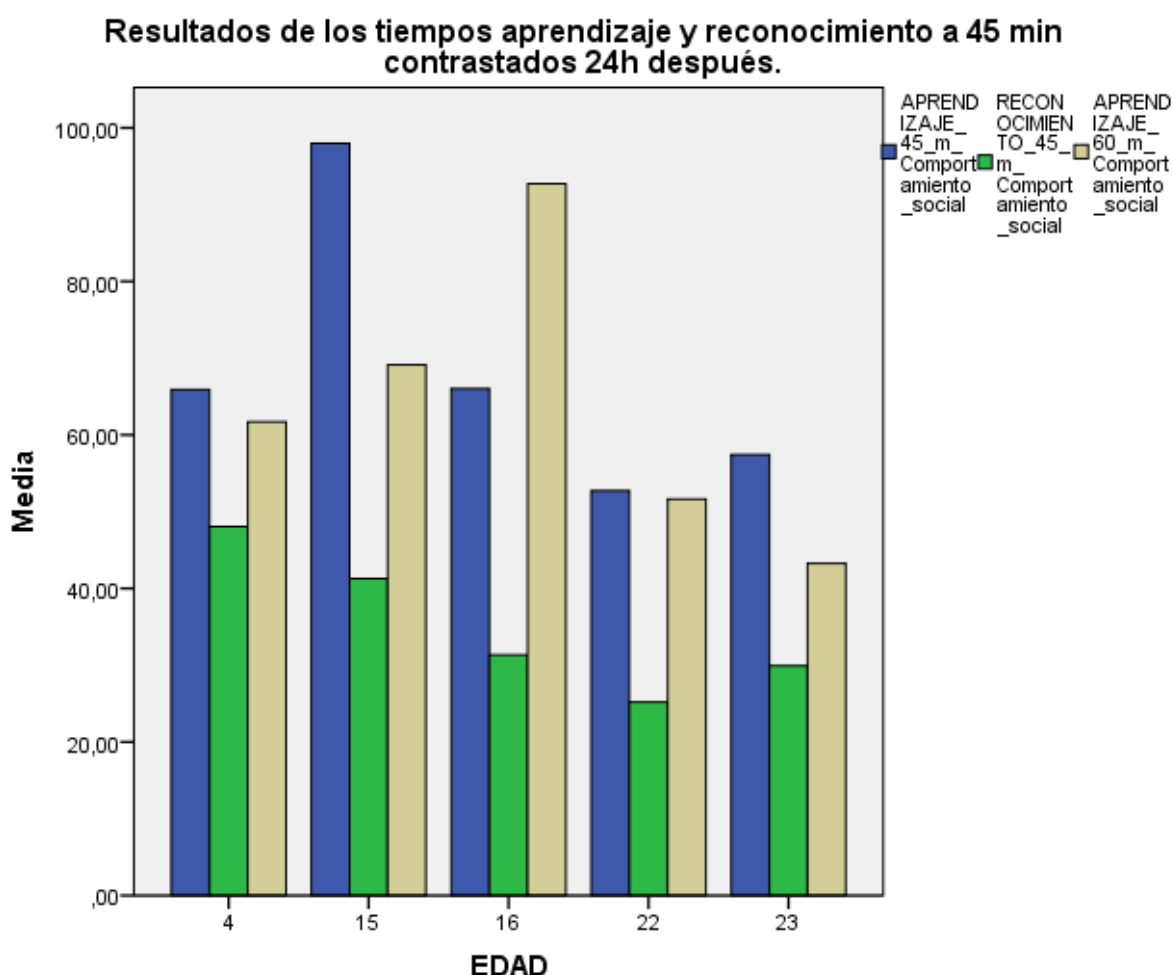


Ilustración 115. Resultados de los tiempos de conductas de reconocimiento de un animal novedoso 24 h después, contrastados con los tiempos de aprendizaje y reconocimiento iniciales. (comparar con la gráfica de la ilustración 15)

Observamos los resultados de aquellos animales que sí realizan la prueba con un patrón de tiempos de conducta social compatible con la retención en la memoria, ya que el tiempo de control en el que se presenta un individuo nuevo es similar al de la primera presentación.

En el análisis de estos datos no hemos detectado ni el deterioro previsto con la edad ni, por tanto, modificaciones con la suplementación dietética (Ilustración 17). La causa puede estar explicada en los mecanismos que se activan en el reconocimiento de sus congéneres abarcan a sistemas diversos y complejos (283) y que la impronta que deja en la memoria se ve preservada mas tiempo al estar anatómica y fisiológicamente implicadas distintas regiones cerebrales que compensan el déficit asociado a la edad.

No obstante esta afirmación carece de confirmación estadística en las condiciones previstas para este experimento.

Los parámetros registrados en el campo abierto se han visto condicionados por la tendencia ansiosa de este tipo de ratas que ha condicionado la mayor parte del experimento. A esta característica psicológica de los animales, que ya se observa desde la juventud (4 meses) (Ilustración 24) se le añade la evolución en el carácter ansioso, que conlleva el déficit neurológico que se produce con la edad.

Si estudiamos la interrelación de esta característica con la actitud exploratoria nos hace pensar que la afecta pero no es la causa directa de manifestar una disminución de estas conductas ya que no actúan correlativamente a lo largo del envejecimiento si observamos la evolución de la actitud exploratoria como distancia total recorrida en OF con los porcentajes de tiempo y distancia que ocupan en la periferia o signo de tigmotaxis (Ilustración 116). Como hemos visto, además, en sucesivas pruebas donde se vuelve a exponer a los animales a las mismas condiciones en el campo abierto y tras haber sido ya habituadas, los parámetros de actitud exploratoria no cambian o incluso disminuyen, cuando el condicionante de miedo ante un entorno nuevo debe ir desapareciendo (Ilustración 117) Esta actitud está descrita en el estudio de Belviranli (284) sobre rata Wistar . Los parámetros para capacidad física indican que se encuentra disminuida a lo largo de las distintas edades por lo que su interrelación con una actitud exploratoria disminuida, sí que nos hace pensar en cierta relación causa efecto.

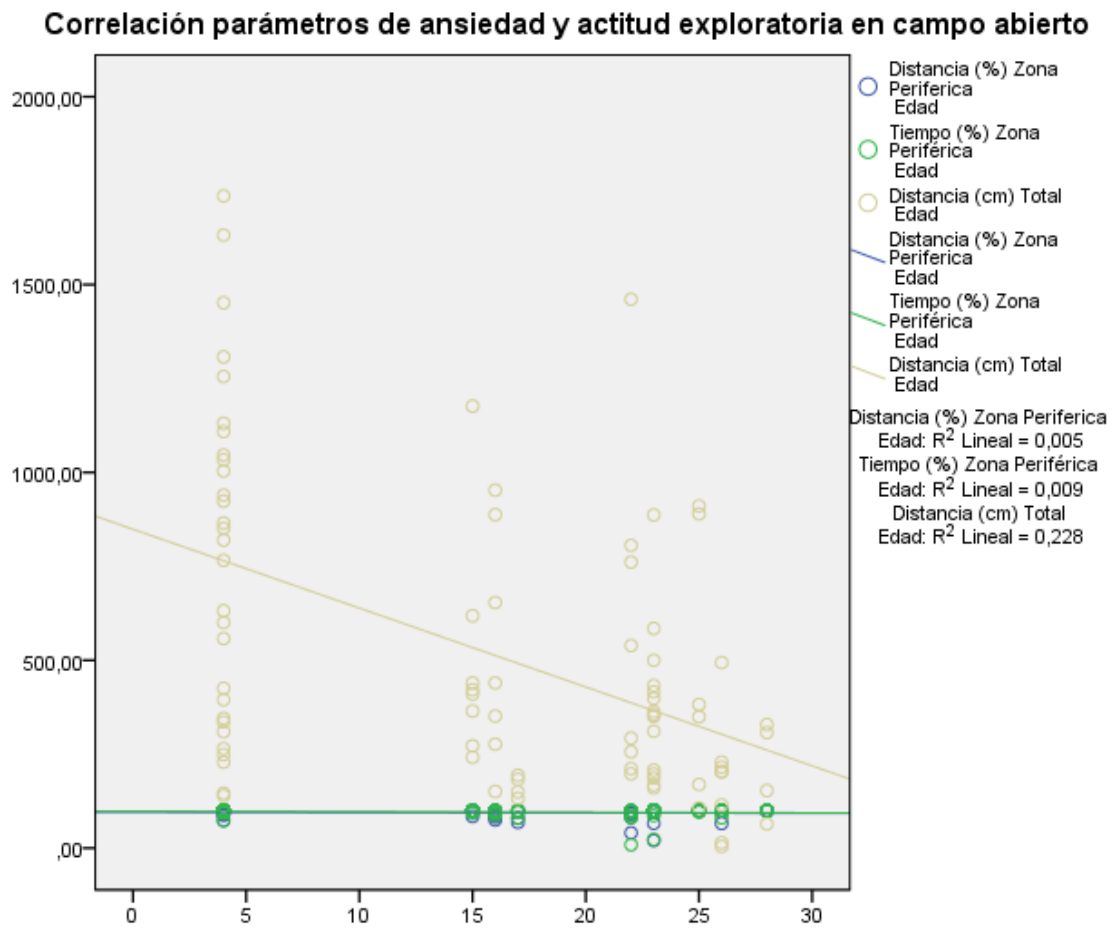


Ilustración 116. Correlación entre distancia total recorrida voluntariamente en campo abierto y % de tiempo y distancia ocupados en la periferia (tigmotaxis) como correlación entre actitud exploratoria y ansiedad.

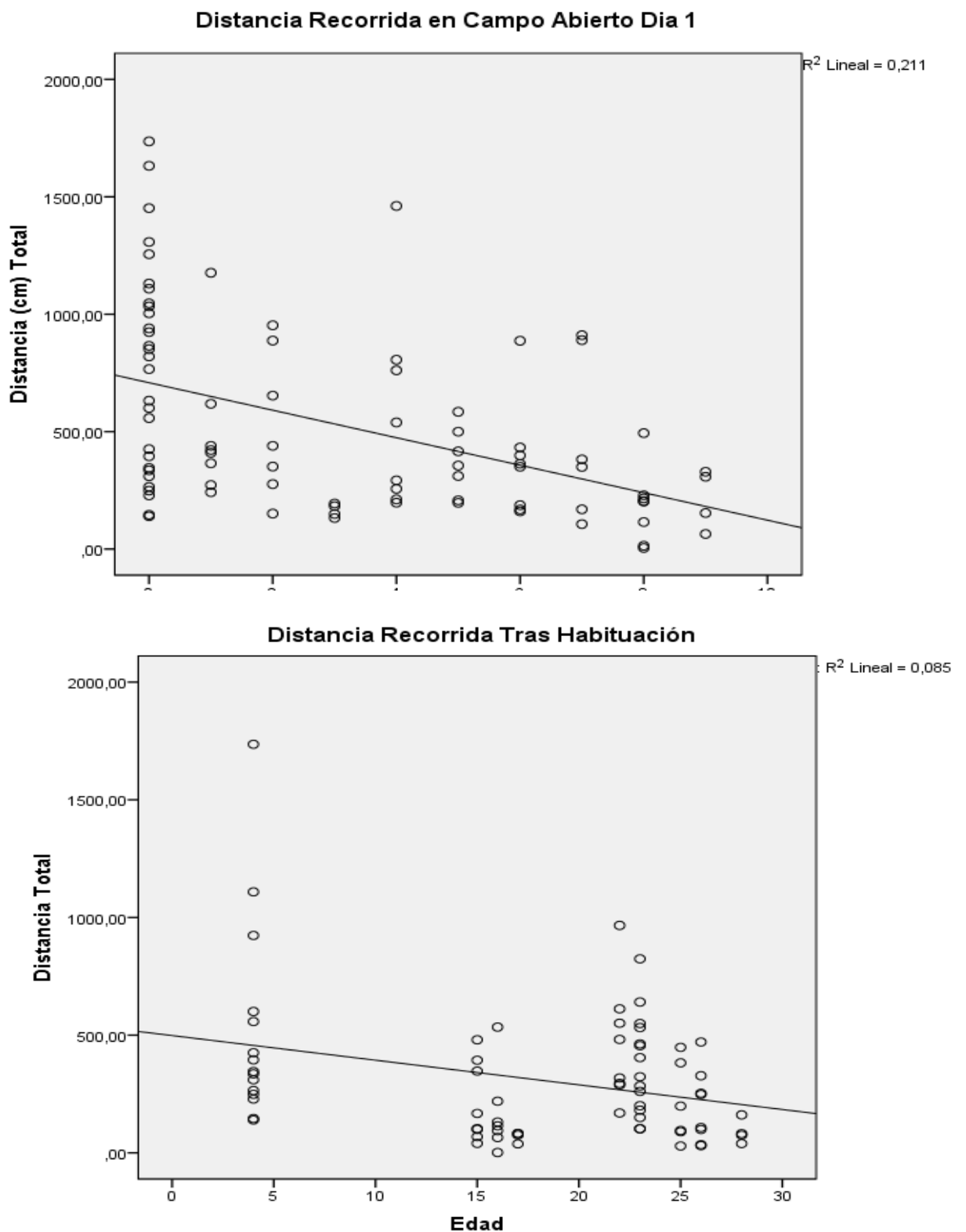


Ilustración 117. Actitud exploratoria. Distancia recorrida voluntariamente en campo abierto el día 1 y tras habituación.

5.2 Discusión Resultados.

5.2.1 Generalidades caracterización del envejecimiento de la cepa.

La evolución del declive neurológico es la esperada en todos los parámetros observados excepto en la prueba de memoria social que ha resultado revelar una condición de los animales que requiere replanteamiento de la metodología como ya se ha suscrito en el punto anterior.

Los datos de retención máxima de la memoria social, que se han podido recopilar no dan signos de tender a una involución ya que se mantienen constantes a lo largo de todas las edades estudiadas (Ilustración 17); el sistema que lo sustenta parece que se mantiene preservado a lo largo del envejecimiento a pesar de que el resto de los parámetros medidos arrojan un marcado deterioro. Esto ocurre posiblemente, debido a la complejidad de este tipo de aprendizaje en la rata, con procesamiento de estímulos de distinta índole (335,336) con un componente emocional añadido (337) y a la aparición de mecanismos de compensación de unas estructuras sobre otras como pasa en otros sistemas de memoria (161,338).

Ocurre lo mismo para los parámetros de ansiedad obtenidos en OF (Ilustración 24 e Ilustración 25). Estas valoraciones nos indican que la cepa WKY se mueve en unos niveles de por sí tan extremos que es difícil promover una mejora mediante suplementación en la dieta y por tanto no son buenos parámetros para estudiar este efecto sobre el deterioro cognitivo en esta cepa.

