

Tesi Doctoral: **Exercici físic i dieta en models animals: efectes emocionals, fisiològics i cognitius.**

Doctorant:
Jaume Ferrer Lanza

Dirigida per:
Rosa M^a Escorihuela Agulló

Lluís Capdevila Ortís

Estudis de Doctorat en Psicologia de la Salut i Psicologia de l'Esport.
Departament de Psicologia Bàsica, Evolutiva i de l'Educació.
Facultat de Psicologia.
Universitat Autònoma de Barcelona.
Juny de 2014

Amb l'ajut dels següent projectes:

- Ministerio de Educación y Ciencia: PSI 2008-06417-C03-01, 02, 03; SAF2009-01175; SAF2009-13093.
- Instituto de Salud Carlos III: DPS2008-06998-C01, C02; RD06/0001/0015.
- Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud.
- Generalitat de Catalunya: SGR2009-16, 2009/SGR00893, 2009/SGR-0535.
- ACC10: TECRD12-1-0005.
- Ministerio de Economía y Competitividad: PSI 2011-29807-C02-01, 02.
- Beca Predoctoral: FI-DGR 2011
- Beca de mobilitat: BE-DGR 2012



Aquest treball ha estat realitzat a l'Institut de Neurociències, al Departament de Psiquiatria i Medicina Legal i al Departament de Psicologia Bàsica, Evolutiva i de l'Educació de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, (Barcelona, Catalunya): setembre de 2010 - juny de 2014



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència: Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 4.0. Espanya de Creative

Commons.

Fotografia de portada: "Sobreviure" – Jaume F. Lalanza (CC)

(<https://www.flickr.com/photos/jaumefl/>)

"Worship the spirit of criticism"

(Louis Pasteur)

Hello darkness, my old friend,
I've come to talk with you again,
Because a vision softly creeping,
Left its seeds while I was sleeping,
And the vision that was planted in my brain
Still remains
Within the sound of silence.

In restless dreams I walk alone
Narrow streets of cobblestone,
'Neath the halo of a street lamp,
I turned my collar to the cold and damp
When my eyes were stabbed by the flash of a neon light
That split the night
And touched the sound of silence.

And in the naked light I saw
Ten thousand people, maybe more.
People talking without speaking,
People hearing without listening,
People writing songs that voices never share
And no one dared
Disturb the sound of silence.

"Fools" said I, "You do not know
Silence like a cancer grows.
Hear my words that I might teach you,
Take my arms that I might reach you."
But my words like silent raindrops fell,
And echoed
In the wells of silence.

And the people bowed and prayed
To the neon god they made.
And the sign flashed out its warning,
In the words that it was forming.
And the signs said, 'The words of the prophets are written on the
subway walls
And tenement halls.
And whisper'd in the sounds of silence.

(The Sound of Silence, Simon and Garfunkel)

Agraïments

Voldria començar amb un record per les rates amb les que he treballat, no en va s'hi deixaren la pell per la ciència. Els estudis a llarg termini impliquen moltes hores de contacte amb aquests animals fascinants i, de la mateixa manera que ells/es s'acostumen al teu tracte, tu acabes coneixent-los/les. Tanmateix, sempre n'hi ha uns quants que acabes recordant. Voldria fer especial menció a tres: al 7_3 per ser el primer a demostrar-me que sou encantadors i per deixar ensenyar-te el funcionament de la cinta ergomètrica; tampoc oblidaré a les femelles 4_4, la rata més simpàtica que mai m'he trobat i, malgrat que no fos experimental, la 33_1, tots els que vareu haver de tractar amb ella sabreu perquè: una gran exploradora.

Aquesta tesi mai hagués estat possible sense els meus tutors, en Lluís i la Rosa M^a. Encara recordo aquella tarda quan el professor Capdevila ens va mostrar un vídeo d'unes rates corrent a la cinta ergomètrica a la seva assignatura de "Psicologia de l'Activitat Física i la Salut". Aquell parell de minuts van ser suficients per decidir que el meu camí era aquell i que volia ser neurocientífic. Gràcies Lluís per acollir-me al teu grup, per tractar-me com un més des de l'inici i per la confiança que sempre m'has demostrat. Tot el que digués de la Rosa M^a es quedaria curt. No només els seus coneixements han fet de mi un petit científic, sinó que ha aconseguit que fóssim un "petit" gran grup de recerca. Sense el seu suport ni la seva amistat ara no estaríem aquí. No hi ha dubte que has estat la meva "mare científica". Gràcies!

Hi també un raconet molt especial per a la Sandra, que encara que els nostres camins es dividiren, va ser molt bonic iniciar la meua carrera científica amb tu. Cada estudiant va aportar el seu granet de sorra i estones molt divertides: Jordi, Marina, Oriol, Rita, Alba, Dani i, sobretot, Igor, ets un gran company i amic. I no puc deixar de tenir un record pels nous companys: Maria, Montse, Helena, Oier i Huang Lin.

Tots vosaltres que m'heu ajudat en la meva tasca, gràcies! A en Karlos pels seus consells de cirurgia i de la vida en general. A la Mar, a l'Ester (i la seva idea del punt de llibre), a la Cruz, i a l'Ester pel seu somriure cada cop que ens creuàvem a l'estabulari. No puc oblidar al Juan Ramón, ni a la Rafi ni al Joan per cuidar-nos als animals. Aquells que heu col·laborat amb nosaltres, més que col·laboradors sou companys. Gràcies Sílvia per tots els coneixements i la paciència que has tingut amb mi. A l'equip de fisiologia animal, la Roser, l'Antonio, l'Humberto, l'Ancor... Al Juan Ramos-Castro i al Miguel-Ángel García-González de la Universitat Politècnica de Catalunya pel seu inestimable ajut en la posada a punt i l'anàlisi dels paràmetres cardiovasculars. Als nostres amics de la Universitat de Barcelona, en Sergi, la Mercè, l'Anna, en Toni, la Lara i la Tere; i de l'IDIBAPS, la Perla, la M^a Jesús i la Marcelina. Sense oblidar als tarragonins/reusencs d'en Toni, en Josep i en Lluís. Què haguéssim fet sense vosaltres!

Hi ha moltes persones que no han contribuït directament a la tesi, però que amb el seu suport, consells i bons moments estan presents en aquestes línies. Als meus amics de departament: Sira, Beth i David, mai oblidaré els bons moments passats. Als companys Esther, Toni, Marta, Irene, Glòria, Regina, Carme, Cristòbal, Albert, Magda, Sandra, Raquel, Bea, Rafael, Daniela, Adolf, Lydia, Sònia, Isabel, Ana, Aitor, Ignaci... A la Dolors i la Milagros per introduir-me en el món universitari que hi ha més enllà de les aules. Al Juan Carlos per totes les fotocòpies, que han estat moltes. Not forgetting my Canadian fellows: Liisa, Lucille, Dawyne, Steph, Meighen, Carmen, Cara, Patrick, Shunya, Joanna, Steve, Paula, Aarthi...

I per acabar, a la meva família i amics per ser allà en els moments difícils. A la meva mare per ser una paparra amb hisenda i l'Agaur, per les carmanyoles i per ser sempre al meu costat. A mon pare per l'esperit crític i científic que m'ha inculcat. A la Sílvia per tocar-me la pera quan necessitava distreure'm i a l'Elvis per ser... encantador! Finalment als meus amics: a en Jordi per fer-me pujar cada cop

muntanyes més altes, al Pepelu per fer-me filosofar, al Fabián per totes les aventures viscudes i a la Kate per posar-hi seny, al José per tots el comentaris sobre "ties", al Xavi pel seu positivisme contagiós, a la Helen i al Yuta per ser la meva família a Vancouver i al Luis Genís, que sempre em dius "El Doctor", ara serà veritat.

Gràcies a totes vosaltres ho he aconseguit!