5.2.2 Generalidades estudio de la suplementación con fresas.

En cuanto a la suplementación con fresa, los resultados previstos en los parámetros cognitivos no han resultado ser concluyentes en este estudio. La falta de significación en la mejoría esperada por los animales suplementados tras el tratamiento se puede explicar tanto por el propio diseño, incluida la elección del modelo animal, que estaba orientado hacia otros objetivos experimentales, como a la susceptibilidad del tejido nervioso a la mejora y el alcance de una biodisponibilidad adecuada para ello, como hemos discutido en el caso de la estrategia dietética. Analizando las pruebas de memoria espacial podemos observar en los distintos parámetros estudiados cierta tendencia a la mejoría. Y analizando los parámetros relacionados con la capacidad física sí se observa una mejora asociada a la suplementación.

La suma de estas circunstancias nos plantea la necesidad de realizar nuevos estudios con un diseño modificado en cuanto a instaurar estrategias que minimicen la variabilidad en el consumo, aseguren mayores dosis o en periodos más largos de suplementación, y por último estudiar el desarrollo desde edades tempranas con una suplementación continuada, con la esperanza de detectar y confirmar el efecto beneficioso de las fresas tomadas en fresco sobre el envejecimiento.

5.2.3 Evaluación neurológica general.

Los parámetros sensitivos relacionados con la somestesis y la termalgesia no tienden a estar deteriorados (Ilustración 4, Ilustración 6). En los casos de audición y en el tacto de las vibras lo hacen significativamente, aunque, no llegando a valores de deterioro grave (Ilustración 4, Ilustración 5). Además el rendimiento motor en las pruebas de esfuerzo desciende correlativamente con la edad (Ilustración 8). Los test de reflejos posturales y equilibrio, que reflejan vías de propiocepción y centros de coordinación motora, indicaron un deterioro asociado de manera significativa a la edad en los test de equilibrio y las reacciones posturales traseras mientras que no así en el caso de las reacciones posturales delanteras (Ilustración 7). Este deterioro de predominio distal es

característico del deterioro neuromotor asociado a la edad donde las velocidades de conducción disminuyen y son de menor amplitud a partir de los 60 años en humanos y también aparecen patrones neuropáticos de predominio distal, y por otra parte la hipocalcemia por osteoporosis produce trastornos neuromusculares y atrofia (339–341).

Las pruebas donde mas significación alcanza el deterioro neuromotor son aquellas en las que la integración propioceptiva, coordinación y control neuromotor son mas exigentes como son las de equilibrio (Ilustración 7), apuntando a un efecto integrado o sinérgico de las vías y centros implicados en la producción del déficit.

En nuestros resultados pues, encontramos un deterioro discreto de los sentidos y /o de las vías aferentes, y por tanto una afectación difusa de las distintas vías y centros de integración y coordinación neuromotor durante el envejecimiento.

La suplementación con fresas no mejora las vías aferentes (Ilustración 33, Ilustración 34, Ilustración 35, Ilustración 36, Ilustración 38 Ilustración 37), ni los reflejos primarios analizados mediante esta evaluación neurológica general (Ilustración 39, Ilustración 40, Ilustración 41, Ilustración 42), ni entre las fases basal y posterior a la suplementación, ni en el estudio a través de las distintas edades. Por tanto la mejora esperada de este tratamiento va a incidir mas bien en mejoras neurológicas del sistema nervioso central. Al igual que Joseph et al. no obtuvimos diferencias en los resultados psicomotores diferenciales en los test de suspensión de alambre y equilibrio en tabla, por contra sí encontramos diferencias significativas entre el grupo con suplementación con el grupo control para el equilibrio en plano inclinado (Ilustración 40) lo que nos permite vislumbrar cierta mejora en las conexiones dependientes del estriado en base a la mejor disposición de dopamina, mejora en la recaptación de calcio en la sinapsis y activada de la GTPasa (210). Respecto al análisis de las reacciones posturales solo observamos diferencias significativas para la reacción postural trasera derecha tanto comparando el grupo con suplementación con el grupo control como asociado a la edad (Ilustración 41 e Ilustración 42) es de destacar, como hemos descrito con anterioridad, que la edad produce de manera significativa un deterioro en las reacciones posturales traseras relacionadas con los patrones neuropáticos con déficit neuromotor, en lo que coincidimos con la bibliografía (339–341), sin embargo no podemos explicar porque solo observamos correlación en nuestro estudio experimental en el caso de la extremidad derecha.

5.2.4 Caracterización fenotípica de declive natural con el envejecimiento.

En el laberinto acuático nuestros resultados confirman los obtenido por otros autores (73) en cuanto a el aumento de latencia de escape, distancia de escape y porcentaje de permanencia en el cuadrante de escape que se correlaciona con el envejecimiento indicando deterioro en el aprendizaje y la memoria . Nuestros resultados tampoco difieren en la cronología de aparición de deterioro en la utilización de estrategias espaciales y por tanto de las relaciones con el hipocampo. Mientras que Fischer et col. detecta este efecto a 18 meses y no en 12 meses que son sus grupos de edad, y nosotros ya vemos que disminuyen el porcentaje de estrategias espaciales utilizadas entre el 62 % y 70% desde los 15 meses de edad.

En el estudio del parámetro curva de aprendizaje (Ilustración 11), las observaciones obtenidas revelan que los animales emplean tiempo y espacio similares en encontrar las plataformas en todos los días de ensayo confirmando que los animales pierden capacidad de aprendizaje con el envejecimiento teniendo afectadas las relaciones hipocampales (327,342,343). Posiblemente en un refuerzo de mas intentos o de mas tiempo realizando el test se consigue al final un rendimiento favorable en cuanto al aprendizaje y la memoria espacial a medio plazo como realizan ciertos autores que requieren estudiar la consolidación de memoria y las distintas estructuras y sistemas de memoria implicados (344). Sin embargo se ha utilizado una prueba estándar que

intente detectar a modo de ensayo piloto generalizado aquellos aspectos mas probables, susceptibles de mejora por el tratamiento dietético con fresas y no ir mas allá en cuanto a los detalles de tal deterioro.

La evolución de estrategias de búsqueda se ve también influenciada por el paso de la edad. Podemos observar cómo los animales mas mayores descienden en la utilización de estrategias espaciales en los últimos días hasta tal punto que las estrategias no espaciales suponen un alto porcentaje de las utilizadas en el último día. Esta disminución es proporcional a la edad y además es compatible con el rendimiento observado en los tiempos y distancias empleados para el escape del laberinto. De tal manera que justifica el alto rendimiento de las jóvenes en su evolución a lo largo de los 4 días de aprendizaje. Al contrario que Wyss (316) que propone para esta cepa patrones de búsqueda mas desorganizados y erráticos que otras cepas, nosotros hemos encontrado que WKY utiliza estrategias de escape espaciales muy precisas a la edad de 4 meses, como vemos, los animales jóvenes aprenden a resolver la tarea mediante las señales espaciales y el porcentaje de estrategias espaciales que utilizan a través de los sucesivos ensayos es compatible con un aprendizaje eficiente (Ilustración 12). Efectivamente, observamos que en edades a partir de 12 meses, con un máximo en 24 meses, en las que Wyss y otros autores (272) ya describen una consolidación del deterioro en la realización de la tarea, estas estrategias se van perdiendo (Ilustración 118 a Ilustración 122). La mejora en el rendimiento de la tarea se debe mas a “aprendo como lo hago” que a “aprendo donde está” signos respectivamente de memoria procedimental y memoria espacial a medio plazo.

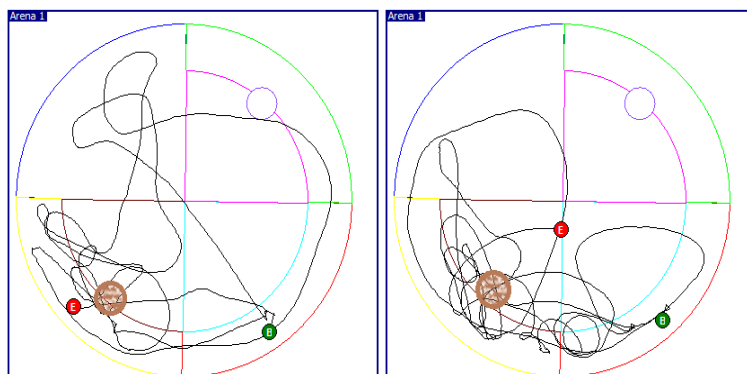


Ilustración 118. Patrón de búsqueda 4 meses. En marrón último emplazamiento plataforma de la plataforma.

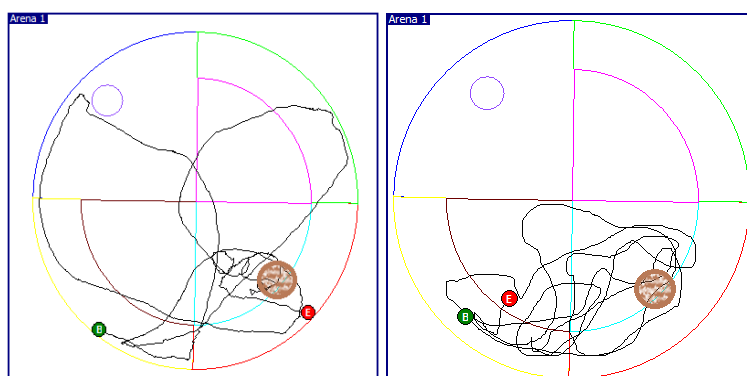


Ilustración 119: Patrón de búsqueda 15 meses. En marrón último emplazamiento plataforma de la plataforma.

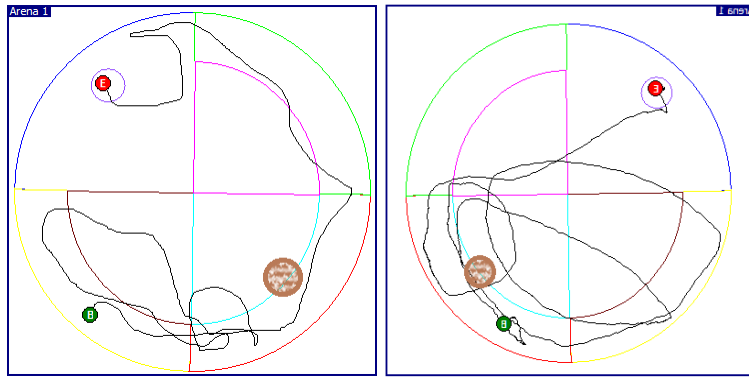


Ilustración 120: patrón de búsqueda típico 18 meses. En marrón último emplazamiento plataforma de la plataforma.

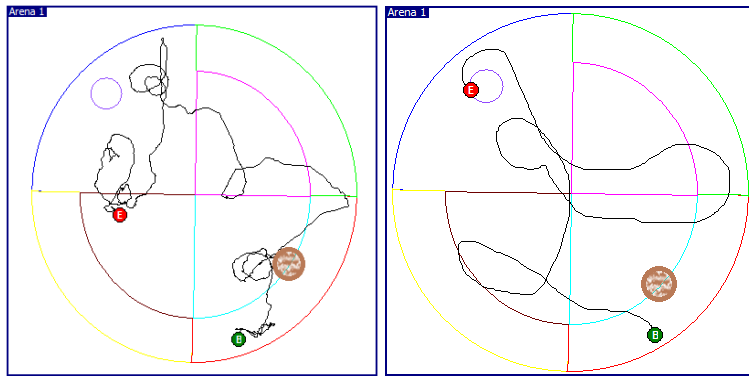


Ilustración 121. Patrón de búsqueda 24 meses. En marrón último emplazamiento plataforma de la plataforma.

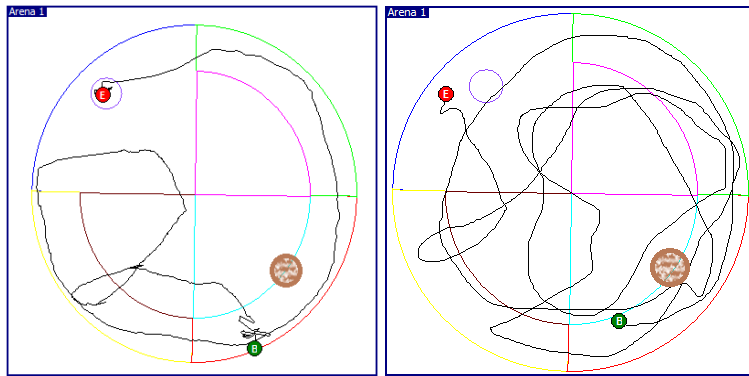


Ilustración 122. Patrón de búsqueda 28 meses. En marrón último emplazamiento plataforma de la plataforma.

Visto desde la perspectiva de los parámetros permanencia en el cuadrante de escape y número de veces que cruza al cuadrante de escape, se confirma el déficit cognitivo a través del aprendizaje espacial, que sufren los animales al no ser capaces de aprender la tarea en las condiciones descritas de intensidad de entrenamiento y duración del aprendizaje.

Confirmado el deterioro mediante esta serie de parámetros, nuestros resultados son compatibles con publicaciones relacionadas (159,345,316,295) y con lo esperado por el efecto de la evolución del envejecimiento sobre el estado cognitivo de las ratas.

Queda así pues, una cronología de lo esperado en los resultados de cada una de las pruebas para contrastar con posibles medidas terapéuticas o preventivas.

Sobre el reconocimiento social podemos asegurar que, aun siendo una prueba sensible y susceptible de utilizar como estudio de la evolución de la memoria declarativa a medio plazo en ratas, ha de ser adaptada a la singularidad de animales viejos y entendemos, que mucho más a la de los animales de la cepa Wistar Kyoto en particular. La combinación de vejez junto con el particular fenotipo conductual de estos animales que les confiere una tendencia a la evitación social (310). En nuestro caso no advertimos este efecto en toda su dimensión, los animales realizan la prueba con interés y manifiestan conductas sociales normales con sus congéneres y durante tiempos prolongados. No obstante esta característica de la cepa WKY, puede estar detrás de la variabilidad en tiempos exploración social que manifiestan y que nos impide concluir si es efecto de la memoria o no.

El análisis de la flexibilidad cognitiva determinada como la reducción de los tiempos y distancias de escape el 5º día, nos confirma al igual que los de aprendizaje y memoria que se reduce su capacidad en los estadios medio y avanzados de edad, como otro signo de declive en la función neurológica estriatal y de córtex prefrontal de forma complementaria (343).

Los animales claramente no poseen en líneas generales un descenso de los tiempos de latencia de escape o de distancia de escape cuando llegan a cierta edad confirmando que su deterioro en el funcionamiento del estriado es mayor (27) (343). Bien es cierto que en muchos casos no se puede asociar con nuestro experimento a una incapacidad por revertir lo aprendido, ya que en muchos casos los animales ya llegaban a esta fase sin utilizar la memoria referencial para realizar la tarea como lo demuestra el hecho de que se mantuvieran o, incluso disminuyeran los tiempos y distancias recorridas en el cuadrante de escape durante el primer intento del día 5 de extinción. Los animales siguen consumando la tarea mediante la utilización de estrategias de búsqueda no espaciales, en las que la probabilidad de encontrar la plataforma es constante y se traduce en latencias y distancias de escape regulares a lo largo de los cuatro intentos del 5º día.

El estudio de la evolución en la ansiedad de estos animales se ve caracterizado por su condición ya ansiosa de entrada. Como hemos visto desde muy jóvenes permanecen mucho tiempo en la zona periférica, entrando en contadas ocasiones a la zona central. De todos modos no se ha conseguido sacar una correlación positiva entre la edad y el porcentaje de tiempo que pasan en la periferia del OF (Ilustración 24) al contrario que Belviranlı (284) en su estudio de los parámetros de comportamiento en el OF a lo largo de la edad y su interacción con el sexo. Los signos de tigmotaxis entendido como el persistente contacto con las paredes del laberinto se han podido observar en muchos episodios de los ensayos en campo abierto pero no se observa una correlación con la edad si no que aparecen al azar en determinados individuos y momentos del ensayo. En el MWM sí se ve una correlación entre la permanencia en la periferia y la edad (Ilustración 29).

El parámetro “actitud exploratoria” de los animales está íntimamente relacionado con su capacidad física y estado de miedo, ya que requiere desenvolvimiento motor y superación de la aprensión o ansiedad que el animal manifiesta ante una situación novedosa para el animal.

En nuestros resultados hemos encontrado que los animales claramente disminuyen la distancia recorrida voluntariamente y las conductas de incorporación en el campo abierto coincidiendo con Belviranlı. Esto es un claro indicio de que la

motivación por explorar lo novedoso, que sí se ve en los mas jóvenes no es suficiente para vencer la ansiedad que se va aumentando con la edad y el lógico declive físico que padecen.

La capacidad de desarrollar actividad física la hemos determinado mediante las velocidades medias de desplazamiento y la actividad global en campo abierto y laberinto acuático de Morris.

Todos estos parámetros adquieren una reducción correlativa, aunque no significativa en el caso de actividad global en campo abierto y velocidad media en el laberinto acuático, con la edad; este resultado en el parámetro velocidad media de natación coincide con el obtenido por Wyss et al en ratas WKY de hasta 24 meses (316); la cepa WKY mantiene constante la velocidad de natación a lo largo de su edad como la observación al respecto de Fischer con ratas SD de hasta 30 meses (73). Una vez mas las idiosincrasias propias de la cepa influyen en los resultados; una natación lenta que tiende a flotar mas que otras cepas que necesitan propulsión en el agua para mantenerse a flote (308). Se observa una tendencia así al menor rendimiento locomotor ya que la velocidad media disminuye en el caso de desplazamiento andando pero en la natación supone menos esfuerzo muscular debido a la flotabilidad y les permite realizar las prueba con menos desgaste, además la aversión que les produce el medio acuático es mayor que la superficie sólida del campo abierto, donde ir mas despacio, pararse o tumbarse a salvo es una opción mas voluntaria o sugestiva que si está nadando. A la actividad espontánea se le atribuye una gran importancia como un indicador de la condición general de un animal de laboratorio en numerosos experimentos neurofisiológicos y farmacológicos. Sin embargo los resultados obtenidos en este parámetro con la edad arrojan en la literatura informaciones diferentes. Las diferencias en las cepas utilizadas, rangos de edad incluso las condiciones del test introducen una variabilidad crítica a la hora de estandarizar estos procedimientos y sus conclusiones. Además determinar a qué edades se empiezan a producir los cambios o a agravarse los deterioros es sumamente complicado. Esta circunstancias hace que incluso dentro de una mismas condiciones experimentales, muchas veces los resultados de cambios de la actividad física con la edad tiendan a ser poco significativos incluso medida en condiciones de estabulación y durante periodos largos de tiempo (293).

Los signos neuromotores anómalos aparecen en casos esporádicos en el caso del campo abierto solo se ven episodios de varios segundos en 3 animales mayores, cuyo motivo es la debilidad muscular en el torso no afectando a su locomoción efectiva, no parecen ser un defecto neuromotor. Los casos de signos neuromotores anómalos en el laberinto acuático como han sido descoordinación en las extremidades al nadar (nado a brazas) volteos sobre su eje, si son de origen neuromotor pero su presentación también es esporádica y por tanto no analizable desde el punto de vista estadístico.

5.2.5 Estudio del efecto de la suplementación con fresas. Estudio A.

Este grupo con 63 animales divididos en grupos de distintas edades entre 15 y 28 meses se les efectuó el test para los distintos parámetros de nuestros marcadores de forma basal antes de empezar la suplementación con lo cual obtuvimos una relación de cómo se distribuían cuantitativamente dichos parámetros a lo largo de las distintas edades. Con ello estudiamos si los parámetros estudiados se veían influenciados con la suplementación de fresas con la edad y en qué medida los pudieran hacer.

Después del periodo de suplementación los efectos del envejecimiento en las ratas la morbimortalidad de nuestro grupo fue del 26 %.



Esta circunstancia, además no fue homogénea, afectó mas a unos grupos que a otros quedando algunos ensayos con menos datos de los necesarios. Por lo que se perdió potencia estadística.

5.2.5.1 *Confrontación de los resultados basal y después de la suplementación con fresa.*

5.2.5.1.1 *Memoria y aprendizaje.*

Como se ha referido en la discusión de programa de experimentación, el efecto de mejora en la segunda prueba ha incluido a los indicadores de memoria, pero no de ansiedad, exploración y actividad física. Observamos que el asentamiento de memoria procedimental logrado tras una sesión de entrenamiento estándar de laberinto acuático condiciona fuertemente el rendimiento de la prueba 2 meses después. Así los parámetros de latencia de escape, distancia de escape mejoran significativamente la segunda vez que realizan el test. Los parámetros: estrategias de búsqueda, permanencia en el cuadrante de escape en el 5º día, número de veces que cruza el cuadrante de escape en el 5º día y tiempo o distancia de latencia en extinción tienen una tendencia positiva pero no significativa. Estos parámetros están mas fuertemente ligados a aprendizaje real, requieren un mejor estado de las capacidades cognitivas del animal, que a la rapidez adquirida por familiaridad con el procedimiento de la tarea, de ahí que no se vean tan influenciados en la fase posterior a la suplementación 2 meses después.

Efecto de la suplementación con fresa.

No podemos observar un efecto positivo estadísticamente significativo de la suplementación de fresas sobre la memoria y el aprendizaje (Ilustración 45, Ilustración 47, Ilustración 49, Ilustración 52, Ilustración 53, Ilustración 55, Ilustración 56, Ilustración 59, Ilustración 63). Nuestro modelo ha resultado ser un examinador excesivamente intenso en cuanto a las características de nuestra cepa WKY, con déficit cognitivo aumentado intrínseco de cepa, sumado a su tendencia a la ansiedad y depresión, con edades muy avanzadas y la variabilidad del diseño en cuanto a estrategia dietética con consumo voluntario y fresa fresca de temporada.

Las diferencias metodológicas de nuestro estudio con otros realizados en el mismo sentido (301) son importantes a la hora de comparar resultados. En primer lugar el desarrollo del modelo es en general inducido por radiación, citotóxicos (245) o hipoxia (346) en animales jóvenes y no como el nuestro que pretende ser un modelo de referencia de envejecimiento natural mas realista, otros estudios utilizan animales hasta 15 meses (209) y 19 meses pero suplementan con extracto de fresa mas vitamina E. Esto hace que el efecto de nuestro deterioro sean mas extenso y prolongado en el tiempo. Los resultados positivos sobre nuestro modelo, de esos estudios pueden verse influidos por el efecto de recuperación que todo organismo joven tiene sobre las injurias que estos autores provocan independientemente del efecto de la suplementación. Josep (210) utiliza animales de 19 meses y realiza un extenso análisis bioquímico de glutatión (GSH) estriatal, actividad GTP-asa, y recuperación de $^{45}\text{Ca}^{+21}$ tras la repolarización observando comparativamente, cambios precoces pero discretos en varios tipos de dieta con espinaca arándano y fresa. Pero solo observa latencias y distancias de escape y su test de Morris chequea la memoria de trabajo (working memory) en el estudio neuromotor con rotarod y rod acelerado si encuentra diferencias significativas entre animales suplementados

En su estudio Barbara Shukitt (301) observa parámetros de MWM como memoria de referencia a largo plazo o reversión de aprendizaje. Utiliza también un modelo de envejecimiento mediante irradiación con partículas de alta energía y observa que ratas irradiadas que pierden eficiencia en la tarea de aprendizaje y memoria a corto plazo pero cuando analiza la prueba de reversión no encuentra diferencias entre las irradiadas

y controles. Nuestros animales envejecidos naturalmente tienen este parámetro completamente deteriorado. Cuando contrasta los animales suplementados con los controles

5.2.5.1.2 *Ansiedad, actitud exploratoria y capacidad física.*

En estos parámetros observamos un progreso del deterioro de motivación y físico esperado en un animal 2 meses más viejo. La permanencia en las zonas periféricas, signo de tigmotaxis, tanto en campo abierto como en laberinto acuático aumentan muy discretamente en la segunda ocasión aunque no de forma significativa. Este resultado es compatible con un estado ya ansioso de las ratas y que difícilmente va a diferenciarse prueba tras prueba (Ilustración 67 e Ilustración 81). La conducta de acicalamiento aumenta pero no significativamente, tampoco es como ya indicamos al principio, un parámetro que, por sí solo indique un estado de confianza o no ansiedad sino al contrario (Ilustración 70).

La actitud exploratoria analizada a través de la distancia total recorrida (Ilustración 75) y la conducta de incorporación (rearing: Ilustración 69) en campo abierto descienden en la segunda valoración tras la suplementación, pero se observa que se trata de una tendencia no significativa.

La capacidad física de los animales, vista desde las velocidades medias de deambulación (Ilustración 77) y de natación (Ilustración 85) así como la actividad global en el campo abierto (Ilustración 79) y en laberinto acuático de Morris se ve claramente disminuida en la segunda fase. Al igual que se explica en el punto de caracterización de la cepa en cuanto a la significación estadística, se observa una tendencia a reducir la velocidad media en el caso de desplazamiento andando no significativa, pero en la natación que supone menos esfuerzo muscular debido a la flotabilidad y les permite realizar la prueba con menos desgaste, además la aversión que les produce el medio acuático es mayor que la superficie sólida del campo abierto, si es significativa.

En cuanto a las actividades globales de ambas pruebas hay un descenso general que no es significativo en el campo abierto y sí lo es en el laberinto acuático por las condiciones ya dichas.

Efecto de la suplementación con fresa.

Tampoco podemos observar un efecto positivo estadísticamente significativo de la suplementación de fresas sobre la ansiedad, actitud exploratoria y capacidad física confrontando estos datos. Cabe destacar la tendencia de las ratas controles a permanecer más porcentaje de tiempo en la zona periférica (Ilustración 67 e Ilustración 81) y a presentar una tendencia (sin entidad significativa) a aumentar sus episodios de grooming (Ilustración 70). Esto lo interpretamos como un comportamiento estereotipado propio de situaciones de frustración o estrés.

Estudiando la distancia total recorrida en el campo abierto (Ilustración 75), vemos que desciende en la segunda prueba de acuerdo con una menor motivación por lo novedoso unido a una capacidad física también inferior (Ilustración 77 e Ilustración 79), las conductas de rearing acompañan a esta disminución en la segunda fase (Ilustración 69). Este efecto es fuerte y no puede ser modificado por el efecto de la suplementación.

La capacidad física se ve afectada por la segunda prueba de manera negativa. Los animales tienen una disminución de sus velocidades de desplazamiento y actividad global en campo abierto, no obstante en el MWM se observa un cierto mantenimiento de la velocidad de los animales que han tomado fresa y una disminución significativa de los controles (Ilustración 85), mientras que se aprecia que la actividad global aumenta en ambos grupos (Ilustración 87) de forma muy fuertemente igualada en los dos grupos control y suplementados. La posible explicación es la existencia de un límite en el desarrollo de capacidades físicas en la rata WKY, como ya orienta Wyss (316) la

evolución de la velocidad tiende a ser constante en esta cepa debido a sus características conductuales en el laberinto acuático, mostrando una natación pausada e incluso momentos de descanso. Los animales no van a aumentar su velocidad por tanto la diferencia es que los animales no suplementados nadan mas despacio y tienen mas periodos de inactividad.

5.2.5.2 *Estudio de la suplementación con fresas a lo largo del envejecimiento.*

En esta segunda confrontación intentamos ver a lo largo de los distintos grupos de edad si la suplementación con fresa puede frenar los signos de deterioro del envejecimiento, para ello como ya describimos anteriormente, analizamos todos los animales en la fase posterior a la suplementación y comparamos los animales control con los suplementados. La estrategia nos permite observar algún fenómeno de irreversibilidad del deterioro producido con la edad que afecte el tratamiento. A rasgos generales vemos que este es progresivo, y los discretos efectos de la suplementación a la dieta se pueden dar incluso en edades avanzadas.

Este estudio nos da indicios de un efecto positivo cuando observamos los resultados a largo plazo, sobre el deterioro paulatino, cognitivo y neuromotor de estos animales durante las distintas edades hasta la ancianidad (30 meses).

No obstante estos factores deben ser examinados en futuros estudios que incidan en aumentar el tiempo de suplementación, ajuste de dosis, y periodo de vida del individuo en el que se realiza. Algunos de estos cambios podrían ser dirigidos a cambiar la técnica de alimentación en los animales o en la conservación y almacenaje de las fresas o sus productos. El inconveniente de estos cambios en estrategias experimentales es que se desvían de unos de los principios de este estudio: proporcionar un hábito sencillo y cercano a las costumbres alimenticias mediterráneas. Estudios paralelos sobre el metabolismo hepático pueden desvelarnos la influencia que la mejora hepática tiene sobre esta tendencia, al observar si existe correlación de los resultados en los parámetros morfofuncionales hepáticos, con los obtenidos con este estudio. No obstante, la vía concreta con la que se produzca esta influencia deberá ser analizada con nuevas investigaciones.

5.2.5.2.1 *Memoria y aprendizaje.*

Cuando estudiamos la evolución a lo largo de todos los grupos de edad, los animales controles frente a los suplementados podemos ver, a rasgos generales, que existe una tendencia a mejorar los parámetros de los segundos. Esta tendencia tampoco se puede demostrar con este estudio al no alcanzar diferencias significativas.

Como se comprobó en el estudio de caracterización todos los parámetros relacionados con la memoria y el aprendizaje, después de la fase de suplementación en el segundo test van decayendo significativamente con la edad. No obstante si comparamos los animales controles y suplementados solo podemos apuntar una tendencia a frenar los efectos de deterioro cognitivo que no tiene significación estadística en las circunstancias de este experimento.

Las latencias y distancias de escape en el 4º ensayo (Ilustración 46 e Ilustración 48), entradas en el cuadrante de escape (Ilustración 60) y % de distancia en el cuadrante de escape en el 1º intento del 5º (Ilustración 58) cumplen la misma tendencia, se ven ligeramente mejoradas, revelando una posible mejora de la memoria de referencia espacial sin que pueda confirmarse dicho efecto con este estudio. Es de destacar que las permanencias en el cuadrante de escape se ven orientadas a mejorar en cuanto a % distancias (Ilustración 58) pero al no concordar con los % de tiempo y el número de entradas y no tener significación estadística, no podemos corroborarlo.