Índex:

Sumari	13
Abstract	14
Abreviatures	17
Estructura de les publicacions.....	19
Pròleg	23
Introducció	29
Models d'exercici físic.....	29
Exercici, estrès i ansietat.....	35
Efectes de l'exercici sobre la cognició	38
La Variabilitat de la Freqüència Cardíaca (HRV) com a un indicador d'estrès	40
Som el que mengem.....	47
Objectius i Hipòtesis	51
Metodologia General	53
Animals	53
Cinta Ergomètrica o <i>Treadmill</i>	53
Dieta de Cafeteria	54
Disseny experimental.....	54
Variables dependents.....	55
<i>Variables Conductuals</i>	55
<i>Variables Neuroendocrines</i>	61
<i>Variables Bioquímiques</i>	62
<i>Variables Cardiovasculars</i>	62
Anàlisi Estadística.....	64
Resultats.....	67
Part 1: L'exercici moderat incrementa la conducta exploratòria i millora els paràmetres de la freqüència cardíaca en rates mascles adultes	67
Part 2A: Conseqüències fisiològiques i conductuals d'un exercici moderat a llarg termini a la cinta ergomètrica	93
<i>Publicació</i> : Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. (2012, Psychoneuroendocrinology) ...	95

Part 2B: L'exercici a llarg termini promou les estratègies d'afrontament en rates mascles i femelles.....	105
Part 3: Efectes de la dieta de cafeteria post-desllatament en rates joves: síndrome metabòlica, reducció de l'activitat i menys conducta ansiosa	121
<i>Publicació</i> : Effects of post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and less anxiety-like behaviour (2014, Plos One)	123
Discussió.....	133
Exercici en situacions d'estrès i conflicte	135
<i>Efectes de l'exercici moderat sobre la conducta emocional</i>	<i>135</i>
<i>L'exercici moderat redueix la resposta hormonal a l'estrès</i>	<i>136</i>
<i>L'exercici moderat accelera l'adquisició de l'evitació activa dos sentits (SB)</i>	<i>139</i>
<i>L'exercici afecta l'índex d'estrès relacionat amb la variabilitat cardíaca</i>	<i>145</i>
L'exercici moderat no redueix el pes	146
El grup control	147
Dieta de cafeteria	148
Diferències de sexe	150
<i>Of Mice and Men: Què podem aplicar de la nostra recerca als humans? De què ens serveix?</i>	<i>153</i>
Limitacions del treball i propostes per al futur.....	154
Conclusions.....	159
Referències	161
Annex 1 (Dades Cardiovasculars)	191
Annex 2 (Dades Neuroendocrines en femelles)	195
Annex 3 (Abstract sobre diferències individuals que predisposen a córrer).....	197

Sumari

Avui en dia l'obesitat, les malalties cardiovasculars, la demència i la depressió, entre d'altres, són algunes de les patologies més freqüents arreu del món. Està àmpliament demostrat que el sedentarisme i les dietes altes en greixos en són dues de les causes principals. Una àmplia evidència recolza la idea que l'exercici físic produeix beneficis per a la salut i podria contrarestar els efectes nocius de les dietes altes en greixos i, de fet, està molt recomanat. No obstant, les pautes d'exercici que aporten aquests beneficis no han estat investigades en profunditat. Més concretament, hi ha poca evidència sobre els efectes de l'exercici moderat (caminar de pressa), tot i que és la pauta que pot practicar més gent. En aquest context, els dos objectius principals d'aquesta tesi són: i) establir un model animal d'exercici moderat i dieta alta en greixos que permeti extrapolar recomanacions d'estil de vida en humans; i ii) analitzar els efectes de l'exercici i la dieta des d'una aproximació psicològica i fisiològica conjuntament. Usant rates sanes, mascles i femelles, joves i ancianes com a model de recerca, hem aplicat les recomanacions d'exercici moderat i regular fetes per als humans. En el nostre procediment les rates són entrenades en una cinta ergomètrica a una intensitat de 12metres/minut (m/min) durant 30min, fins a 36 setmanes, entre 4-5 dies/set.; i utilitzem rates manipulades i no-manipulades per a controlar aquest efecte. Hem vist que l'exercici redueix els nivells de colesterol, de triglicèrids i l'activitat de l'eix Hipotalàmic-Pituitari-Adrenal (HPA) en situacions d'estrès. L'exercici i la manipulació augmenten la conducta exploratòria (*Hole Board* - HB, *Elevated Plus Maze* - EPM i *Open Field* - OF). L'exercici millora l'aprenentatge associatiu en una situació estressant (*Shuttle Box* - SB) més ràpidament i amb més èxit en femelles que en mascles. Finalment, alguns paràmetres relacionats amb la variabilitat de la freqüència cardíaca (HRV), un indicador de l'estat de salut del sistema nerviós autònom, milloren després de 9 setmanes d'exercici moderat, però no s'observen canvis a més llarg termini ni en mascles ni en femelles. En l'últim experiment, hem administrat durant 8 setmanes una dieta de cafeteria (CAF) anàloga a la dieta rica en greixos d'alguns

humans i hem vist que indueix la síndrome metabòlica; però també redueix l'ansietat i incrementa l'exploració i l'activitat social en les rates. En conclusió, l'exercici moderat, regular i a llarg termini és una bona recomanació per a reduir l'estrès, fomentar les estratègies d'afrontament actiu i millorar els valors d'alguns paràmetres metabòlics, però no és la principal eina per a millorar la salut cardiovascular. En rates, la magnitud dels efectes conductuals de l'exercici a la cinta ergomètrica depèn en part de la manipulació dels animals inherent al protocol d'entrenament d'exercici, la qual actua en la mateixa direcció que l'exercici. La dieta alta en greixos empitjora la salut; no obstant, millora la resposta emotiva. Malgrat que un estil de vida actiu és un bon camí per a millorar la nostra salut, sembla que calen més de 30min/dia d'exercici moderat per obtenir beneficis en el nostre sistema cardiovascular.

Abstract

Nowadays obesity, cardiovascular disease, dementia, depression and so on are some of the most prevalent pathologies all over the world. It has been extensively reported that sedentary lifestyle and fat diet are two of the main causes. Considerable evidence supports the idea that physical exercise produces benefits for overall health and might be able to counteract the negative effects of fat diets. In fact, it is widely recommended for humans in order to prevent those diseases. However, specific recommendations on exercise regimens that confine those benefits have not been fully explored. Thus, the two main objectives of this thesis are: i) establish a model of exercise and fat diet in rats so as to be able to test those human recommendations; and ii) apply these two models in basic research to analyze the effects of exercise and diet in both psychological and physiological approaches. Using healthy, female and male, and young and older rats as a basic research model we applied the human idea of moderate but long-term exercise. Rats were trained in a treadmill at 12m/min for 30min during 36 weeks 4-5 days/week. Handled and not handled rats were used as controls to assess the effect of manipulation. Anxiety, cognition and physiological

function were assessed. Exercise reduced cholesterol and triglycerides, the activity of the HPA axis, and increased exploration (Hole Board - HB, Elevated Plus Maze - EPM and Open Field - OF) as handling did in males. Exercise also increased associative learning during a stressful situation (Shuttle Box - SB) faster and more successful in females than males. Finally, heart rate variability (HRV) was reduced by 9w, but not by long-term exercise and compared with control animals either in males or females. Eventually, we applied a cafeteria diet model (CAF) as a human fat diet for 8w and showed that cafeteria diet induced metabolic syndrome; but reduced anxiety and increased exploration and social activity in both male and female rats. In conclusion, moderate long-term exercise is a good recommendation to reduce stress, but perhaps another protocol could be even better to improve cardiovascular health. In addition, handling was showed as a good treatment. Fat diet decreased health; however, improved emotional-like behaviour. An active lifestyle is a good way to enhance our health; nevertheless, a more accurate exercise protocol and type of diet would be optimal for each case.

Abreviatures

a: anys

ACSM: American Collague of Sports
Medicine

ACTH: Hormona
Adrenocorticotròpica

BDNF: Brain Derived Neurotrophic
Factor

BPM: Batecs Per Minut

BW95: El 95% de l'ample de
l'espectre

CAF: Dieta de Cafeteria

CF: Freqüència central

CON: Control (Grup)

cort. (o B): Corticosterona

CRF: Factor Alliberador de
Corticotropina

dieta std: Dieta Estàndard, pinso

ECG: Electrocardiograma

EPM: Elevated Plus Maze

FC: Freqüència Cardíaca

FST: Forced Swimming Test

HB: Hole Board

HCR: High Capacity Runners

HF: Alta Freqüència

HPA: Eix Hipotalàmic-Pituitari-
Adrenal

HRV (o VFC): Variabilitat de la
Freqüència Cardíaca

LCR: Low Capacity Runners

LDB: Light Dark Box

LF: Baixa Freqüència

m/min: metres/minut

mA: miliampers

ms: milisegons

MWM: Morris Water Maze

OF: Open Field

PVN: Nucli Paraventricular de
l'hipotàlem

RHA: Roman High Avoidance rats

RLA: Roman Low Avoidance rats

RMSSD: Arrel quadrada del valor
mig de la suma de les diferències al
quadrat de tots els RR successius

RR: Interval R-R

SAP: Avaluació del risc en l'EPM

SB: Shuttle Box

SDRR: Desviació Estàndard de RR

sec. (o s.): segons

SED: Sedentari (Grup)

set.: setmana/es

SMA: Eix Simpàtic-Adrenomedular

SNA: Sistema Nerviós Autònom

SNC: Sistema Nerviós Central

SNP: Sistema Nerviós Parasimpàtic

SNS: Sistema Nerviós Simpàtic

ST: Social Test

TM: Treadmill (Grup)

WR: Wheel Running

Estructura de les publicacions

La tesi doctoral titulada "Exercici físic i dieta en models animals: efectes emocionals, fisiològics i cognitius" es presenta sota el format de compendi de publicacions. Ha estat realitzada entre el setembre de 2010 i el juny de 2014, en base als coneixements que el doctorant va adquirir durant el Pràcticum de la Llicenciatura en Psicologia, durant el Màster de Recerca en Psicologia de l'Esport i de l'Activitat Física de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) i durant el treball fet al laboratori en relació als projectes de recerca que s'han desenvolupat durant aquest període. Els experiments i les publicacions que es presentaran s'emmarquen en els següents projectes finançats (ordre cronològic):

- Ministerio de Educación y Ciencia: PSI 2008-06417-C03-01, 02, 03; SAF2009-01175; SAF2009-13093.
- Instituto de Salud Carlos III: DPS2008-06998-C01, C02; RD06/0001/0015.
- Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud.
- Generalitat de Catalunya: SGR2009-16, 2009/SGR00893, 2009/SGR-0535.
- ACC10: TECRD12-1-0005.
- Ministerio de Economía y Competitividad: PSI 2011-29807-C02-01, 02.

El doctorant, Jaume Ferrer Lalanza, ha rebut entre febrer de 2011 i gener de 2014 una beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2011) que culmina amb la presentació d'aquest treball de tesi. Durant aquest període també ha gaudit d'altres ajuts de la Generalitat de Catalunya com una borsa de viatge per 6 mesos a la University of British Columbia (Vancouver, Canadà) sota la tutela de la Dra. Liisa A.M. Galea (BE DGR 2012), i un ajut d'innovació docent durant el curs 2013/14 (AAD 2014) a la Facultat de Psicologia de la UAB; també un ajut per assistir al *workshop*: "Animal Models of Neurodegeneration and

Behavioural Tests for Assessment of Motor and Cognitive Function” de l’“Hellenic Pasteur Institute” (Atenes, Grècia).

Les **publicacions incloses en la tesi** per compendi són (ordenades per temàtica):

Part 2A:

Lalanza, J.F.; Sanchez-Roige, S.; Gagliano, H.; Fuentes, S.; Bayod, S.; Camins, A.; Pallàs, M.; Armario, A.; Escorihuela, R.M. (2012). Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 1745-1754. IF 2011: 5.809

Part 3:

Lalanza, J.F.; Caimari, A.; del Bas, J.M.; Torregrossa, D.; Cigarroa, I.; Pallàs M.; Capdevila, Ll.; Arola, L.; Escorihuela, R.M. (2014). Effects of post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and less anxiety-like behaviour. *Plos One*, 9(1), e85049. IF 2012: 3.730.

Manuscrits no publicats:

Part 1: L'exercici moderat incrementa la conducta exploratòria i millora els paràmetres de la freqüència cardíaca en rates mascles adultes

Part 2B: L'exercici a llarg termini promou les estratègies d'afrontament en rates mascles i femelles

Altres dades no sotmeses a publicació incloses en la Tesi són:

Annex 1: Dades cardiovasculars

Annex 2: Dades neuroendocrines en femelles

Annex 3: Dades sobre diferències individuals que predisposen a córrer.

Altres publicacions relacionades amb aquesta tesi i que formen part d'una altra tesi doctoral són:

- Bayod, S., del Valle, J., Canudas, A.M., **Lalanza, J.F.**, Sanchez-Roige, S., Camins, A., Escorihuela, R.M., Pallàs, M. (2011) Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *Journal of Applied Physiology*, 111(5), 1380-1390.
- Bayod, S., del Valle, J., **Lalanza, J.F.**, Sanchez-Roige, S., de Luxan-Delgado, B., Coto-Montes, A., Canudas, A. M., Camins, A., Escorihuela, R.M., Pallas, M. (2012). Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues. *Experimental Gerontology*, 47(12), 925-935.
- Bayod, S., Menella, I., Sanchez-Roige, S., **Lalanza, J.F.**, Escorihuela, R.M., Camins A., Pallàs, M., Canudas, A.M. (2014). Wnt pathway regulation by long-term moderate exercise in rat hippocampus. *Brain Research*, 1543, 38-48.
- Bayod, S.; del Valle, J.; Pelegri, C.; Vilaplana, J.; Canudas, A.M.; Camins, A.; Jiménez, A.; Sanchez-Roige, S.; **Lalanza, J.F.**; Escorihuela, R.M.; Pallàs, M. Macroautophagic process was differentially modulated by long-term moderate exercise in rat brain and peripheral tissues. *Journal of Physiology and Pharmacology* (en premsa).

Pròleg

La societat està canviant. No és cap secret que cada cop vivim més anys i amb més comoditats. Podem tenir una vida estressant, amb moltes preocupacions i mals de cap, però plena de dreceres que ens la fan més fàcil. Per menjar n'hi ha prou amb escalfar qualsevol plat precuinat al microones, treballem asseguts davant de pantalles d'ordinador i ens desplaçem en cotxe o en metro. Sense cap mena de dubte, la majoria de les persones no canviarien aquesta vida per la dels nostres besavis. No obstant, aquesta evolució tecnològica ha comportat uns canvis en l'estil de vida de les persones; uns hàbits poc o gens saludables que hem de replantejar-nos per poder gaudir d'una vida llarga, sana i plaent. La pràctica d'exercici regular d'intensitat moderada (córrer poc a poc o caminar de pressa) és una de les pautes més recomanades, però hi ha pocs estudis que avaluin amb detall els beneficis d'aquesta pràctica.

- "Per què useu rates?"

Segurament és la pregunta que he hagut de respondre més vegades durant aquest període de predoctorat. I no és fàcil de contestar. A més, de vegades ha fet replantejar el propi projecte: "és veritat, per què fem servir rates?" La recerca amb models animals permet aïllar les variables i incrementar la validesa interna, però disminueix la capacitat de generalitzar els resultats (Daffner, 2010). Els animals només viuen per rebre els tractaments els quals, en el nostre cas, consisteixen essencialment en córrer i menjar diferents tipus de dieta. Prenent com a referència l'anàlisi teòrica sobre els models animals i les valideses experimentals descrites per Paul Willner (Willner, 1991), el model animal presentat en aquesta tesi és el que s'anomena una simulació, atès que es pretén caracteritzar una (o diverses) conducta humana i avaluar-ne els seus efectes. En concret, nosaltres seguim una caracterització "top-down", perquè apliquem una simulació animal per estudiar amb més detall una conducta/paradigma que ja es dona en

humans (Gosling, 2001). Les altres dues tipologies són: i) test de cribratge, per detectar efectes farmacològics; ii) assaigs conductuals, per estudiar les bases biològiques d'una determinada conducta.

Les simulacions haurien de complir tres tipus de validació: i) predictiva: el rendiment en el test prediu el rendiment en la condició que s'està modelant; ii) aparent: el model i la conducta humana a modelar presenten similituds fenomenològiques; iii) de constructe: el model té un suport teòric consistent. Encara que les simulacions mostrin una validesa acceptable, no es pot garantir plenament l'aplicació dels resultats als humans, atès que la validesa és difícil de mesurar objectivament. Ara bé, abans de continuar, i malgrat que el nostre model compleix aquests tres criteris teòrics de validesa, ens hauríem de preguntar: ¿podem modular estats mentals com la depressió, l'estrès, l'ansietat o la memòria en animals? Panksepp (2011) en un excel·lent assaig argumenta a favor de les emocions en els animals a través de l'evidència neurocientífica. Principalment, demostra que tots els mamífers tenen les xarxes emocionals cerebrals concentrades en regions homòlogues a les dels humans, que s'activen quan l'animal està emocionalment excitat. Això facilita a la neurociència per estudiar els diferents estats emocionals i almenys llurs bases biològiques mitjançant models animals (assaigs conductuals, seguint la terminologia de Willner). De fet, l'evidència científica ha demostrat que, des d'investigacions amb ratolins i rates (Bartal, Decety, Mason, 2011; Berridge i Robinson, 2003; Langford, Bailey, Chanda, Clarke, Drummond, Echols, *et al.*, 2010), fins a estudis amb primats (Call i Tomasello, 2008; de Waal, 2011) o amb cetacis (Marino, Connor, Fordyce, Herman, Hof, Lefebvre, *et al.*, 2007), els mamífers senten i expressen emocions. Però, què ocorre amb la conducta? Hi ha algunes maneres de "preguntar" als animals sobre llurs emocions i capacitats intel·lectuals. Els tests de conducta poden ser una bona manera d'inferir els estats interns i emocions dels nostres animals de laboratori (Archer, 1973; Homberg, 2013). Finalment, Paul i col·laboradors (2005) exposen les diferents metodologies a l'abast dels investigadors per poder simular

emocions humanes i llurs conseqüències, com ara processos d'avaluació, atenció, memòria o biaixos de judici en models animals; encara que aquest últim és un tema polèmic i amb opinions en contra (Premack 2007, LeDoux 2012).