La curva de aprendizaje no se ve mejorada con la edad ni en los animales control ni en los suplementados, manteniendo los tiempos y la distancias diferenciales entre distintos día de ensayo (Ilustración 50,) y con un patrón de aprendizaje que parece aleatorio en general. Es de destacar que en tres franjas de edad de los animales suplementados (15, 19 y 27 meses), se exhibe este patrón, que revela un proceso de aprendizaje adecuado; aunque no observamos una correlación con el patrón de estrategias de búsqueda de los animales que han comido fresa, que coincide en esos mismos rangos de edad (Ilustración 54).

La estrategia espacial (% de estrategias espaciales en MWM Ilustración 54) de los animales suplementados da una tendencia a permanecer constante durante las distintas edades mientras que las de los controles tienden a disminuir, como en ocasiones anteriores esta aseveración carece de confirmación estadística.

Las latencias y distancias de escape en la prueba de extinción a lo largo de la edad revelan una tendencia a mantenerse estables o incluso a mejorar con la edad si se compara el envejecimiento de los animales suplementados con los controles (Ilustración 65 e Ilustración 66). Las gráficas de las curvas de reversión de aprendizaje tampoco revelan un patrón de aprendizaje en general mejorado que evolucione con la edad en los animales suplementados con fresa pero encontramos la excepción de en algunas edades dispersas 15 meses, 17 meses y 23 meses con que si lo hacen revelando cierto efecto de la suplementación (Ilustración 65 inferior e Ilustración 66 inferior).

En definitiva, analizando la suplementación de fresas a lo largo de las distintas fases de envejecimiento se detecta una tendencia a detener el deterioro cognitivo cuando se suplementa a los animales con fresa, que se expresa en una cierta capacidad de aprendizaje espacial y memoria espacial de referencia a medio plazo y cierta flexibilidad neuronal, respecto a los animales no suplementados.

5.2.5.2.2 *Ansiedad, actitud exploratoria y capacidad física.*

La distancia total recorrida en campo abierto y el número de conductas de incorporación como parámetros exploratorios nos vuelven a confirmar que a lo largo de los grupos de edad desciende de forma compatible con la caracterización fenotípica. La tendencia de los animales suplementados sobre los controles es a mantenerse, menos tiempo en la zona periférica del MWM (Ilustración 88) y una cierta mejor actitud exploratoria reflejada en leve aumento de distancia total recorrida en campo abierto y en episodios de rearing registrados (Ilustración 76).

Las velocidades medias de desplazamiento (Ilustración 78), así como la actividad global total en campo abierto (Ilustración 80) y laberinto acuático (Ilustración 88), nos muestran la misma reducción en la capacidad locomotora y física, y la escasa o nula influencia de la suplementación con fresas de estos marcadores de envejecimiento. Sin embargo en la velocidad media de natación sí se aprecia que los animales que han tomado fresa mantienen constante esta capacidad, mientras que decaen en los animales control y al igual que ocurre con otros marcadores cognitivos se observa una tendencia a mejorar e incluso una mejora significativa en la velocidad media de natación en el MWM estudiando la evolución del deterioro físico con la edad y la suplementación (Ilustración 86).

Estudiando la permanencia en la zona periférica del laberinto acuático (Ilustración 83) y campo abierto (Ilustración 68) observamos también aumento progresivo con la edad en la fase posterior a la suplementación compatible con los resultados basales obtenidos en la caracterización general. Si comparamos los animales que han tomado fresa con los controles, la tendencia es a ser menos ansiosos, bajan los tiempos de

permanencia pero no se puede corroborar mediante este experimento por la falta de significación. Podemos observar algunos datos interesantes como que prácticamente el 100% del tiempo de transcurso de la prueba de campo abierto lo pasan en la periferia (Ilustración 88) y que las conductas de acicalamiento no se modifican a lo largo de los distintos grupos de edad, llevándonos a confirmar también desde este punto de análisis la tendencia ansiosa de estos animales.

Los parámetros que hemos relacionado con la edad, como permanencia en la zona periférica en MWM (Ilustración 83 e Ilustración 84) y actitudes en el campo abierto (Ilustración 68), nos muestran una tendencia a ser menos ansiosas cuando han tomado fresa, interpretamos el aumento de los episodios de acicalamiento (grooming Ilustración 74) que manifiestan los animales controles, como una conducta estereotipada, signo de ansiedad.

Cuando estudiamos estos parámetros combinados, encontramos que durante el envejecimiento aumentan los signos de ansiedad y esto podría afectar de manera mas o menos constante al rendimiento en las tareas o la evolución de las conductas naturales que comprobamos para el estudio del envejecimiento, como son la actitud exploratoria y la aptitud física. La interrelación de esta característica con la actitud exploratoria nos debería hacer pensar que si la afecta pero no es la causa directa de manifestar una disminución de estas conductas de curiosidad natural ya que, como vemos, la tendencia a la actitud ansiosa va disminuyendo en los animales que toman fresas. Los parámetros para capacidad física indican que ésta está levemente disminuida a lo largo de las distintas edades por lo que la interrelación con la actitud exploratoria nos hace pensar en una relación causa efecto al no verse mejorada con la suplementación no lo hace tampoco la actitud exploratoria en consecuencia.

5.2.6 Estudio del efecto de la suplementación con fresas. Estudio B.

En el estudio B utilizamos un programa de experimentación distinto en cuanto a cronologías, edades y distribución de grupos.

Los animales son testeados para todos los mismos marcadores de envejecimiento a una edad muy temprana, 4 meses determinando que estos valores tienen deterioro cognitivo, locomotor y emocional cero para esta cepa. Luego de un periodo de suplementación encuadrado con el periodo de cosecha del fruto se suplementó con fresas durante 60 días. Tras lo cual, al llegar estos animales a los 15 meses de edad se testearon para esos parámetros. Durante este estudio encontramos una mortalidad de dos animales (13%) y ambos pertenecían al grupo de suplementados.

Las particularidades de este estudio son:

- Aplicación temprana de la suplementación
- Estudio de su repercusión a edades medias, 15 meses.
- Todos los animales tienen la misma edad de comienzo y fin.

Bajo estas condiciones contrastamos la evolución de los grupos control y suplementados en las fases basal y posterior a la suplementación.

5.2.6.1.1 *Memoria y aprendizaje.*

Todos los parámetros para la determinación de la memoria y el aprendizaje en este estudio: latencias de escape, distancias de escape, la permanencia en el cuadrante correcto, las estrategias de búsqueda, capacidad de reversión, muestran una tendencia a evolucionar de forma compatible con el envejecimiento de la cepa, en el segundo test 12 meses después. No obstante, esta evolución en este estudio no alcanza significación estadística en muchos casos como latencia (Ilustración 93), número de entradas en el cuadrante correcto en el 5º ensayo (Ilustración 100) y capacidad de reversión (Ilustración 101). Observamos que, el deterioro cognitivo se produce en estos animales a la edad de 15 meses. No observamos que el efecto de la suplementación en el desarrollo de la tarea en la memoria modifique esta tendencia 12 meses después en ratas WKY.

Las estrategias de búsqueda desarrolladas por los animales en este estudio no se acercan a lo documentado por Wyss (316), ya que como vemos hemos visto cuando son jóvenes el porcentaje de estrategias espaciales es alto en el último día de ensayo (Ilustración 97) y la evolución de estas estrategias a lo largo de los distintos días de aprendizaje es correcto (Ilustración 12).

5.2.6.1.2 *Ansiedad, actitud exploratoria y capacidad física.*

La permanencia en la zona periférica en el campo abierto (Ilustración 105) muestra un aumento en la segunda evaluación. Las entradas a la zona central desaparecen y las conductas exploratorias se disminuyen dramáticamente. La conducta de grooming no varía y las defecaciones de media tampoco. Esto es nos ofrece un aporte cronológico compatible con nuestra caracterización de la cepa en donde encontramos que existe un aumento de la tendencia ansiosa a partir de 15 meses que ya observamos en este grupo. La diferencia de estos parámetros entre animales controles y suplementados no es significativa. La permanencia periférica del laberinto acuático (Ilustración 112), parece tener una tendencia negativa.

Se da la circunstancia de que tanto la velocidad media de natación (Ilustración 113) como la actividad global (Ilustración 114) en el MWM aumenten en la segunda fase 12 meses después, siendo la explicación más razonable, un estado de motivación o miedo que les imprima ese carácter de aumentar la actividad para intentar encontrar el escape, también se puede explicar por el hecho de que, en general, las distancias recorridas por los animales en la segunda prueba son mucho mayores, que en la

primera, donde los animales conocían desde el 2^o-3^o día la localización de la plataforma cuando tenían 4 meses, por ello inferimos que la seguridad en resolver el laberinto junto con menores trayectos, se traducen en una disminución de velocidad ($15,25 \pm 3,88$ m/sg) y actividad registrados cuando comparamos los valores de velocidad media de la segunda prueba ($21,67 \pm 4,76$ cm/sg) que encontramos compatibles con los resultados del grupo anterior (Estudio A velocidad media 15 meses= $20,47 \pm 7,12$ m/sg) y la literatura (73,308,316).

La permanencia en la periferia de OF (Ilustración 105) se hace mayor mientras que el espacio recorrido (Ilustración 109) y los episodios de incorporación (rearing) (Ilustración 106) disminuyen, traduciéndose en que los parámetros de ansiedad aumentan con la edad, en la misma proporción que disminuyen los de actitud exploratoria. Al igual que el resto de los datos estos parámetros no alcanzan en este caso significación estadística.

Tanto las velocidades medias (Ilustración 110) como la actividad global (Ilustración 111) en OF disminuyen, reflejo de que a capacidad física se ve claramente mermada de la primera a la segunda prueba

Las fresas no producen un efecto significativo en ninguno de estos parámetros en este segundo grupo de experimentación.

Conclusiones

6 Conclusiones.

1. La cepa WKY presenta un declive cognitivo que afecta a la capacidad de aprendizaje, memoria espacial de referencia de influencia hipocampal y a la flexibilidad cognitiva relacionada con el córtex prefrontal de forma correlativa con la edad y es más evidenciable a partir de los 17 meses.

2. La cepa WKY presenta un alto componente de ansiedad en la formación de conducta, tanto en el aprendizaje, en la memoria y la actitud exploratoria que aumenta durante el envejecimiento.

3. La actitud exploratoria de estos animales no se encuentra relacionada con la ansiedad ya que no se ve modificada tras un proceso de habituación del animal.

4. Existe un efecto de consolidación de la tarea en la memoria procedimental (no declarativa) que se traduce en la mejora de eficacia al realizar una misma prueba por segunda vez. Este efecto, que puede llegar a afectar hasta 2 meses después, desaparece a los 12 meses de estudio en la cepa propuesta.

5. La suplementación de fresas en la dieta, en las condiciones propuestas en nuestro estudio, no da evidencia de mejoría significativa aunque se observa una tendencia a detener el paulatino deterioro cognitivo cuando se estudia la relación entre la suplementación con fresas y la edad, especialmente en la capacidad de aprendizaje espacial, memoria espacial de referencia a medio plazo, flexibilidad o plasticidad neuronal y en las conductas exploratorias.

6. La suplementación de fresas en la dieta, en las condiciones propuestas produce de manera significativa un menor grado de deterioro físico y neuromotor producido durante el envejecimiento en la velocidad media de natación, en actividad global acuática y equilibrio, pero no en velocidad media de deambulación en superficie sólida, o en la prueba de agarre.

Bibliografía

7 Bibliografía.

1. United Nations Population Division | Department of Economic and Social Affairs [Internet]. [cited 2015 Dec 11]. Available from: <http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/>
2. Pujol Rodríguez, Rogelio JPD, RogelioDiego Ramiro Fariñas, Antonio Abellán García. La mayor esperanza de vida de la serie histórica [Internet]. Blog Envejecimiento [en-red]. [cited 2015 Dec 11]. Available from: <https://envejecimientoenred.wordpress.com/2015/06/29/la-mayor-esperanza-de-vida-de-la-serie-historica/>
3. Caballero García, Juan Carlos. Aspectos generales del envejecimiento normal y patológico: fisiología y fisiopatología.
4. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev.* 2004 Oct;125(10–11):811–26.
5. Murphy DG, DeCarli C, McIntosh AR, Daly E, Mentis MJ, Pietrini P, et al. Sex differences in human brain morphometry and metabolism: an in vivo quantitative magnetic resonance imaging and positron emission tomography study on the effect of aging. *Arch Gen Psychiatry.* 1996 Jul;53(7):585–94.
6. Junqué, C. (primero), Jurado, M.A. Envejecimiento y demencias. In Barcelona: Martinez Roca; 1994.
7. Psicología Fisiológica. Rosenzweig. Leiman. McGraw-Hill Interamericana - Librería Tirant Lo Blanch [Internet]. [cited 2015 Dec 13]. Available from: <http://www.tirant.com/libreria/libro/psicologia-fisiologica-leiman-9788476159279>
8. Brody H. Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 1955 Apr 1;102(2):511–56.
9. Coleman PD, Flood DG. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1987 Dec;8(6):521–45.
10. Coleman PD, Flood DG, West MJ. Volumes of the components of the hippocampus in the aging F344 rat. *J Comp Neurol.* 1987 Dec 8;266(2):300–6.
11. Pakkenberg B, Gundersen HJ. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol.* 1997 Jul 28;384(2):312–20.
12. Rapp PR, Gallagher M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9926–30.
13. Gazzaley AH, Thakker MM, Hof PR, Morrison JH. Preserved number of entorhinal cortex layer II neurons in aged macaque monkeys. *Neurobiol Aging.* 1997 Oct;18(5):549–53.
14. Keller J. Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 2006 Feb;5(1):1–13.