Si partim de la teoria de l'evolució (Darwin, 1859), les característiques i les conductes dels organismes es mantenen perquè aporten un avantatge. Actualment, córrer, a més a més de ser una resposta bàsica davant d'un estímul amenaçador o perillós, com ara perdre el tren, és una forma primària d'exercici i d'oci; però al mateix temps la conducta de córrer podria ser tant antiga com el gènere *Homo*, i haver contribuït a la fisonomia actual humana i, fins i tot, a l'encefalització (Bramble i Lieberman, 2004; Mattson, 2012). De fet, recentment s'ha provat que l'increment de conductes locomotores produïen cervells més grans al llarg de l'evolució, especialment en mamífers (Raichlen i Gordon, 2011). Concretament, els autors d'aquesta troballa van correlacionar la massa cerebral (en grams) amb la capacitat aeròbica (VO_{2Max} en ml/min) de 29 espècies de mamífers no humans. Trobaren una correlació positiva entre aquestes dues variables, sent els mamífers que tenen els cervells més grans, els més actius. Els autors proposen una explicació a la qual hi tornarem més endavant: l'exercici incrementa l'angiogènesi, la formació de vasos sanguinis, proporcionant un millor aprofitament dels factors neurotròfics (com el BDNF) als circuits neurals. Per tant, l'associació entre exercici i massa cerebral podria ser deguda a un increment de neurotrofines i factors de creixement en el torrent sanguini cerebral. No obstant, aquesta teoria de moment és complementària i s'ha de relacionar amb altres teories més provades per explicar l'evolució cognitiva de l'*Homo Sapiens*, com ara pertànyer a grans grups socials o referents a l'alimentació basada en menjar fruita i carn en lloc de fulles únicament (Allman, 2003). Per exemple, sembla que el bipedisme va permetre als nostres avantpassats recórrer grans distàncies i instal·lar-se en nous hàbitats (Bramble i Lieberman, 2004), tenir les mans lliures per usar eines i, més endavant, millorar la dieta (Boyd i Silk, 2004), caçant animals més grans o cuinant la carn amb el

domini del foc (Gibbons, 2007). No en va, a partir de l'*Homo Ergaster i Erectus* les grans migracions intercontinentals dels nostres antecessors van ser una constant, sortint de l'Àfrica per buscar nous nínxols ecològics (Finlayson, 2005). Aquestes migracions van afavorir l'aparició de diverses espècies d'homínids des del primer europeu, l'*Homo Antecessor* (Carbonell, Bermúdez de Castro, Parés, Pérez-González, Cuenca-Bescós, Ollé, et al., 2008), passant pel darrer *Neandertal* (Arsuaga, 1999) i el rar *Homo Florensis* (Brown, Sutikna, Morwood, Soejono, Jatmiko, Saptomo, et al., 2004), fins a l'hegemonia de l'*Homo Sapiens*. Per tant, els canvis en l'activitat física i en la dieta es poden relacionar amb els canvis evolutius que hem experimentat com a espècie, incloent: augment del volum cerebral, bipedisme, ús d'eines, menjar carn (Pickering i Bunn, 2007), establiment de societats caçadores i recolectores, etc., des del primerenc *Australopithecus* al modern *Sapiens* (Malina i Little, 2008).

Un altre gran problema de l'estil de vida actual és la manca d'una dieta sana. Alguns consideren que l'obesitat i la diabetis són la nova epidèmia del segle XXI (James, 2008). El ritme frenètic i l'estil de vida actual han afavorit el consum de menjar ràpid, aliments poc nutritius, saborosos i hipercalòrics elaborats amb un alt contingut de sucres i greixos, en detriment de dietes més sanes riques en llegums, fruita i verdures. Aquest nou model alimentari es coneix com a "Dieta de Cafeteria" (CAF) i als rosegadors també els agrada.

¿Quan i perquè va aparèixer el sedentarisme i el menjar ràpid a les societats modernes? Probablement, la causa l'hem de buscar en el desenvolupament socioeconòmic que ha eliminat el treball físic (Archer i Blair, 2011). Aquests autors descriviren l'evolució del treball i la relació amb el sedentarisme i les malalties cardiovasculars en detall. El primer gran canvi econòmic va ocórrer junt amb l'aparició del conreu entre el 10.000 i el 5.000 ac, quan el desenvolupament de l'agricultura facilità la transició des de la caça i la recol·lecció a un sistema de vida menys costós: el que es coneix com a "revolució del neolític" (Weisdorf, 2005).

El segon canvi va ocórrer als inicis del segle XX amb "la revolució industrial" associada a la mecanització de la indústria i l'agricultura. Va ser aleshores que la ciència i les institucions públiques començaren a preguntar-se sobre l'increment de les malalties cardiovasculars. I el tercer canvi es va donar fa només dues generacions amb l'inici de l'era digital. Tots els avanços tecnològics han creat una incongruència entre les demandes ambientals i la nostra genètica, adaptada durant milers d'anys a un ambient que fins fa menys de 150 anys requeria una elevada dosi d'activitat física (O'Keefe, Vogel, Lavie, Cordain, 2011).

Introducció

Models d'exercici físic

A qualsevol avinguda arbrada de qualsevol ciutat del món és fàcil creuar-te amb un reguitzell de persones fent alguna mena d'activitat física. N'hi ha que corren, altres pedalegen, alguns a un ritme suau, altres elevat; fins i tot n'hi ha que aprofiten els bancs per fer estiraments o flexions. D'estils i maneres de practicar esport n'hi ha gairebé tants com persones ocupant les voreres i els parcs un cop acabada la jornada laboral. Aquest és un petit exemple, però podríem parlar dels gimnasos o dels poliesportius i el resultat seria semblant. Però, ¿quina és la millor manera de practicar esport per obtenir el màxim nombre de beneficis? ¿I en quins diferents tipus de paràmetres psicològics, conductuals, fisiològics, bioquímics i/o metabòlics podem observar els beneficis de pautes concretes d'entrenament?

L'American Collague of Sports Medicine (ACSM), reconeguda autoritat mundial en l'àmbit de l'activitat física i la salut, va establir per primer cop al 1995 que s'hauria de fer un exercici aeròbic moderat gairebé diari d'almenys 30 minuts. Fins aleshores, les recomanacions anaven encaminades a protocols d'exercici de caire agut i intens: 3 dies per setmana, entre 20 i 60 minuts per dia, a una intensitat del 60-90% de la nostra capacitat cardiovascular màxima (Pate, Pratt, Blair, Haskell, Macera, Bouchard, *et al.*, 1995). Recentment, l'ACSM ha revisat les recomanacions establertes al 1995 tot proposant pautes específiques i diferents per a persones adultes i per a la gent gran. Respecte als adults (18 a 65 anys), l'ACSM recomana un exercici moderat de mínim 30 minuts, almenys 5 dies per setmana o un exercici vigorós de mínim 20 minuts 3 dies per setmana. En tots dos casos es fa referència a l'exercici aeròbic i es poden combinar sessions d'intensitat moderada amb sessions d'intensitat vigorosa. Finalment, també es recomanen exercicis anaeròbics, encara que no són tan rellevants per la salut com els aeròbics (Haskell, Lee, Pate, Powell, Blair, Franklin, *et al.*, 2007). Pel

que fa a les persones grans, les recomanacions són similars a les dels adults, però es centren en intensitats moderades i en la combinació d'exercicis aeròbics amb exercicis anaeròbics i de flexibilitat (Nelson, Rajeski, Blair, Duncan, Judge, King, *et al.*, 2007). Més recentment, altres autors fan indicacions basades més en la promoció d'un estil de vida actiu i no tant en la intensitat de l'exercici (Chodzko-Zajko, Proctor, Singh, Minson, Nigg, Salem, *et al.*, 2009). Aquestes recomanacions es basen en estudis on es veu que les persones més longeves i amb millor qualitat de vida són aquelles que mantenen al llarg de tota la seva vida un estil de vida actiu (Gremeaux, Gayda, Lepers, Sosner, Jeneau, Nigam, 2012).

En aquesta tesi modelem un procediment d'exercici moderat en rosegadors de laboratori, basat en la pràctica d'exercici aeròbic, 5 dies per setmana, mínim 30 minuts per sessió. Així, modelem l'exercici aeròbic d'intensitat moderada en relació a les pautes recomenades a les persones.

En rosegadors de laboratori es fan servir preferentment dos procediments d'exercici: l'un es basa en un model d'exercici voluntari amb rodes d'activitat (ho anomenarem *Wheel Running*, WR) i l'altre es basa en un model d'exercici forçat a la cinta ergomètrica (*Treadmill*) (Voss, Vivar, Kramer, van Praag, 2013). Les principals característiques dels dos procediments es resumeixen a la Taula 1.

Sobre el tipus, un estudi comparatiu mostra que un exercici forçat d'alta intensitat a la cinta ergomètrica (30m/min, 30min per dia amb motivació elèctrica) durant 3 setmanes va sobre-activar el funcionament basal de l'eix HPA, però va reduir el risc d'infart de miocardi comparat amb les rates d'exercici voluntari a la roda d'activitat (Hayes, Sprague, Guo, Davis, Friedman, Kumar, *et al.*, 2008). En un altre estudi fet amb ratolins, ambdós protocols milloraren la memòria en una tasca d'orientació espacial (el *Morris Water Maze*, MWM) i la neurogènesis a l'hipocamp, però només l'exercici a la cinta ergomètrica

millorà la memòria en una tasca d'evitació passiva i la neurogènesis a l'amígdala (Liu, Chen, Wu, Kuo, Yu, Lu, *et al.*, 2009).