15. Hof PR, Vogt BA, Bouras C, Morrison JH. Atypical form of Alzheimer's disease with prominent posterior cortical atrophy: a review of lesion distribution and circuit disconnection in cortical visual pathways. *Vision Res.* 1997 Dec;37(24):3609–25.
16. Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, et al. Peptide Compositions of the Cerebrovascular and Senile Plaque Core Amyloid Deposits of Alzheimer's Disease. *Arch Biochem Biophys.* 1993 Feb 15;301(1):41–52.
17. Atsmon-Raz Y, Miller Y. Non-Amyloid- β Component of Human α -Synuclein Oligomers Induces Formation of New A β Oligomers: Insight into the Mechanisms That Link Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *ACS Chem Neurosci.* 2015 Oct 29;
18. Pérez Trullen JM. La descripción de los ovillos neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Patol.* 2007 Jan;40(1):60–5.
19. Jucker M, Walker LC, Schwarb P, Hengemihle J, Kuo H, Snow AD, et al. Age-related deposition of glia-associated fibrillar material in brains of C57BL/6 mice. *Neuroscience.* 1994 Jun;60(4):875–89.
20. Schmidt RE. Age-related sympathetic ganglionic neuropathology: human pathology and animal models. *Auton Neurosci.* 2002;96(1):63–72.
21. Bertoni-Freddari C, Giuli C, Pieri C, Paci D. Age-related morphological rearrangements of synaptic junctions in the rat cerebellum and hippocampus. *Arch Gerontol Geriatr.* 1986 Dec;5(4):297–304.
22. Turner RS, Grafton ST, Votaw JR, DeLong MR, Hoffman JM. Motor subcircuits mediating the control of movement velocity: A PET study. *J Neurophysiol.* 1998;80(4):2162–76.
23. Darbin O. The aging striatal dopamine function. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012 Jun;18(5):426–32.
24. Joseph JA, Dalton TK, Hunt WA. Age-related decrements in the muscarinic enhancement of K⁺-evoked release of endogenous striatal dopamine: an indicator of altered cholinergic-dopaminergic reciprocal inhibitory control in senescence. *Brain Res.* 1988 Jun 28;454(1-2):140–8.
25. Finch CE, Cohen DM. Aging, metabolism, and Alzheimer disease: review and hypotheses. *Exp Neurol.* 1997 Jan;143(1):82–102.
26. Riedl AG, Watts PM, Edwards RJ, Boobis AR, Jenner P, Marsden CD. Selective localisation of P450 enzymes and NADPH-P450 oxidoreductase in rat basal ganglia using anti-peptide antisera. *Brain Res.* 1996 Dec 16;743(1-2):324–8.
27. Joseph JA, Hunt WA, Rabin BM, Dalton TK. Possible "Accelerated Striatal Aging" Induced by 56 Fe Heavy-Particle Irradiation: Implications for Manned Space Flights. *Radiat Res.* 1992 Apr;130(1):88.
28. Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M. Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised rats. *Acta Physiol Scand.* 1997 Mar;159(3):237–44.



29. Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol Zurich Switz.* 1999 Jan;9(1):133–46.
30. Migheli A, Cavalla P, Piva R, Giordana MT, Schiffer D. bcl-2 protein expression in aged brain and neurodegenerative diseases. *Neuroreport.* 1994 Oct 3;5(15):1906–8.
31. Yu G, Li J, Young D. The *Schizosaccharomyces pombe* pka1 gene, encoding a homolog of cAMP-dependent protein kinase. *Gene.* 1994 Dec 30;151(1-2):215–20.
32. Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells^{1,2}. *Free Radic Biol Med.* 2002 May 1;32(9):804–12.
33. Lu T, Finkel T. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res.* 2008 May 15;314(9):1918–22.
34. Srividhya R, Zarkovic K, Stroser M, Waeg G, Zarkovic N, Kalaiselvi P. Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (–)-epigallo catechin gallate. *Int J Dev Neurosci.* 2009 May;27(3):223–31.
35. Kanowski S, Herrmann WM, Stephan K, Wierich W, Hörr R. Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry.* 1996 Mar;29(2):47–56.
36. Yamori Y, Horie R. Community-based prevention of stroke: nutritional improvement in Japan. *Health Rep.* 1994;6(1):181–8.
37. Wang H, Cao G, Prior RL. Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem.* 1996;44(3):701–5.
38. Poornima K, Cariappa M, Asha K, Kedilaya HP, Nandini M. Oxidant and antioxidant status in vegetarians and fish eaters. *Indian J Clin Biochem.* 2003 Jul;18(2):197–205.
39. Doll R. An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer. *Proc Nutr Soc.* 1990 Jul;49(2):119–31.
40. Willett WC. Diet and health: what should we eat? *Science.* 1994 Apr 22;264(5158):532–7.
41. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer.* 1992;18(1):1–29.
42. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer.* 1993;20(1):21–9.
43. STEINMETZ KA, POTTER JD. Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention: A Review. *J Am Diet Assoc.* 1996 Oct;96(10):1027–39.



44. Hughes JM, Smithers G, Gay C, Clarke PC, Smith P, Lowe C, et al. The British National Diet and Nutrition Survey of people aged 65 years or over: protocol and feasibility study. *Proc Nutr Soc.* 1995 Nov;54(3):631–43.
45. Mayne ST. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1996 May;10(7):690–701.
46. Rai GS, Shovlin C, Wesnes KA. A double-blind, placebo controlled study of Ginkgo biloba extract ('tanakan') in elderly outpatients with mild to moderate memory impairment. *Curr Med Res Opin.* 1991;12(6):350–5.
47. Kleijnen J, Knipschild P. Ginkgo biloba for cerebral insufficiency. *Br J Clin Pharmacol.* 1992 Oct;34(4):352–8.
48. Landfield PW, Eldridge JC. Evolving aspects of the glucocorticoid hypothesis of brain aging: hormonal modulation of neuronal calcium homeostasis. *Neurobiol Aging.* 1994 Aug;15(4):579–88.
49. Amenta F, Cavallotti C, Franch F, Ricci A. Muscarinic cholinergic receptors in the hippocampus of the aged rat: effects of long-term hydergine administration. *Arch Int Pharmacodyn Thérapie.* 1989 Feb;297:225–34.
50. Araujo DM, Lapchak PA, Meaney MJ, Collier B, Quirion R. Effects of aging on nicotinic and muscarinic autoreceptor function in the rat brain: relationship to presynaptic cholinergic markers and binding sites. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1990 Sep;10(9):3069–78.
51. Sherman KA, Friedman E. Pre- and post-synaptic cholinergic dysfunction in aged rodent brain regions: new findings and an interpretative review. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci.* 1990;8(6):689–708.
52. Vannucchi MG, Goldman-Rakic PS. Age-dependent decrease in the affinity of muscarinic M1 receptors in neocortex of rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 15;88(24):11475–9.
53. Viana GS, Marinho MM, Sousa FC. Effect of piracetam administration on 3H-N-methylscopolamine binding in cerebral cortex of young and old rats. *Life Sci.* 1992;50(13):971–7.
54. Yufu F, Egashira T, Yamanaka Y. Age-related changes of cholinergic markers in the rat brain. *Jpn J Pharmacol.* 1994 Oct;66(2):247–55.
55. Egashira T, Takayama F, Yamanaka Y. Effects of bifemelane on muscarinic receptors and choline acetyltransferase in the brains of aged rats following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries. *Jpn J Pharmacol.* 1996 Sep;72(1):57–65.
56. Burnett DM, Bowyer JF, Masserano JM, Zahniser NR. Effect of aging on alpha-1 adrenergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in various regions of rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 Dec;255(3):1265–70.
57. Gelbmann CM, Müller WE. Specific decrease of high-affinity agonist states of alpha 2-adrenoceptors in the aging mouse brain. *J Neural Transm Gen Sect.* 1990;79(1-2):131–6.



58. Gould TJ, Bickford PC. Age-related deficits in the cerebellar beta adrenergic signal transduction cascade in Fischer 344 rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 May;281(2):965–71.
59. Joseph JA, Berger RE, Engel BT, Roth GS. Age-related changes in the nigrostriatum: a behavioral and biochemical analysis. *J Gerontol.* 1978 Sep;33(5):643–9.
60. Roth GS, Joseph JA. Cellular and molecular mechanisms of impaired dopaminergic function during aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 May 31;719:129–35.
61. Gould TJ, Strömberg I, Bickford PC. Decline in striatal dopamine D1 and D2 receptor activation in aged F344 rats. *Neurobiol Aging.* 1996 Dec;17(6):877–83.
62. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, MacGregor RR, et al. Measuring age-related changes in dopamine D2 receptors with 11C-raclopride and 18F-N-methylspiroperidol. *Psychiatry Res.* 1996 May 31;67(1):11–6.
63. Araki T, Kato H, Shuto K, Fujiwara T, Itoyama Y. Effect of aging on dopaminergic receptors and uptake sites in the rat brain studied by receptor autoradiography. *J Neurol Sci.* 1997 May 29;148(2):131–7.
64. Zhang L, Roth GS. The effect of aging on rat striatal D1 receptor mRNA-containing neurons. *Neurobiol Aging.* 1997 Apr;18(2):251–5.
65. Cepeda C, Levine MS. Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev Neurosci.* 1998;20(1):1–18.
66. Dondi D, Maggi R, Limonta P, Martini L, Piva F. Binding characteristics of delta opioid receptors in different regions of the brain of young and old male rats as studied with the highly selective ligand [D-Pen2-D-Pen5] enkephalin. *Aging Milan Italy.* 1992 Mar;4(1):69–75.
67. Kornhuber J, Schoppmeyer K, Bendig C, Riederer P. Characterization of [3H]pentazocine binding sites in post-mortem human frontal cortex. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 1996;103(1-2):45–53.
68. Nagahara AH, Gill TM, Nicolle M, Gallagher M. Alterations in opiate receptor binding in the hippocampus of aged Long-Evans rats. *Brain Res.* 1996 Jan 22;707(1):22–30.
69. Terry AV, Plagenhoef M, Callahan PM. Effects of the nicotinic agonist varenicline on the performance of tasks of cognition in aged and middle-aged rhesus and pigtail monkeys. *Psychopharmacology (Berl).* 2015 Nov 27;
70. Musumeci G, Castrogiovanni P, Castorina S, Imbesi R, Szychlinska MA, Scuderi S, et al. Changes in serotonin (5-HT) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in frontal cortex and hippocampus of aged rat treated with high tryptophan diet. *Brain Res Bull.* 2015 Oct;119(Pt A):12–8.
71. Decker MW. The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain Res.* 1987 Nov;434(4):423–38.

72. Bizon JL, Han JS, Hudon C, Gallagher M. Effects of hippocampal cholinergic deafferentation on learning strategy selection in a visible platform version of the water maze. *Hippocampus*. 2003;13(6):676–84.
73. Fischer W, Chen KS, Gage FH, Björklund A. Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging. *Neurobiol Aging*. 1992 Jan;13(1):9–23.
74. Yokoyama JS, Bonham LW, Sturm VE, Adhimoalam B, Karydas A, Coppola G, et al. The 5-HTTLPR variant in the serotonin transporter gene modifies degeneration of brain regions important for emotion in behavioral variant frontotemporal dementia. *NeuroImage Clin*. 2015;9:283–90.
75. Spiteri T, Musatov S, Ogawa S, Ribeiro A, Pfaff DW, Ågmo A. The role of the estrogen receptor α in the medial amygdala and ventromedial nucleus of the hypothalamus in social recognition, anxiety and aggression. *Behav Brain Res*. 2010 Jul;210(2):211–20.
76. Fuchs JL. 5'-Nucleotidase activity increases in aging rat brain. *Neurobiol Aging*. 1991 Sep;12(5):523–30.
77. Jia Z, Xue R, Ma S, Xu J, Guo S, Li S, et al. Erythropoietin Attenuates the Memory Deficits in Aging Rats by Rescuing the Oxidative Stress and Inflammation and Promoting BDNF Releasing. *Mol Neurobiol*. 2015 Oct 20;
78. Guarente L. Sirtuins and calorie restriction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):207.
79. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 1995 Aug 31;376(6543):775–8.
80. Rovelet-Lecrux A, Charbonnier C, Wallon D, Nicolas G, Seaman MNJ, Pottier C, et al. De novo deleterious genetic variations target a biological network centered on A β peptide in early-onset Alzheimer disease. *Mol Psychiatry*. 2015 Sep;20(9):1046–56.
81. Pastor P, Pastor E, Carnero C, Vela R, García T, Amer G, et al. Familial atypical progressive supranuclear palsy associated with homozygosity for the delN296 mutation in the tau gene. *Ann Neurol*. 2001 Feb;49(2):263–7.
82. Bruni AC, Bernardi L, Colao R, Rubino E, Smirne N, Frangipane F, et al. Worldwide distribution of PSEN1 Met146Leu mutation: A large variability for a founder mutation. *Neurology*. 2010 Mar 9;74(10):798–806.
83. Grigorenko AP, Rogaev EI. [Molecular basics of Alzheimer's disease]. *Mol Biol (Mosk)*. 2007 Apr;41(2):331–45.
84. Kaja S, Sumien N, Shah VV, Puthawala I, Maynard AN, Khullar N, et al. Loss of Spatial Memory, Learning, and Motor Function During Normal Aging Is Accompanied by Changes in Brain Presenilin 1 and 2 Expression Levels. *Mol Neurobiol*. 2015 Aug;52(1):545–54.
85. Bullido MJ, Guallar-Castillón P, Artiga MJ, Ramos MC, Sastre I, Aldudo J, et al. Alzheimer's risk associated with human apolipoprotein E, alpha-2 macroglobulin



- and lipoprotein receptor related protein polymorphisms: absence of genetic interactions, and modulation by gender. *Neurosci Lett*. 2000 Aug 11;289(3):213–6.
86. Carter CJ. Convergence of genes implicated in Alzheimer's disease on the cerebral cholesterol shuttle: APP, cholesterol, lipoproteins, and atherosclerosis. *Neurochem Int*. 2007 Jan;50(1):12–38.
 87. Chang JR, Ghafouri M, Mukerjee R, Bagashev A, Chabrashvili T, Sawaya BE. Role of p53 in Neurodegenerative Diseases. *Neurodegener Dis*. 2012 Feb;9(2):68–80.
 88. Li H, Mitchell JR, Hasty P. DNA double-strand breaks: A potential causative factor for mammalian aging? *Mech Ageing Dev*. 2008 Jul;129(7-8):416–24.
 89. Sinclair DA, Oberdoerffer P. The ageing epigenome: Damaged beyond repair? *Ageing Res Rev*. 2009 Jul;8(3):189–98.
 90. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell*. 2006 Jan 27;124(2):315–29.
 91. McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging*. 2009 Jan;1(1):109–21.
 92. Wang R-H, Sengupta K, Li C, Kim H-S, Cao L, Xiao C, et al. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*. 2008 Oct 7;14(4):312–23.
 93. Baker DJ, Jeganathan KB, Malureanu L, Perez-Terzic C, Terzic A, van Deursen JMA. Early aging-associated phenotypes in Bub3/Rae1 haploinsufficient mice. *J Cell Biol*. 2006 Feb 13;172(4):529–40.
 94. Choudhury AR, Ju Z, Djojotubroto MW, Schienke A, Lechel A, Schaezlein S, et al. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):99–105.
 95. Baker DJ, Perez-Terzic C, Jin F, Pitel KS, Pitel K, Niederländer NJ, et al. Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat Cell Biol*. 2008 Jul;10(7):825–36.
 96. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. 1997 Oct 3;91(1):25–34.
 97. Schaezlein S, Kodandamireddy N., Ju Z, Lechel A, Stepzynska A, Lilli DR, et al. Exo1 deletion impairs DNA damage signal induction and prolongs lifespan of telomere dysfunctional mice. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):863–77.
 98. Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res*. 2004 Aug;45(8):1375–97.

99. Zambón D, Quintana M, Mata P, Alonso R, Benavent J, Cruz-Sánchez F, et al. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. *Am J Med.* 2010 Mar;123(3):267–74.
100. Ledesma MD, Dotti CG. Peripheral cholesterol, metabolic disorders and Alzheimer's disease. *Front Biosci Elite Ed.* 2012;4:181–94.
101. Bogdanovic N, Bretilon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, et al. On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci Lett.* 2001 Nov 13;314(1-2):45–8.
102. Valenza M, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Fenu S, Jamot L, et al. Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2005 Oct 26;25(43):9932–9.
103. Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *J Neurochem.* 1990 Feb;54(2):415–23.
104. Svennerholm L, Boström K, Helander CG, Jungbjer B. Membrane lipids in the aging human brain. *J Neurochem.* 1991 Jun;56(6):2051–9.
105. Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B. Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. *Acta Neuropathol (Berl).* 1997 Oct;94(4):345–52.
106. Sodero AO, Trovò L, Iannilli F, Van Veldhoven P, Dotti CG, Martin MG. Regulation of tyrosine kinase B activity by the Cyp46/cholesterol loss pathway in mature hippocampal neurons: relevance for neuronal survival under stress and in aging. *J Neurochem.* 2011 Mar;116(5):747–55.
107. Thelen KM, Falkai P, Bayer TA, Lütjohann D. Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. *Neurosci Lett.* 2006 Jul 31;403(1-2):15–9.
108. Martín MG, Pfrieger F, Dotti CG. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Rep.* 2014 Oct;15(10):1036–52.
109. Prediger RD., Batista LC, Miyoshi E, Takahashi RN. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. *Behav Brain Res.* 2004 Aug;153(1):149–57.
110. Raynor J, Lages CS, Shehata H, Hildeman DA, Chougnet CA. Homeostasis and function of regulatory T cells in aging. *Host Pathog Immune Senescence.* 2012 Aug;24(4):482–7.
111. Nikolettou V, Tavernarakis N. Calcium homeostasis in aging neurons. *Front Genet.* 2012;3:200.
112. Orellana AMM, Vasconcelos AR, Leite JA, de Sá Lima L, Andreotti DZ, Munhoz CD, et al. Age-related neuroinflammation and changes in AKT-GSK-3 β and WNT/ β -CATENIN signaling in rat hippocampus. *Aging.* 2015 Dec 6;
113. Matt SM, Johnson RW. Neuro-immune dysfunction during brain aging: new insights in microglial cell regulation. *Curr Opin Pharmacol.* 2015 Nov 17;26:96–101.



114. Malik M, Simpson JF, Parikh I, Wilfred BR, Fardo DW, Nelson PT, et al. CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2013 Aug 14;33(33):13320–5.
115. Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, et al. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron*. 2013 May 22;78(4):631–43.
116. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011 Apr;91(2):461–553.
117. Boche D, Perry VH, Nicoll J a. R. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013 Feb;39(1):3–18.
118. Streit WJ, Xue Q-S, Tischer J, Bechmann I. Microglial pathology. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:142.
119. Mosher KI, Wyss-Coray T. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 2014 Apr 15;88(4):594–604.
120. Bachstetter AD, Van Eldik LJ, Schmitt FA, Neltner JH, Ighodaro ET, Webster SJ, et al. Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and hippocampal sclerosis of aging. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2015 May 23 [cited 2015 Dec 21];3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4489160/>
121. Landfield PW, Eldridge JC. The glucocorticoid hypothesis of age-related hippocampal neurodegeneration: role of dysregulated intraneuronal calcium. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Nov 30;746:308–21; discussion 321–6.
122. de la Tremblaye PB, Raymond J, Milot MR, Merali Z, Plamondon H. Evidence of lasting dysregulation of neuroendocrine and HPA axis function following global cerebral ischemia in male rats and the effect of Antalarmin on plasma corticosterone level. *Horm Behav*. 2014 Mar;65(3):273–84.
123. Bodles AM, Barger SW. Cytokines and the aging brain - what we don't know might help us. *Trends Neurosci*. 2004 Oct;27(10):621–6.
124. Cannon JR, Greenamyre JT. The Role of Environmental Exposures in Neurodegeneration and Neurodegenerative Diseases. *Toxicol Sci*. 2011 Dec;124(2):225–50.
125. Masliah E, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Hansen LA. Caspase dependent DNA fragmentation might be associated with excitotoxicity in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998 Nov;57(11):1041–52.
126. Gheusi G, Ortega-Perez I, Murray K, Lledo P-M. A niche for adult neurogenesis in social behavior. *Behav Brain Res*. 2009 Jun;200(2):315–22.
127. Garthe A, Roeder I, Kempermann G. Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*. 2015 Aug 27;



128. Smagin DA, Park J-H, Michurina TV, Peunova N, Glass Z, Sayed K, et al. Altered Hippocampal Neurogenesis and Amygdalar Neuronal Activity in Adult Mice with Repeated Experience of Aggression. *Front Neurosci.* 2015;9:443.
129. Sung Y-H. Effects of treadmill exercise on hippocampal neurogenesis in an MPTP /probenecid-induced Parkinson's disease mouse model. *J Phys Ther Sci.* 2015 Oct;27(10):3203–6.
130. Vivar C, van Praag H. Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Front Neural Circuits.* 2013;7:15.
131. Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H. When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci.* 2010 Dec;33(12):569–79.
132. Mu Y, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2011;6:85.
133. Gheusi G, Ortega-Perez I, Murray K, Lledo P-M. A niche for adult neurogenesis in social behavior. *Behav Brain Res.* 2009 Jun;200(2):315–22.
134. Geifman N, Rubin E. Towards an Age-Phenome Knowledge-base. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:229.
135. Brenowitz WD, Nelson PT, Besser LM, Heller KB, Kukull WA. Cerebral amyloid angiopathy and its co-occurrence with Alzheimer's disease and other cerebrovascular neuropathologic changes. *Neurobiol Aging.* 2015 Oct;36(10):2702–8.
136. Forette F, Seux M-L, Staessen JA, Thijs L, Birkenhäger WH, Babarskiene M-R, et al. Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *The Lancet.* 1998 Oct 24;352(9137):1347–51.
137. Thal DR, Grinberg LT, Attems J. Vascular dementia: Different forms of vessel disorders contribute to the development of dementia in the elderly brain. *Exp Gerontol.* 2012 Nov;47(11):816–24.
138. Korczyn AD, Vakhapova V, Grinberg LT. Vascular dementia. *J Neurol Sci.* 2012 Nov;322(1-2):2–10.
139. Ortiz M, Córdoba J, Jacas C, Flavià M, Esteban R, Guardia J. Neuropsychological abnormalities in cirrhosis include learning impairment. *J Hepatol.* 2006 Jan;44(1):104–10.
140. Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Rückert N, Hecker H. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 2001 May;34(5):768–73.
141. Weissenborn K, Heidenreich S, Giewekemeyer K, Rückert N, Hecker H. Memory function in early hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 2003 Sep;39(3):320–5.
142. Begega A, Méndez M, Rubio S, Santín LJ, Aller MA, Arias J, et al. Portal hypertension in 18-month-old rats: Memory deficits and brain metabolic activity. *Physiol Behav.* 2010 May;100(2):135–42.



143. Langlais PJ, Mandel RJ, Mair RG. Diencephalic lesions, learning impairments, and intact retrograde memory following acute thiamine deficiency in the rat. *Behav Brain Res.* 1992 Jun 8;48(2):177–85.
144. Arsenijevic Y, Tribollet E. Region-specific effect of testosterone on oxytocin receptor binding in the brain of the aged rat. *Brain Res.* 1998;785(1):167–70.
145. Heikkinen T, Puoliväli J, Tanila H. Effects of long-term ovariectomy and estrogen treatment on maze learning in aged mice. *Exp Gerontol.* 2004 Sep;39(9):1277–83.
146. McLaughlin KJ, Bimonte-Nelson H, Neisewander JL, Conrad CD. Assessment of estradiol influence on spatial tasks and hippocampal CA1 spines: Evidence that the duration of hormone deprivation after ovariectomy compromises 17 β -estradiol effectiveness in altering CA1 spines. *Horm Behav.* 2008;54(3):386–95.
147. Rodrigues MA, Verdile G, Foster JK, Hogervorst E, Joesbury K, Dhaliwal S, et al. Gonadotropins and cognition in older women. *J Alzheimers Dis.* 2008;13(3):267–74.
148. Blair JA, Palm R, Chang J, McGee H, Zhu X, Wang X, et al. Luteinizing hormone downregulation but not estrogen replacement improves ovariectomy-associated cognition and spine density loss independently of treatment onset timing. *Horm Behav.* 2015 Oct 21;
149. Verhaeghen P, Cerella J. Aging, executive control, and attention: A review of meta-analyses. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26(7):849–57.
150. Salthouse TA. What and when of cognitive aging. *Curr Dir Psychol Sci.* 2004;13(4):140–4.
151. Brown SL, Nesse RM, Vinokur AD, Smith DM. Providing social support may be more beneficial than receiving it: results from a prospective study of mortality. *Psychol Sci.* 2003 Jul;14(4):320–7.
152. Petersen RC, Smith G, Kokmen E, Ivnik RJ, Tangalos EG. Memory function in normal aging. *Neurology.* 1992 Feb;42(2):396–401.
153. Youngjohn JR, Crook TH. Learning, forgetting, and retrieval of everyday material across the adult life span. *J Clin Exp Neuropsychol.* 1993 Jul;15(4):447–60.
154. Deary IJ. Psychometric intelligence differences and brain function. *Novartis Found Symp.* 2000;233:58–72; discussion 73–8.
155. Cohen RM, Small C, Lalonde F, Friz J, Sunderland T. Effect of apolipoprotein E genotype on hippocampal volume loss in aging healthy women. *Neurology.* 2001 Dec 26;57(12):2223–8.
156. Stevens WD, Hasher L, Chiew KS, Grady CL. A neural mechanism underlying memory failure in older adults. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2008 Nov 26;28(48):12820–4.
157. Head E, Mehta R, Hartley J, Kameka M, Cummings BJ, Cotman CW, et al. Spatial learning and memory as a function of age in the dog. *Behav Neurosci.* 1995 Oct;109(5):851–8.



158. Ruehl WW, Bruyette DS, DePaoli A, Cotman CW, Head E, Milgram NW, et al. Canine cognitive dysfunction as a model for human age-related cognitive decline, dementia and Alzheimer's disease: clinical presentation, cognitive testing, pathology and response to 1-deprenyl therapy. *Prog Brain Res.* 1995;106:217–25.
159. Gallagher M, Nicolle MM. Animal models of normal aging: Relationship between cognitive decline and markers in hippocampal circuitry. *Behav Brain Res.* 1993 Nov 30;57(2):155–62.
160. Thomé A, Gray DT, Erickson CA, Lipa P, Barnes CA. Memory impairment in aged primates is associated with region-specific network dysfunction. *Mol Psychiatry.* 2015 Oct 27;
161. Alaverdashvili M, Whishaw IQ. Compensation aids skilled reaching in aging and in recovery from forelimb motor cortex stroke in the rat. *Neuroscience.* 2010 Apr 28;167(1):21–30.
162. Jänicke B, Schulze G, Coper H. Motor performance achievements in rats of different ages. *Exp Gerontol.* 1983;18(5):393–407.
163. Pavani F, Bottari D. Visual Abilities in Individuals with Profound Deafness A Critical Review. In: Murray MM, Wallace MT, editors. *The Neural Bases of Multisensory Processes* [Internet]. Boca Raton (FL): CRC Press; 2012 [cited 2015 Oct 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92865/>
164. Kraemer S, Apfelbach R. Olfactory sensitivity, learning and cognition in young adult and aged male Wistar rats. *Physiol Behav.* 2004 May;81(3):435–42.
165. Mozolic JL, Hugenschmidt CE, Peiffer AM, Laurienti PJ. Multisensory Integration and Aging. In: Murray MM, Wallace MT, editors. *The Neural Bases of Multisensory Processes* [Internet]. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2012 [cited 2015 Dec 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92841/>
166. Corner L, Bond J. Being at risk of dementia: Fears and anxieties of older adults. *J Aging Stud.* 2004;18(2):143–55.
167. Blázquez G, Cañete T, Tobeña A, Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A. Cognitive and emotional profiles of aged Alzheimer's disease (3×TgAD) mice: effects of environmental enrichment and sexual dimorphism. *Behav Brain Res.* 2014 Jul 15;268:185–201.
168. Clemenson GD, Stark CEL. Virtual Environmental Enrichment through Video Games Improves Hippocampal-Associated Memory. *J Neurosci.* 2015 Dec 9;35(49):16116–25.
169. Frick KM, Benoit JD. Use It or Lose It: Environmental Enrichment as a Means to Promote Successful Cognitive Aging. *ScientificWorldJournal.* 2010 Jun 16;10:1129–41.
170. Fuchs F, Cosquer B, Penazzi L, Mathis C, Kelche C, Majchrzak M, et al. Exposure to an enriched environment up to middle age allows preservation of spatial memory capabilities in old age. *Behav Brain Res.* 2015 Nov 27;299:1–5.



171. Griñan-Ferré C, Pérez-Cáceres D, Gutiérrez-Zetina SM, Camins A, Palomera-Avalos V, Ortuño-Sahagún D, et al. Environmental Enrichment Improves Behavior, Cognition, and Brain Functional Markers in Young Senescence-Accelerated Prone Mice (SAMP8). *Mol Neurobiol*. 2015 May 27;
172. Irier H, Street RC, Dave R, Lin L, Cai C, Davis TH, et al. Environmental enrichment modulates 5-hydroxymethylcytosine dynamics in hippocampus. *Genomics*. 2014 Nov;104(5):376–82.
173. Szulwach KE, Li X, Li Y, Song C-X, Wu H, Dai Q, et al. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci*. 2011 Dec;14(12):1607–16.
174. van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2005 Sep 21;25(38):8680–5.
175. Harburger LL, Lambert TJ, Frick KM. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behav Brain Res*. 2007 Dec 11;185(1):43–8.
176. Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res*. 2005 Aug 30;163(1):78–90.
177. Zhao E, Tranovich MJ, DeAngelo R, Kontos AP, Wright VJ. Chronic exercise preserves brain function in masters athletes when compared to sedentary counterparts. *Phys Sportsmed*. 2015 Oct 29;1–6.
178. Devi SA, Kiran TR. Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary Vitamin E in aging rat brain. *Neurobiol Aging*. 2004 Apr;25(4):501–8.
179. Soto I, Graham LC, Richter HJ, Simeone SN, Radell JE, Grabowska W, et al. APOE Stabilization by Exercise Prevents Aging Neurovascular Dysfunction and Complement Induction. *PLoS Biol*. 2015 Oct;13(10):e1002279.
180. Jacxsens L, Ibañez IC, Gómez-López VM, Fernandes JA, Allende A, Uyttendaele M, et al. Belgian and Spanish consumption data and consumer handling practices for fresh fruits and vegetables useful for further microbiological and chemical exposure assessment. *J Food Prot*. 2015 Apr;78(4):784–95.
181. Cantin J, Latour E, Ferland-Verry R, Morales Salgado S, Lambert J, Faraj M, et al. Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire focused on the Mediterranean diet for the Quebec population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2015 Nov 17;
182. Swindell WR. Dietary restriction in rats and mice: A meta-analysis and review of the evidence for genotype-dependent effects on lifespan. *Ageing Res Rev*. 2012 Apr;11(2):254–70.
183. Chung KW, Kim DH, Park MH, Choi YJ, Kim ND, Lee J, et al. Recent advances in calorie restriction research on aging. *Calor Restrict Fasting Chall Future Dir Res*. 2013 Oct;48(10):1049–53.