Taula 1: Principals característiques dels dos models d'exercici en rosegadors, voluntari (*wheel running*) i forçat (*treadmill*) (basada en: Dishman, *et al.*, 2006; Greenwood, *et al.*, 2013; Leasure i Jones, 2008; Voss, *et al.*, 2013)

Paràmetre	Wheel Running	Treadmill
Tipus	Voluntari.	Forçat.
Controlabilitat	Cada animal fa la quantitat i intensitat d'exercici que vol.	Tots els animals del mateix grup experimental fan la mateixa quantitat d'exercici a la intensitat que els investigadors determinen.
Característiques d'estabulació	Normalment en gàbies individuals per poder quantificar l'exercici.	Aïllats o en grup.
Nivell d'estrès	Principalment fisiològic, degut a l'exercici <i>per ser</i> .	Fisiològic i psicològic en protocols aguts, d'elevada intensitat i/o amb electroshock. En alguns estudis es "motiva" als animals a mantenir-se damunt la cinta mitjançant l'administració de descàrregues elèctriques quan el subjecte surt de la cinta i s'atura.
Relació amb les conductes humanes	Llibertat per córrer o no, i a la intensitat desitjada en cada moment.	L'exercici està regulat i es duu a terme en llocs especials, com els gimnasos. Amb aquests procediments controlats per l'experimentador, l'entrenament a la cinta ergomètrica és més regular al llarg dels dies.
Usat principalment en...	Ratolins.	Rates.
Usat principalment per estudiar...	Mecanismes relacionats amb aprenentatge, memòria, plasticitat i neurogènesi.	Efectes en múscul, sistema motor, sobrecàrregues d'entrenament, sistema cardiovascular, aprenentatge, memòria, emocions i estrès.

Com que la cinta ergomètrica i la roda d'activitat són aparells diferents i com que s'ha qüestionat que aquesta característica d'exercici voluntari i forçat pot estar implicada en els diferents beneficis que s'observen en un i altre model, alguns autors han ideat procediments per poder comparar l'exercici voluntari i forçat en el mateix aparell. Per exemple, l'exercici voluntari en rodes d'activitat va millorar l'aprenentatge en una tasca d'evitació condicionada al gust, però no s'observà el mateix efecte positiu en animals entrenats de manera forçada a les rodes d'activitat (Forristall, Hookey, Grant, 2007). Una hora d'exercici voluntari, però no l'exercici forçat, va reduir els nivells de CRF (factor alliberador de corticotropina, *veure el següent punt*) al nucli paraventricular de l'hipotàlem (PVN) (Yanagita, Amemiya, Suzuki, Kita, 2007). Leasure i Jones (2008) van comparar l'exercici voluntari i el forçat en rodes d'activitat en un excel·lent article. L'originalitat de la investigació consistia en limitar la distància recorreguda per evitar les grans diferències que normalment s'obtenen entre tots dos models, de manera que els animals dels diferents grups van seguir protocols d'exercici molt similars en quant a intensitat, distància recorreguda i condicions d'estabulació (totes les rates estaven estabulades en grups de 3). L'exercici forçat va disminuir l'exploració a l'*Open Field* (OF); la neurogènesis al gir dentat va ser més alta en tots dos grups d'exercici en comparació amb el grup sedentari i, fins i tot, més alta en el grup forçat comparat amb el voluntari; mentre que no es varen trobar diferències en el MWM entre els 3 grups. Més recentment, Greenwood *et al.* (2013) han fet servir el mateix disseny tot i afegint un grup corredor a la cinta ergomètrica. Els autors entrenaren als animals durant 6 setmanes en cadascuna de les modalitats. Obtingueren que la cinta ergomètrica augmentà la latència de resposta d'escapada i el temps de petrificació (*freezing*) en un paradigma d'evitació activa en dos sentits (*Shuttle Box*, SB), en comparació amb la roda d'activitat forçada o voluntària.

Els principals avantatges de l'exercici voluntari (Taula 1) són que no cal motivar als animals a córrer fent servir estimulació aversiva, i que

l'animal pot escollir la intensitat a la que es troba més còmode i la durada dels episodis d'activitat (Novak, Burghardt, Levine, 2012). No obstant, els principals inconvenients són que no es pot controlar *a priori* la quantitat d'exercici que fa cada animal, la qual cosa origina una mostra molt heterogènia d'animals corredors i es fa molt difícil esbrinar quines "dosis" d'exercici poden associar-se a beneficis concrets. Per exemple, degut a l'alta variabilitat del grup d'exercici voluntari amb roda d'activitat, García-Capdevila i col·laboradors (2009) van aplicar una anàlisi *post hoc* classificant a les rates corredores en: poc, força i molt corredores. Quelcom similar ha ocorregut en altres investigacions (Burghardt, Pasumarthi, Wilson, Fadel, 2006; Diaz, Siontas, Mendoza, Arvanitogiannis, 2013; Narath, Skalicky, Viidik, 2001), deguda a l'alta heterogeneïtat en l'exercici que fan els animals. De fet, s'ha suggerit que els estudis sobre exercici físic haurien de ser molt més rigorosos amb la quantitat d'exercici administrat, aplicant una metodologia similar als assaigs farmacològics (Hoydal, Wisloff, Kemi, Ellingsen, 2007), i això només és possible amb la cinta ergomètrica.

El segon problema que hi ha amb el model d'exercici voluntari és que exigeix aïllar als animals si es vol: i) quantificar l'exercici que fan, ii) assegurar que tots els animals de la gàbia fan exercici, o iii) evitar baralles per la roda d'activitat i que només l'animal dominant corri. Una possible solució seria col·locar tantes rodes com animals, però això tampoc permet controlar amb exactitud el nombre de voltes que fa en concret cada animal. Una alternativa és mantenir als animals en grup i col·locar-los individualment a les gàbies amb la roda només durant un període de temps determinat (Sanchez-Roige, *et al.*, en revisió). Se sap que l'aïllament en animals socials com els rosegadors pot incrementar l'estrès i l'ansietat (Hermes, Li, Duman, Duman, 2011; Valzelli, 1973; Weiss, Pryce, Jongen-Rêlo, Nanz-Bahr, Feldon, 2004), l'aparició de conductes relacionades amb la depressió i l'esquizofrènia (Fone i Porkess, 2008), pot disminuir la capacitat cognitiva (Bianchi, Fone, Azmi, Heidbreder, Hagan, Marsden, 2006), empitjorar la salut cardiovascular (Grippe, Lamb, Carter, Porges, 2007) o alterar els

efectes de l'exercici *per se* (Leasure i Decker, 2009; Stranahan, Khalil, Gould, 2006).

En referència a l'exercici forçat, s'ha trobat que pot induir respostes d'estrès conductual (Greenwood, *et al.*, 2013) i neuroendocrines quan s'utilitzen procediments de motivació aversius (Brown, Johnson, Armstrong, Lynch, Caruso, Ehlers, *et al.*, 2007). És rellevant tenir en compte la manipulació (o *handling*) associada al procediment de la cinta ergomètrica alhora d'estudiar els efectes de l'exercici. Per citar un parell d'exemples, l'estudi de Salim i col·laboradors (2010) va descobrir que l'exercici a la cinta ergomètrica era capaç de contrarestar els efectes negatius de l'estrès oxidatiu a l'*Elevated Plus Maze* (EPM) i a la *Light Dark Box* (LDB), però el grup control, no era exposat a la cinta ni rebia la mateixa manipulació. Albeck i col·laboradors (2006) descobriren que un entrenament suau a la cinta ergomètrica millorava la cognició (mesurada amb el MWM, latència i distància) en rates mascles velles, però igual que en el cas anterior, usaren un grup control poc adequat. Analitzant aquells estudis que fan servir un disseny similar al nostre, controlant tan la manipulació com el sedentarisme, trobem resultats significatius deguts a la manipulació i no pas a l'exercici. Per exemple, O'Callaghan, Griffin i Kelly (2009) aplicaren un entrenament moderadament intens (16,8m/min durant 30min amb electroshock motivant) durant 8 mesos a la cinta ergomètrica comparat amb un grup control manipulat (electroshock inclós) igual que l'entrenat. Van descobrir que tan l'exercici com la manipulació del grup control milloraren la memòria espacial i incrementaren el BDNF al gir dentat en comparació al control no-manipulat; en canvi, Burghardt *et al.* (2004) no van trobar cap diferència en conducta ansiosa entre el grup que havia fet exercici i el grup manipulat.

Finalment, pel que fa als efectes de l'exercici a llarg termini, s'ha trobat que 3 a 4 mesos a la cinta ergomètrica milloren l'orientació espacial al MWM en comparació al control manipulat (Asl, Sheikhzade, Torchi, Roshangar, Khamnei, 2008; O'Callaghan, *et al.*, 2009). Però si el

període d'exercici és més llarg (6-9 mesos) els efectes no són tant robustos.

En conclusió, el model més adequat i que s'adapta millor als nostres objectius, per tal de poder garantir la mateixa dosi d'exercici en tots els animals, és la cinta ergomètrica, utilitzant una intensitat suau-moderada sense electroshock motivador.