184. London ED, Waller SB, Ellis AT, Ingram DK. Effects of intermittent feeding on neurochemical markers in aging rat brain. *Neurobiol Aging*. 1985;6(3):199–204.
185. Guo Z, Ersoz A, Butterfield DA, Mattson MP. Beneficial Effects of Dietary Restriction on Cerebral Cortical Synaptic Terminals. *J Neurochem*. 2000;75(1):314–20.
186. Chu Y-F, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem*. 2002 Nov 6;50(23):6910–6.
187. Yang U-J, Park T-S, Shim S-M. Protective effect of chlorophyllin and lycopene from water spinach extract on cytotoxicity and oxidative stress induced by heavy metals in human hepatoma cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2013;76(23):1307–15.
188. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Willis LM. Grape Juice, Berries, and Walnuts Affect Brain Aging and Behavior. *J Nutr*. 2009 Sep 1;139(9):1813S – 1817S.
189. Mohajeri MH, Troesch B, Weber P. Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: Implications for brain aging and Alzheimer-type dementia. *Nutrition*. 2015 Feb;31(2):261–75.
190. American Institute for Cancer Research, World Cancer Research Fund, editors. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective: a project of World Cancer Research Fund International. Washington, D.C: American Institute for Cancer Research; 2007. 517 p.
191. Guen ML, Chaté V, Hininger-Favier I, Laillet B, Morio B, Pieroni G, et al. A 9-week docosahexaenoic acid-enriched supplementation improves endurance exercise capacity and skeletal muscle mitochondrial function in adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015 Dec 8;ajpendo.00468.2014.
192. Riedel WJ, Jolles J. Cognition enhancers in age-related cognitive decline. *Drugs Aging*. 1996 Apr;8(4):245–74.
193. Okaichi Y, Ishikura Y, Akimoto K, Kawashima H, Toyoda-Ono Y, Kiso Y, et al. Arachidonic acid improves aged rats' spatial cognition. *Physiol Behav*. 2005 Mar 31;84(4):617–23.
194. Suwa M, Yamaguchi S, Komori T, Kajimoto S, Kino M. The Association between Cerebral White Matter Lesions and Plasma Omega-3 to Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids Ratio to Cognitive Impairment Development. *BioMed Res Int*. 2015;2015:153437.
195. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. 1996 Feb 24;312(7029):478–81.
196. Liu H, Tian T, Qin S, Li W, Zhang X, Wang X, et al. Folic acid deficiency enhances abeta accumulation in APP/PS1 mice brain and decreases amyloid-associated miRNAs expression. *J Nutr Biochem*. 2015 Aug 8;
197. Pitt J, Roth W, Lacor P, Smith AB, Blankenship M, Velasco P, et al. Alzheimer's-associated Abeta oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Oct 15;240(2):189–97.



198. Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Tulipani S, Casoli T, Di Stefano G, González-Paramás AM, et al. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *J Nutr Biochem*. 2014 Mar;25(3):289–94.
199. Miller MG, Shukitt-Hale B. Berry fruit enhances beneficial signaling in the brain. *J Agric Food Chem*. 2012;60(23):5709–15.
200. Pitozzi V, Jacomelli M, Catelan D, Servili M, Taticchi A, Biggeri A, et al. Long-term dietary extra-virgin olive oil rich in polyphenols reverses age-related dysfunctions in motor coordination and contextual memory in mice: role of oxidative stress. *Rejuvenation Res*. 2012 Dec;15(6):601–12.
201. Mrvová N, Kuniaková M, Knezl V, Veverka M, Navarová J, Nosál R, et al. Can semi-synthetic flavonoids return old microglia to their youthful state? *Free Radic Biol Med*. 2014 Oct;75 Suppl 1:S45.
202. Grassi D, Ferri C, Desideri G. Brain protection and cognitive function: cocoa flavonoids as nutraceuticals. *Curr Pharm Des*. 2015 Nov 12;
203. Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L, Forbes-Hernandez TY, Gasparrini M, González-Paramàs AM, et al. Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. *Mol Basel Switz*. 2014;19(6):7798–816.
204. Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Gasparrini M, Alvarez-Suarez JM, Afrin S, Bompadre S, et al. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food Funct*. 2015 May;6(5):1386–98.
205. Bayram B, Ozcelik B, Grimm S, Roeder T, Schrader C, Ernst IMA, et al. A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. *Rejuvenation Res*. 2012 Feb;15(1):71–81.
206. Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, Traini C, et al. The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. *PLoS One*. 2013;8(8):e71702.
207. Williams RJ, Spencer JP., Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*. 2004 Apr;36(7):838–49.
208. Chang J, Rimando A, Pallas M, Camins A, Porquet D, Reeves J, et al. Low-dose pterostilbene, but not resveratrol, is a potent neuromodulator in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012 Sep;33(9):2062–71.
209. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Prior RL, Cao G, Martin A, et al. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci*. 1998;18(19):8047–55.
210. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, et al. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci*. 1999;19(18):8114–21.



211. Casadesus G, Shukitt-Hale B, Stellwagen HM, Zhu X, Lee H-G, Smith MA, et al. Modulation of Hippocampal Plasticity and Cognitive Behavior by Short-term Blueberry Supplementation in Aged Rats. *Nutr Neurosci*. 2004 Oct 1;7(5-6):309–16.
212. Duffy KB, Spangler EL, Devan BD, Guo Z, Bowker JL, Janas AM, et al. A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. *Neurobiol Aging*. 2008 Nov;29(11):1680–9.
213. Cunnane SC, Chouinard-Watkins R, Castellano CA, Barberger-Gateau P. Docosahexaenoic acid homeostasis, brain aging and Alzheimer's disease: Can we reconcile the evidence? *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids PLEFA*. 2013 Jan;88(1):61–70.
214. Rendeiro C, Vauzour D, Kean RJ, Butler LT, Rattray M, Spencer JPE, et al. Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Oct;223(3):319–30.
215. Li C, Zug C, Qu H, Schluesener H, Zhang Z. Hesperidin ameliorates behavioral impairments and neuropathology of transgenic APP/PS1 mice. *Behav Brain Res*. 2015 Mar 15;281:32–42.
216. J.A. Joseph A. Blueberry Supplementation Enhances Signaling and Prevents Behavioral Deficits in an Alzheimer Disease Model. *Nutr Neurosci*. 2003;6(3):153–62.
217. Chen M-M, Zhao G-W, He P, Jiang Z-L, Xi X, Xu S-H, et al. Improvement in the neural stem cell proliferation in rats treated with modified “Shengyu” decoction may contribute to the neurorestoration. *J Ethnopharmacol*. 2015 May;165:9–19.
218. Lau FC, Bielinski DF, Joseph JA. Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *J Neurosci Res*. 2007 Apr;85(5):1010–7.
219. Diet & Nutrition; Enhanced striatal dopamine recovery appeared in animals on antioxidant-enriched diet. *Sci Lett*. 2006;529.
220. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet Lond Engl*. 1994 Sep 10;344(8924):721–4.
221. Ehlenfeldt MK, Prior RL. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *J Agric Food Chem*. 2001 May;49(5):2222–7.
222. Bestwick CS, Milne L, Duthie SJ. Kaempferol induced inhibition of HL-60 cell growth results from a heterogeneous response, dominated by cell cycle alterations. *Chem Biol Interact*. 2007 Nov 20;170(2):76–85.
223. Seeram NP. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem*. 2008 Feb 13;56(3):627–9.



224. Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem*. 2006 Dec 13;54(25):9329–39.
225. Azzini E, Vitaglione P, Intorre F, Napolitano A, Durazzo A, Foddai MS, et al. Bioavailability of strawberry antioxidants in human subjects. *Br J Nutr*. 2010 Oct;104(8):1165–73.
226. Aaby K, Skrede G, Wrolstad RE. Phenolic Composition and Antioxidant Activities in Flesh and Achenes of Strawberries (*Fragaria ananassa*). *J Agric Food Chem*. 2005 May;53(10):4032–40.
227. Arts IC, van de Putte B, Hollman PC. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J Agric Food Chem*. 2000 May;48(5):1746–51.
228. Tomás-Barberán FA, Clifford MN. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 2000 May 15;80(7):1024–32.
229. Nyman NA, Kumpulainen JT. Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 2001 Sep;49(9):4183–7.
230. Maas JL, Wang SY, Galletta GJ. Evaluation of Strawberry Cultivars for Ellagic Acid Content. *HortScience*. 1991 Jan 1;26(1):66–8.
231. Daniel EM, Krupnick AS, Heur Y-H, Blinzler JA, Nims RW, Stoner GD. Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *J Food Compos Anal*. 1989 Dec;2(4):338–49.
232. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci*. 2000 Aug;18(4-5):383–99.
233. Mazza GJ. Anthocyanins and heart health. *Ann Dell'Istituto Super Sanità*. 2007;43(4):369–74.
234. Wang SY, Feng R, Lu Y, Bowman L, Ding M. Inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kappaB, and cell transformation by extracts of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *J Agric Food Chem*. 2005 May 18;53(10):4187–93.
235. Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, et al. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J Biol Chem*. 2006 Jun 23;281(25):17359–68.
236. Xue L, Wang HF, Wang Q, Szklarz GD, Domanski TL, Halpert JR, et al. Influence of P450 3A4 SRS-2 residues on cooperativity and/or regioselectivity of aflatoxin B(1) oxidation. *Chem Res Toxicol*. 2001 May;14(5):483–91.
237. Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J Agric Food Chem*. 2008 Feb 13;56(3):670–5.



238. Boivin D, Blanchette M, Barrette S, Moghrabi A, Béliveau R. Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFkappaB by edible berry juice. *Anticancer Res.* 2007 Apr;27(2):937–48.
239. Atalay M, Gordillo G, Roy S, Rovin B, Bagchi D, Bagchi M, et al. Anti-angiogenic property of edible berry in a model of hemangioma. *FEBS Lett.* 2003 Jun 5;544(1-3):252–7.
240. Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Busco F, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, et al. Strawberry consumption improves plasma antioxidant status and erythrocyte resistance to oxidative haemolysis in humans. *Food Chem.* 2011 Sep 1;128(1):180–6.
241. Erlund I, Koli R, Alfthan G, Marniemi J, Puukka P, Mustonen P, et al. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am J Clin Nutr.* 2008 Feb;87(2):323–31.
242. da Silva Pinto M, Kwon Y-I, Apostolidis E, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K. Functionality of bioactive compounds in Brazilian strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars: evaluation of hyperglycemia and hypertension potential using in vitro models. *J Agric Food Chem.* 2008 Jun 25;56(12):4386–92.
243. Pinto M da S, de Carvalho JE, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) using in vitro models. *J Med Food.* 2010 Oct;13(5):1027–35.
244. Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Battino M. Strawberry and human health: Effects beyond antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2014;62(18):3867–76.
245. Diamanti J, Mezzetti B, Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Gonzalez-Alonso A, et al. Doxorubicin-induced oxidative stress in rats is efficiently counteracted by dietary anthocyanin differently enriched strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *J Agric Food Chem.* 2014;62(18):3935–43.
246. Pradas I, Medina JJ, Ortiz V, Moreno-Rojas JM. “Fuentepina” and “Amiga”, two new strawberry cultivars: Evaluation of genotype, ripening and seasonal effects on quality characteristics and health-promoting compounds. *J Berry Res.* 2015;5(3):157–71.
247. Matuschek MC, Hendriks WH, McGhie TK, Reynolds GW. The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *J Nutr Biochem.* 2006 Jan;17(1):31–6.
248. McGhie TK, Walton MC. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol Nutr Food Res.* 2007 Jun;51(6):702–13.
249. Carkeet C, Clevidence BA, Novotny JA. Anthocyanin excretion by humans increases linearly with increasing strawberry dose. *J Nutr.* 2008 May;138(5):897–902.
250. Custodio N, Lira D, Montesinos R, Gleichgerrcht E, Manes F. [Usefulness of the Addenbrooke’s Cognitive Examination (Spanish version) in Peruvian patients with Alzheimer’s disease and Frontotemporal Dementia]. *Vertex B Aires Argent.* 2012 Jun;23(103):165–72.



251. Custodio N, Lira D, Herrera-Perez E, Nuñez Del Prado L, Parodi J, Guevara-Silva E, et al. The Memory Alteration Test Discriminates between Cognitively Healthy Status, Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra*. 2014 May;4(2):314–21.
252. Ser Quijano T del, García de Yébenes MJ, Sánchez Sánchez F, Frades Payo B, Rodríguez Laso Á, Bartolomé Martínez MP, et al. Evaluación cognitiva del anciano. Datos normativos de una muestra poblacional española de más de 70 años. *Med Clínica*. 2004;122(19):727–40.
253. Baird AL, Westwood S, Lovestone S. Blood-Based Proteomic Biomarkers of Alzheimer's Disease Pathology. *Front Neurol*. 2015;6:236.
254. Winwe, BJ, Wink, John L. *Statistical Principles in Experimental Design*. (2nd. ed.). New York: McGraw-Hill; 1972. pp. xx 907.
255. Weiss B, Elsner J. Risk Assessment for Neurobehavioral Toxicity. *Environ Health Perspect*. 1996 Apr;104(Suppl 2):171–171.
256. Marshall JF, Richardson JS, Teitelbaum P. Nigrostriatal bundle damage and the lateral hypothalamic syndrome. *J Comp Physiol Psychol*. 1974 Nov;87(5):808–30.
257. Björklund A, Dunnett SB, Stenevi U, Lewis ME, Iversen SD. Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res*. 1980 Oct 20;199(2):307–33.
258. Zola-Morgan S, Squire LR. Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behav Neurosci*. 1986 Apr;100(2):155–60.
259. Zola-Morgan S, Squire LR. Preserved learning in monkeys with medial temporal lesions: sparing of motor and cognitive skills. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1984 Apr;4(4):1072–85.
260. Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*. 1992 Apr;99(2):195–231.
261. Mumby DG, Glenn MJ. Anterograde and retrograde memory for object discriminations and places in rats with perirhinal cortex lesions. *Behav Brain Res*. 2000 Sep;114(1-2):119–34.
262. Mumby DG, Astur RS, Weisend MP, Sutherland RJ. Retrograde amnesia and selective damage to the hippocampal formation: memory for places and object discriminations. *Behav Brain Res*. 1999 Dec;106(1-2):97–107.
263. Crystal JD. Elements of episodic-like memory in animal models. *Behav Processes*. 2009 Mar;80(3):269–77.
264. Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res*. 1997 Mar;113(3):509–19.
265. Aggleton JP. Revealing the rat's behavioral repertoire. *Nat Neurosci*. 2005;8(7):843–843.



266. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev.* 2001;36(1):60–90.
267. Markowska A, Buresová O, Bures J. An attempt to account for controversial estimates of working memory persistence in the radial maze. *Behav Neural Biol.* 1983 May;38(1):97–112.
268. Gage FH, Dunnett SB, Björklund A. Spatial learning and motor deficits in aged rats. *Neurobiol Aging.* 1984;5(1):43–8.
269. Rapp PR, Rosenberg RA, Gallagher M. An evaluation of spatial information processing in aged rats. *Behav Neurosci.* 1987 Feb;101(1):3–12.
270. Gallagher M, Pelleymounter MA. An age-related spatial learning deficit: choline uptake distinguishes “impaired” and “unimpaired” rats. *Neurobiol Aging.* 1988 Aug;9(4):363–9.
271. Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci.* 1989 Sep;48(1-2):29–69.
272. Van Der Staay FJ, De Jonge M. Effects of age on water escape behavior and on repeated acquisition in rats. *Behav Neural Biol.* 1993;60(1):33–41.
273. Ingram DK, Spangler EL, Iijima S, Kuo H, Bresnahan EL, Greig NH, et al. New pharmacological strategies for cognitive enhancement using a rat model of age-related memory impairment. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Jun 30;717:16–32.
274. Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Arias JL. Portosystemic hepatic encephalopathy model shows reversal learning impairment and dysfunction of neural activity in the prefrontal cortex and regions involved in motivated behavior. *J Clin Neurosci.* 2011 May;18(5):690–4.
275. Stuss DT, Levine B. Adult clinical neuropsychology: lessons from studies of the frontal lobes. *Annu Rev Psychol.* 2002;53:401–33.
276. McDonald RJ, King AL, Foong N, Rizos Z, Hong NS. Neurotoxic lesions of the medial prefrontal cortex or medial striatum impair multiple-location place learning in the water task: evidence for neural structures with complementary roles in behavioural flexibility. *Exp Brain Res.* 2008 May;187(3):419–27.
277. Lacroix L, White I, Feldon J. Effect of excitotoxic lesions of rat medial prefrontal cortex on spatial memory. *Behav Brain Res.* 2002 Jun 15;133(1):69–81.
278. Malá H, Andersen LG, Christensen RF, Felbinger A, Hagstrøm J, Meder D, et al. Prefrontal cortex and hippocampus in behavioural flexibility and posttraumatic functional recovery: Reversal learning and set-shifting in rats. *Brain Res Bull.* 2015 Jul;116:34–44.
279. Holloway Jr. WR, Thor DH. Social memory deficits in adult male rats exposed to cadmium in infancy. *Neurotoxicol Teratol.* 1988 May;10(3):193–7.
280. Gheusi G, Bluthé RM, Goodall G, Dantzer R. Ethological study of the effects of tetrahydroaminoacridine (THA) on social recognition in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1994 May;114(4):644–50.



281. Popik P, van Ree JM. Neurohypophyseal peptides and social recognition in rats. *Prog Brain Res.* 1998;119:415–36.
282. Prediger RDS, Fernandes D, Takahashi RN. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res.* 2005 Apr 30;159(2):197–205.
283. Slotnick B. Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Cogn Sci.* 2001;5(5):216–22.
284. Belviranlı M, Atalık KEN, Okudan N, Gökbel H. Age, Sex and Anxiety Affect Locomotor Activity in Rats. *Meas Behav* 2012. 2012;500.
285. Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* [Internet]. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009 [cited 2015 Oct 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5221/>
286. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934;18(3):385–403.
287. Broadhurst PL. Psychogenetics of emotionality in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1969 Jul 30;159(3):806–24.
288. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol.* 2013 Sep;6(3):126–35.
289. Spangler EL, Waggle KS, Hengemihle J, Roberts D, Hess B, Ingram DK. Behavioral assessment of aging in male Fischer 344 and brown Norway rat strains and their F1 hybrid. *Neurobiol Aging.* 1994 Jun;15(3):319–28.
290. Battistuzzo CR, Callister RJ, Callister R, Galea MP. A Systematic Review of Exercise Training To Promote Locomotor Recovery in Animal Models of Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma.* 2012;29(8):1600–13.
291. Geifman N, Rubin E. The mouse age phenome knowledgebase and disease-specific inter-species age mapping. *PLoS One.* 2013;8(12):e81114.
292. Ingram DK, Jucker M. Developing mouse models of aging: a consideration of strain differences in age-related behavioral and neural parameters☆. *Neurobiol Aging.* 1999;20(2):137–45.
293. Jänicke B, Schulze G, Coper H. Motor performance achievements in rats of different ages. *Exp Gerontol.* 1983 Jan 1;18(5):393–407.
294. Powell DA. A behavioral stages model of classical (Pavlovian) conditioning: Application to cognitive aging. *Neurosci Biobehav Rev.* 1999;23(6):797–816.
295. Kadish I, Groen T van, Wyss JM. Chronic, Severe Hypertension Does Not Impair Spatial Learning and Memory in Sprague-Dawley Rats. *Learn Mem.* 2001 Mar 1;8(2):104–11.
296. Janus C. Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learn Mem.* 2004;11(3):337–46.



297. Klement D, Blahna K, Nekovářová T. Novel behavioral tasks for studying spatial cognition in rats. *Physiol Res*. 2008;57(3):S161.
298. Navarrete F, Pérez-Ortiz JM, Femenía T, García-Gutiérrez MS, García-Payá ME, Leiva-Santana C, et al. Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Rev Neurol*. 2008;47(3):137–45.
299. Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(7):574–9.
300. Poulouse SM, Bielinski DF, Carrihill-Knoll KL, Rabin BM, Shukitt-Hale B. Protective effects of blueberry- and strawberry diets on neuronal stress following exposure to ⁵⁶Fe particles. *Brain Res*. 2014 Dec 17;1593:9–18.
301. Shukitt-Hale B, Carey AN, Jenkins D, Rabin BM, Joseph JA. Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging. *Neurobiol Aging*. 2007 Aug;28(8):1187–94.
302. Cao Y, Ward JM, Kelly WB, Ichida AM, Gaber RF, Anderson JA, et al. Multiple genes, tissue specificity, and expression-dependent modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 1995 Nov;109(3):1093–106.
303. Cao G, Giovanoni M, Prior RL. Antioxidant capacity in different tissues of young and old rats. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1996 Apr;211(4):359–65.
304. Shukitt-Hale B, Carey A, Simon L, Mark DA, Joseph JA. Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition*. 2006 Mar;22(3):295–302.
305. Williams CM, El Mohsen MA, Vauzour D, Rendeiro C, Butler LT, Ellis JA, et al. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radic Biol Med*. 2008 Aug;45(3):295–305.
306. H'Doubler PB, Peterson M, Shek W, Auchincloss H, Abbott WM, Orkin RW. Spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats are genetically disparate. *Lab Anim Sci*. 1991 Oct;41(5):471–3.
307. Johnson ML, Ely DL, Turner ME. Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1992;19(5):425–7.
308. Grauer E, Kapon Y. Wistar-Kyoto rats in the Morris water maze: Impaired working memory and hyper-reactivity to stress. *Behav Brain Res*. 1993;59(1-2):147–51.
309. Howells FM, Russell VA. Glutamate-stimulated release of norepinephrine in hippocampal slices of animal models of attention-deficit/hyperactivity disorder (spontaneously hypertensive rat) and depression/anxiety-like behaviours (Wistar-Kyoto rat). *Brain Res*. 2008 Mar 20;1200:107–15.
310. Servatius RJ, Jiao X, Beck KD, Pang KCH, Minor TR. Rapid avoidance acquisition in Wistar-Kyoto rats. *Behav Brain Res*. 2008 Oct 10;192(2):191–7.
311. Nam H, Clinton SM, Jackson NL, Kerman IA. Learned helplessness and social avoidance in the Wistar-Kyoto rat. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:109.



312. Will CC, Aird F, Redei EE. Selectively bred Wistar–Kyoto rats: an animal model of depression and hyper-responsiveness to antidepressants. *Mol Psychiatry*. 2003;8(11):925–32.
313. McAuley JD, Stewart AL, Webber ES, Cromwell HC, Servatius RJ, Pang KCH. Wistar–Kyoto rats as an animal model of anxiety vulnerability: Support for a hypervigilance hypothesis. *Behav Brain Res*. 2009 Dec 1;204(1):162–8.
314. Sarter M. Neuronal mechanisms of the attentional dysfunctions in senile dementia and schizophrenia: two sides of the same coin? *Psychopharmacology (Berl)*. 1994;114(4):539–50.
315. Ricart TM, Jiao X, Pang KCH, Beck KD, Servatius RJ. Classical and instrumental conditioning of eyeblink responses in Wistar–Kyoto and Sprague–Dawley rats. *Behav Brain Res*. 2011 Jan 1;216(1):414–8.
316. Wyss JM, Chambless BD, Kadish I, van Groen T. Age-related decline in water maze learning and memory in rats: strain differences. *Neurobiol Aging*. 2000;21(5):671–81.
317. Bronson FH. Susceptibility of the fat reserves of mice to natural challenges. *J Comp Physiol [B]*. 1987;157(5):551–4.
318. van Groen T, Kadish I, Wyss JM. Old rats remember old tricks; memories of the water maze persist for 12 months. *Behav Brain Res*. 2002;136(1):247–55.
319. Brody DL, Holtzman DM. Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2006 Feb;197(2):330–40.
320. Dantzer R, Bluthé RM, Koob GF, Le Moal M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;91(3):363–8.
321. Snyder JM, Ward JM, Treuting PM. Cause-of-Death Analysis in Rodent Aging Studies. *Vet Pathol*. 2015 Oct 27;
322. Gorbunova V, Bozzella MJ, Seluanov A. Rodents for comparative aging studies: from mice to beavers. *Age*. 2008 Sep;30(2-3):111–9.
323. Ferguson SA, Cada AM. Spatial learning/memory and social and nonsocial behaviors in the Spontaneously Hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rat strains. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;77(3):583–94.
324. Ferguson SA, Paule MG, Cada A, Fogle CM, Gray EP, Berry KJ. Baseline behavior, but not sensitivity to stimulant drugs, differs among Spontaneously Hypertensive, Wistar–Kyoto, and Sprague–Dawley rat strains. *Neurotoxicol Teratol*. 2007 Sep;29(5):547–61.
325. Paré WP. Investigatory behavior of a novel conspecific by Wistar Kyoto, Wistar and Sprague-Dawley rats. *Brain Res Bull*. 2000;53(6):759–65.
326. Paré WP. Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying, and forced-swim tests in WKY rats. *Physiol Behav*. 1994;55(3):433–9.

327. Oliveira MG, Bueno OF, Pomarico AC, Gugliano EB. Strategies used by hippocampal- and caudate-putamen-lesioned rats in a learning task. *Neurobiol Learn Mem.* 1997 Jul;68(1):32–41.
328. Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutiérrez-Juárez R, Rossetti L, et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab.* 2008 Oct;8(4):333–41.
329. Sun X, Yamasaki M, Katsube T, Shiwaku K. Effects of quercetin derivatives from mulberry leaves: Improved gene expression related hepatic lipid and glucose metabolism in short-term high-fat fed mice. *Nutr Res Pract.* 2015 Apr;9(2):137–43.
330. Krajka-Kuźniak V, Szaefer H, Ignatowicz E, Adamska T, Markowski J, Baer-Dubowska W. INFLUENCE OF CLOUDY APPLE JUICE ON N-NITROSODIETHYLAMINE- INDUCED LIVER INJURY AND PHASES I AND II BIOTRANSFORMATION ENZYMES IN RAT LIVER. *Acta Pol Pharm.* 2015 Apr;72(2):267–76.
331. Rodriguez-Ramiro I, Vauzour D, Minihane AM. Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. *Proc Nutr Soc.* 2015 Nov 23;1–14.
332. Youdim KA, Shukitt-Hale B, Martin A, Wang H, Denisova N, Bickford PC, et al. Short-Term Dietary Supplementation of Blueberry Polyphenolics: Beneficial Effects on Aging Brain Performance and Peripheral Tissue Function. *Nutr Neurosci.* 2000;3(6):383–97.
333. van Groen T, Kadish I, Wyss JM. Old rats remember old tricks; memories of the water maze persist for 12 months. *Behav Brain Res.* 2002;136(1):247–55.
334. Mumby DG, Cameli L, Glenn MJ. Impaired allocentric spatial working memory and intact retrograde memory after thalamic damage caused by thiamine deficiency in rats. *Behav Neurosci.* 1999 Feb;113(1):42–50.
335. Karunanayaka PR, Wilson DA, Vasavada M, Wang J, Martinez B, Tobia MJ, et al. Rapidly acquired multisensory association in the olfactory cortex. *Brain Behav.* 2015 Nov;5(11):e00390.
336. Saive A-L, Royet J-P, Garcia S, Thévenet M, Plailly J. “What-Where-Which” Episodic Retrieval Requires Conscious Recollection and Is Promoted by Semantic Knowledge. *PLoS One.* 2015;10(12):e0143767.
337. Leong K-C, Goodman J, Packard MG. Post-training re-exposure to fear conditioned stimuli enhances memory consolidation and biases rats toward the use of dorsolateral striatum-dependent response learning. *Behav Brain Res.* 2015 Sep 15;291:195–200.
338. Toepper M, Markowitsch HJ, Gebhardt H, Beblo T, Bauer E, Woermann FG, et al. The impact of age on prefrontal cortex integrity during spatial working memory retrieval. *Neuropsychologia.* 2014 Jul;59:157–68.
339. Trojaborg WT, Moon A, Andersen BB, Trojaborg NS. Sural nerve conduction parameters in normal subjects related to age, gender, temperature, and height: a reappraisal. *Muscle Nerve.* 1992 Jun;15(6):666–71.



340. Hort-Legrand C, Noah L, Mériguet E, Mésangeau D. Motor and sensory nerve conduction velocities in Yucatan minipigs. *Lab Anim.* 2006;40(1):53–7.
341. Walsh ME, Sloane LB, Fischer KE, Austad SN, Richardson A, Van Remmen H. Use of Nerve Conduction Velocity to Assess Peripheral Nerve Health in Aging Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015 Nov;70(11):1312–9.
342. Devan BD, Goad EH, Petri HL. Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. *Neurobiol Learn Mem.* 1996;66(3):305–23.
343. McDonald RJ, White NM. Parallel information processing in the water maze: Evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav Neural Biol.* 1994 May;61(3):260–70.
344. Florian C, Rouillet P. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res.* 2004 Oct;154(2):365–74.
345. Ferguson SA, Gray EP. Aging effects on elevated plus maze behavior in spontaneously hypertensive, Wistar–Kyoto and Sprague–Dawley male and female rats. *Physiol Behav.* 2005 Aug;85(5):621–8.
346. Bickford PC, Shukitt-Hale B, Joseph J. Effects of aging on cerebellar noradrenergic function and motor learning: Nutritional interventions. *Mech Ageing Dev.* 1999;111(2-3):141–54.