Exercici, estrès i ansietat

Al 1936, Hans Selye va definir l'estrès com a qualsevol estímul capaç d'alterar l'homeòstasi (un exemple d'estímul pot ser l'exposició al fred) (Selye, 1936). Actualment, l'estrès es defineix com: "la resposta de l'organisme, evolucionada en el curs de la filogènia, enfront agents que físicament o simbòlica posen en perill la seva integritat" (Vigas, 1980, a Armario, 2006). Durant l'estrès, els eixos simpàtic-adrenomedular (SMA) i hipotalàmic-pituitari-adrenal (HPA) (Figura 1) són els principals sistemes implicats en mantenir o restablir l'homeòstasi (Ulrich-Lai i Herman, 2009). L'eix HPA incrementa els nivells plasmàtics d'ACTH i glucocorticoides, mentre l'eix SMA incrementa els nivells de catecolamines i determina les interaccions amb altres sistemes vegetatius com el cardiovascular (Armario, 2006). Els nervis simpàtics innerven a les glàndules suprerenals directament i, en resposta a l'estrès, l'activació simpàtica augmenta la secreció de les catecolamines suprerenals, principalment la noradrenalina i l'adrenalina (Kvetnansky, Sabban i Palkovits, 2009). L'eix HPA juga un paper vital en l'adaptació de l'organisme en els desequilibris homeostàtics i la seva activació culmina amb la secreció dels glucocorticoides (Herman, Figuereido, Mueller, Ulrich-Lai, Ostrander, Choi, *et al.*, 2003). L'activació de l'eix comença al nucli paraventricular (PVN) de l'hipotàlem (Carrasco i van den Kar, 2003), on, principalment, se segreguen dues hormones a través de l'eminència mediana. Aquestes hormones són el factor alliberador de corticotropina (CRF or CRH), encarregat d'estimular tan la síntesi com la lliberació de l'hormona adrenocorticotròpica (ACTH); i la arginina-vasopressina (AVP) que en tàndem amb el CRF estimulen

l'ACTH. El següent nucli important és la pituïtària anterior. Allí, el CRF actua en les cèl·lules corticotropes per segregar l'ACTH. El nivell màxim de segregació d'ACTH acostuma a ocórrer al cap de 15-20min des de l'inici d'aparició de l'estressor (García, Martí, Vallès, Dal-Zotto, Armario, 2000). Els nivells circulants d'aquesta hormona al torrent sanguini actuen a l'escorça de les glàndules suprarenals, estimulants la síntesi i la segregació de glucocorticoides, principalment corticosterona (cort.) en rates i cortisol en humans (Armario, Daviu, Muñoz-Abellán, Rabasa, Fuentes, Belda, *et al.*, 2012). Els glucocorticoides són els efectors finals de l'eix HPA i duren entre 30 i 60 minuts. En condicions normals, els nivells de glucocorticoides basals segueixen un marcat ritme circadiari, amb nivells més elevats durant el període d'activitat. En les rates, els nivells de corticosterona al matí són més baixos que al vespre i a la nit, atès que són animals nocturns (Armario, 2006). Per aquesta raó, en estudis com el que plantajarem posteriorment, és adequat realitzar dues mesures basals, una al matí i l'altra al vespre.

En general, hi ha evidència que l'entrenament a la cinta ergomètrica augmenta l'activitat de l'eix HPA (Brown, *et al.*, 2007; Kawashima, Saito, Yoshizato, Fujikawa, Sato, McEwen, *et al.*, 2004; Soya, Nakamura, Deocaris, Kimpara, Iimura, Fujikawa, *et al.*, 2007); i, també, hi ha antecedents sobre una disminució en els nivells basals i després d'una situació aversiva en rates entrenades (Tharp i Buuck, 1974; Watanabe, Morimoto, Sakata, Tan, Morimoto, Murakami, 1992). Les discrepàncies trobades es poden explicar, com ja hem anat apuntant, degut al diferent tipus de protocol utilitzat. Com en el cas de la conducta, en què protocols aguts redueixen l'exploració en entorns nous (mesurada per inferir ansietat en rosegadors) (Mello, Benetti, Cammarota, Izquierdo, 2008); a nivell neuroendocrí ocorre quelcom semblant. Protocols intensos sobre-activen l'eix HPA en comparació a intensitats més moderades (Chennaoui, Merino, Lesage, Drogou, Guezennec, 2002). Els treballs citats anteriorment que demostraren un increment de l'activitat de l'eix HPA, aplicaren un protocol d'entre 25 a 30m/min; mentre que els treballs on es redueix l'activitat de l'eix HPA

aplicaren un protocol d'entre 15m/min a 26m/min (encara que els seguim considerant força alts). Aquests resultats es poden entendre pels canvis fisiològics que implica l'exercici físic, que a la llarga modifiquen l'organisme ("adaptació fisiològica"), generant els beneficis que estem comentat en aquesta tesi. No obstant, a curt termini i/o a elevades intensitats l'organisme pot no adaptar-se, superant els seus límits pre-establerts i provocant estrès fisiològic (Guillet i Genéty, 1978; Rojo, 1997). Les adaptacions "centrals" són aquelles que incrementen la capacitat aeròbica (VO_{2max}) i un major volum de sang que el cor pot bombejar; mentre que les adaptacions "perifèriques" fan referència a una major capacitat muscular, derivada d'una major capillarització, d'un augment de les mitocòndries muscular, del metabolisme adipós, etc. (Woolf-May, 2008).

Sobre els antecedents de com l'exercici modifica la conducta ansiosa en rates; s'ha demostrat que almenys 4 setmanes d'exercici voluntari a la roda d'activitat disminueixen l'ansietat, mesurada en tests d'interacció social i en l'*Elevated Plus Maze* (EPM) (Lapmanee, Charoenphandhu, Charoenphandhu, 2013; Greenwood, Loughridge, Sadaoui, Christianson, Fleshner, 2012). Fulk i col·laboradors (2004) després d'entrenar rates mascles durant 10 setmanes a la cinta ergomètrica (20m/min per 20min) trobaren que les rates corredores, comparades amb les rates control manipulades, mostraren menys ansietat a l'EPM i a l'OF. Per la seva banda, Nguyen i col·laboradors (2013) entrenaren als animals durant 5 setmanes a 10m/min (30min/dia i amb una inclinació de la cinta del 5%), sense trobar efectes a l'EPM en comparació amb el grup control manipulats.

Per tant, tenint en compte els resultats observats en cinta ergomètrica en rates, i d'acord amb les recomanacions fetes pels humans, sembla que un tipus d'exercici adequat hauria de tenir una intensitat moderada, com ara 12m/min, sense utilitzar electroshock "motivador" i sense inclinació de la cinta ergomètrica (0% de pendent).

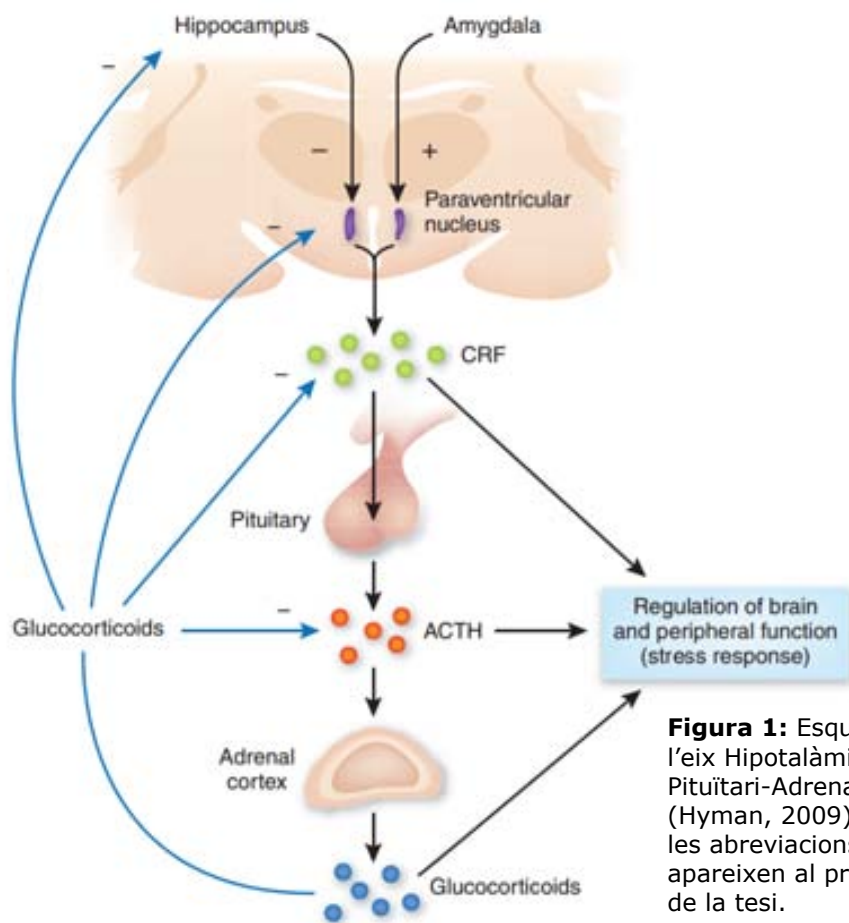


Figura 1: Esquema de l'eix Hipotalàmic-Pituïtari-Adrenal (HPA) (Hyman, 2009). Totes les abreviacions apareixen al principi de la tesi.

Efectes de l'exercici sobre la cognició

Al 1900 hi havia un 9,2% de població major de 60 anys, al 2013 hem passat al 11,7% i al 2050 es preveu que serà del 21,1%, mentre que en els països més desenvolupats serà del 32% (United Nations, 2013). Si a més, afegim una incidència d'Alzheimer del 0,3-4,4% en els menors de 70 anys i fins a un 25,8% entre la població de 80-85 anys (Bermejo-Pareja, Benito-León, Vega, Medrano, Román, 2008), és fàcil entendre que la gran part dels recursos en recerca es destinin a investigar tipus d'intervencions encaminades a estudiar i intentar prevenir les problemàtiques de salut i socials relacionades amb la qualitat de vida de la gent gran (per a una revisió, Archer, 2011). En

dos estudis epidemiològics que ja es poden considerar clàssics, es va trobar que un estil de vida actiu basat en caminar diàriament disminueix el risc de demència (en un 20%) en població anciana tan en dones (Weuve, Kang, Manson, Breteler, Ware, Grodstein, 2004) com en homes (Abbott, White, Ross, Masaki, Curb, Petrovich, 2004). Altres estudis més recents han arribat a conclusions similars (Elwood, Galante, Pickering, Palmer, Bayer, Ben-Shlomo, *et al.*, 2013). Encara que també hi ha evidència en contra (Etnier, *et al.*, 2006). Hi ha estudis experimentals que demostren els beneficis cognitius de l'exercici aeròbic moderat tan en nens (Hillman, Pontifex, Raine, Castelli, Hall, Kramer, 2009; per a una revisió: Rasmussen i Laumann, 2013), com en adults (Hopkins, Davis, Vantighem, Whalen, Bucci, 2012; per a una revisió: Lambourne i Tomporowski, 2010) i en persones grans (Voelcker-Rehage, Godde, Staudinger, 2012; per a una revisió: Colcombe i Kramer, 2003).

Fins ara hem parlat de població sana, però en relació a la prevenció de malalties neurodegeneratives associades a l'envelliment com ara l'Alzheimer (Kaliman, Párrizas, Lanza, Camins, Escorihuela, Pallàs, 2011) (Figura 16), estudis en humans han trobat que les persones grans que porten un estil de vida actiu, amb activitat física regular, tenen menys probabilitats de patir demència cognitiva (Ahlskog, Geda, Graff-Radford, Petersen, 2011; Rao, Chou, Bursley, Smulofsky, Jezequel, 2014). La recerca amb models animals utilitza generalment models transgènics, sent els ratolins 3xTg-AD un dels models més complets que expressen les plaques de β -Amyloides i la proteïna Tau (Oddo, Caccamo, Kitazawa, Tseng, LaFerla, 2003; per a una revisió: McGowan, Eriksen, Hutton, 2006). S'ha demostrat que l'exercici físic pot millorar la capacitat cognitiva dels animals i reduir les plaques de β -Amyloide i la Tau en aquest model de ratolí de malaltia d'Alzheimer (Intlekofer i Cotman, 2013).

La Variabilitat de la Freqüència Cardíaca (HRV) com a un indicador d'estrès

Avui en dia, l'anàlisi de la variabilitat de la freqüència cardíaca (HRV, *Heart Rate Variability*; per a més informació sobre els paràmetres d'HRV, veure l'apartat de *Metodologia* i la Taula 3) s'ha convertit en un dels procediments més utilitzats per avaluar el balanç autonòmic, tan en humans (Lavie, Thomas, Squires, Allison, Milani, 2009) com en animals (Aubert, Vandepuit, Beckers, Liu, Verheyden, Van Huffel, 2009). En la seva primera aplicació al 1965, Hon i Lee demostraren la importància clínica de les variacions del cicle QRS en la monitorització fetal (Vanderlei, Pastre, Hoshi, Carvalho, Godoy, 2009). Ha resultat una tècnica molt útil perquè no és una invasiva i és fàcil de fer servir (Rodas, Pedret, Ramos, Capdevila, 2008), en comparació a l'anàlisi del VO_{2max} o del lactat en plasma, que tenen un cost econòmic alt i són tècniques invasives per al subjecte (Parrado, 2010).

Està ben establert que els cors sans són aquells que bateguen de manera irregular, amb més variabilitat entre batecs consecutius (per a una revisió: Thayer, *et al.*, 2010). I és que l'HRV es defineix com a la variació batec a batec; específicament, l'HRV és la variació en el temps entre dos pics R (interval RR), al llarg d'un període concret de temps (Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996; Sztajzel, 2004).

Abans de continuar, farem un repàs breu i esquemàtic del funcionament cardíac. El cor és el múscul encarregat de proveir el corrent sanguini a tot el cos; està dividit en 2 aurícules (o *atrium*) que recullen la sang i 2 ventricles que la bombegen (Guyton, 1977). L'aurícula dreta (*right atrium*) agafa la sang sense oxigen de la vena cava i la passa al ventricle a través de la vàlvula tricúspide. Aquest la bombeja per l'arteria pulmonar cap als pulmons, on s'oxigena. Aquesta sang oxigenada torna al cor i entra a la aurícula esquerra per la vena pulmonar, i passa al ventricle esquerra per la vàlvula mitral que,

finalment, bombeja la sang oxigenada a tot al cos per l'arteria aorta (Figura 2). En humans i en repòs, aquest procés succeeix aproximadament entre 60 i 80 vegades per minut i s'anomena cicle cardíac (des d'un batec al següent). Ocorren dos sub-processos durant el cicle:

- sístole: és el moment en que el cor es contrau i bombeja sang de l'aurícula al ventricle (sístole auricular) i des del ventricle a la arteria pulmonar o aorta (sístole ventricular).
- diàstole: el moment en el qual el cor es relaxa després de la contracció i es prepara per recarregar-se de sang en circulació.

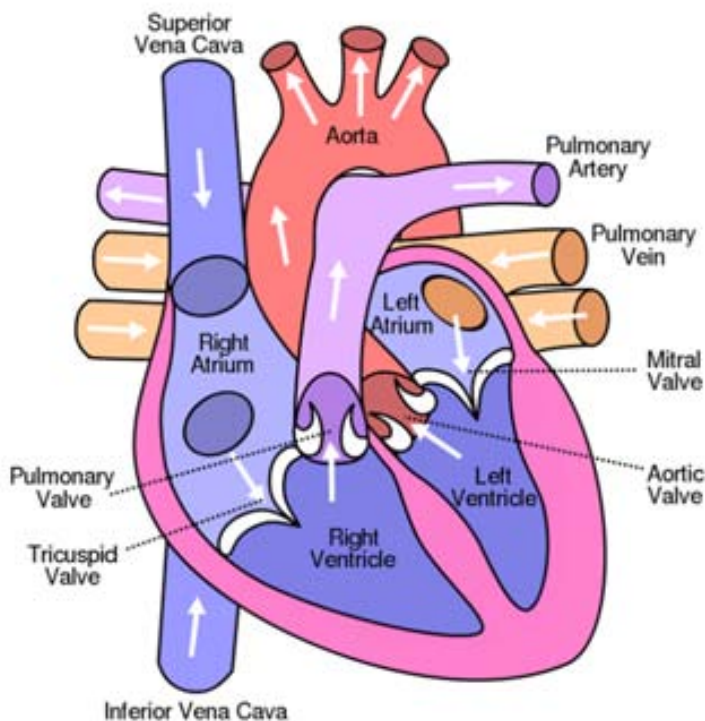


Figura 2. Estructura i funcionament del cor humà. El cor dels rosegadors també s'ajusta a aquest esquema. *VetGo Cardiology* (2013)®

Aquests processos estan regulats per una activació elèctrica específica que es pot detectar a partir de l'electrocardiograma (ECG). A la Figura 3 es mostra un ECG típic i a la Figura 4 l'esquema detallat de l'activitat elèctrica durant el cicle cardíac i, en concret, el complex QRS.

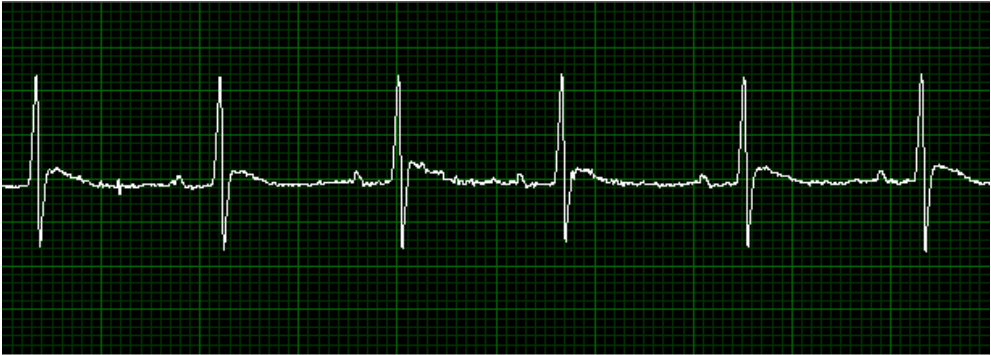


Figura 3. Exemple d'electrocardiograma (ECG) d'una rata femella de l'experiment explicat en l'Annex 1.

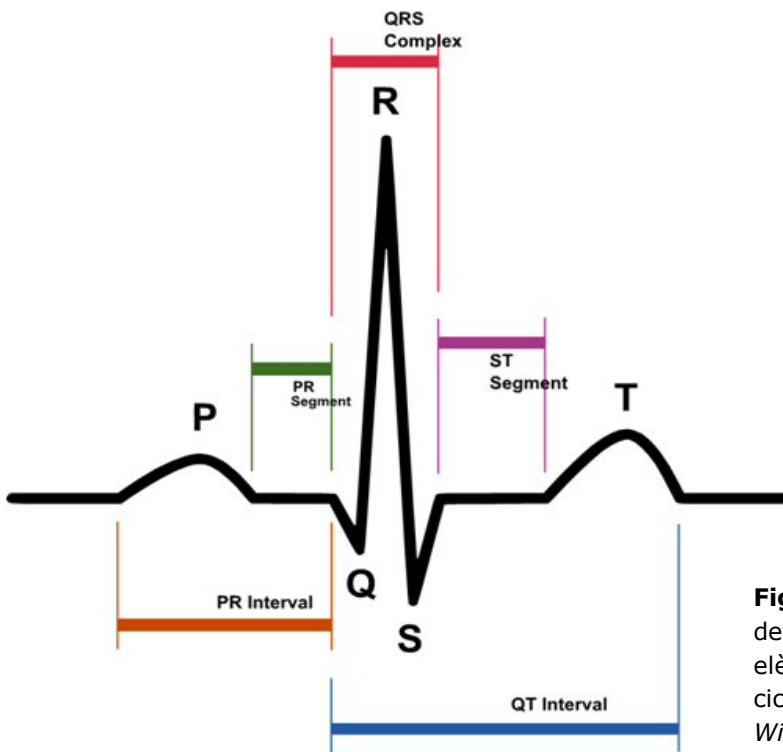


Figura 4. Esquema detallat de l'activació elèctrica durant un cycle cardíac. *Wikipedia, QRS Complex (2013).*

L'explicació del cycle cardíac pas a pas seguint l'ECG és l

- Ona P: les aurícules comencen a despolaritzar-se abans de contraure's i bombejar la sang cap al ventricle.
- Segment PR: Uneix l'ona P amb el complex QRS.

- Complex QRS: els dos ventricles comencen a despolaritzar-se, causant la seva contracció i bombejant sang fora del cor. Al mateix temps, les aurícules comencen a re-polaritzar-se per agafar la sang del cos un altre cop. Aquest complex és el que correspon al senyal elèctric més potent de l'ECG i coincideix amb el que anomenem "pols" o "batec".
- Segment ST: Connecta el complex QRS amb la ona T. Durant aquest segment els ventricles estan totalment despolaritzats.
- Ona T: representa la re-polarització (o recuperació) dels ventricles.

L'HRV depèn del sistema nerviós autònom (SNA) (Hautala, Kiviniemi, Tulppo, 2009; Silva, Ushizima, Lessa, Cardoso, Drager, Atala, 2009) i, més concretament, de les seves dues branques (Figura 5), el sistema nerviós simpàtic (SNS) i el sistema nerviós parasimpàtic (SNP), les quals normalment regulen la funció cardíaca en tàndem (Paton, Boscan, Pickering, Nalivaiko, 2005). L'activació del primer accelera el cor i la del segon el desaccelera (Acharya, Joseph, Kannathal, Lim, Suri, 2006). Encara que l'activació del SNS representa la resposta predominant en les estratègies d'afrontament i en la conducta de supervivència, una activació simpàtica crònica i excessiva pot representar un factor de risc per malalties cardiovasculars i no-cardiovasculars (Montano, Porta, Cogliati, Costantino, Tobaldini, Casali, *et al.*, 2009). Per aquesta raó, és preferible una predominança del SNP, atès que, la hiper-activació simpàtica s'ha associat amb l'ansietat (Michels, Sioen, Clays, De Buyzere, Ahrens, Huybrechts, *et al.*, 2013; von Borell, Langbein, Després, Hansen, Leterrier, Marchant-Forde, *et al.*, 2007). Hi ha evidències que el nucli central de l'amígdala pot disminuir l'HRV i incrementar els batecs per minut (BPM) per influència del còrtex prefrontal i en resposta a una activació (arousal) emocional. Estudis de ressonància magnètica han descobert que l'activitat en el còrtex prefrontal medial està associada amb l'HRV, en concret l'activació vagal (Lane, McRae, Reiman, Chen, Ahern, Thayer, 2009). En funció de l'emocionalitat del context, l'amígdala pot modular la resposta cardíaca,

incrementant-la davant estímuls temerosos o disminuint-la en situacions relaxants (Figura 5) (Saha, 2005). Això es coneix com a "fight or flight response". Aquesta resposta automàtica de supervivència deriva en patologia quan es fa crònica i el còrtex prefrontal s'hipoactiva (per a una revisió: Thayer i Lane, 2009).

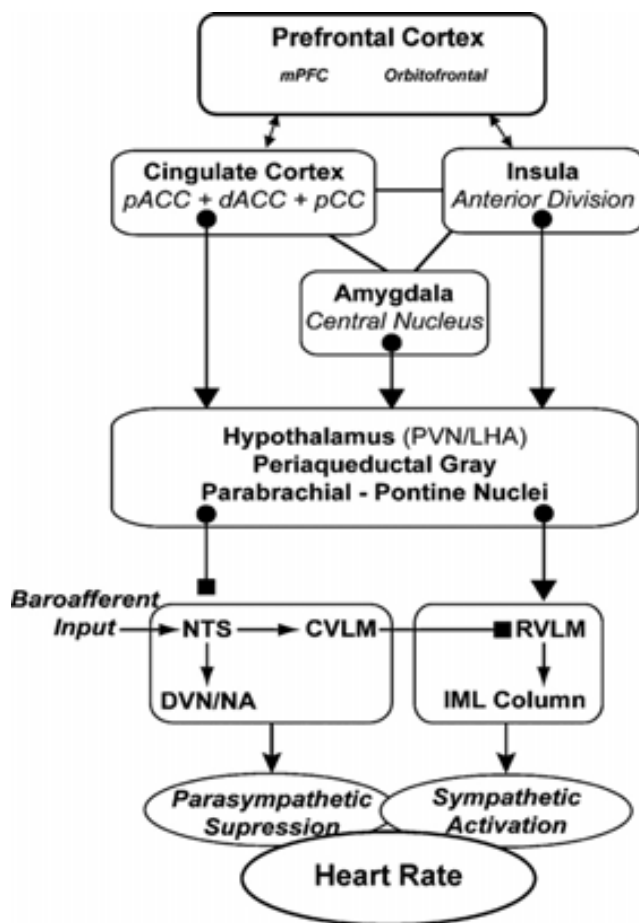


Figura 5. Esquema que mostra les vies neurals per les que el còrtex prefrontal a través de l'amígdala influencien la funció cardíaca. L'amígdala és l'encarregada de mediar entre el SNA i el còrtex prefrontal. (Thayer i Lane, 2009). El model que els autors anomenen: "The Neurovisceral Integration Model".

Ja ho deien els grecs (i els romans): *mens sana in corpore sano*. Sabem que un estil de vida sedentari comporta uns riscos per a la salut física i mental, i que les cardiopaties es poden, en part, prevenir i pal·liar amb l'exercici regular. I això és rellevant si es té en compte que les malalties cardiovasculars són la primera causa de mort i discapacitat a nivell mundial, però, sobretot, en els països desenvolupats. Thayer,

Yamamoto i Brosschot (2010), en una excel·lent revisió, conclouen que l'HRV és un bon índex no invasiu per a diagnosticar cardiopaties i que és correlaciona amb els principals factors de risc de malaltia cardiovascular i d'infart de miocardi en general. A més, basant-se en el model que proposa la "National Heart, Lung, and Blood Institute of US National Institutes of Health"

(<http://www.nhlbi.nih.gov/hbp/hbp/hdrf.htm>) sobre els factors de risc per cardiopaties; els autors resumeixen els avenços d'aquests amb l'HRV.

Hi ha dades positives en quant a la reducció de factors de risc com ara hipertensió, diabetis, colesterol, hàbit de fumar, sedentarisme i obesitat a base de fer exercici físic i dieta. Per exemple, respecte a la hipertensió, en un estudi fet amb una mostra de 6.931 subjectes es va veure que en els hipertensos l'HRV (mesurada amb el paràmetre SDRR) era més baixa en comparació als normotensos (Schroeder, Liao, Chambless, Prineas, Evans, Heiss, 2003). Respecte al colesterol i la diabetis s'ha trobat que els nivells de colesterol correlacionen negativament amb l'HRV (SDRR) i que en diabètics la variabilitat cardíaca és menor que en subjectes sans, i millora al reduir de pes (Thayer i Fischer, 2013; Sjoberg, Brinkworth, Wycherley, Noakes, Saint, 2011; respectivament). Sobre el tabac, s'ha trobat que fumadors actius i també passius presenten una menor variabilitat i una major predominança de l'activació simpàtica (Dinas, Koutedakis, Flouris, 2013). Respecte a l'obesitat, s'ha detectat una menor variabilitat (SDRR) i una menor activació del sistema nerviós parasimpàtic (SNP) en pacients obesos (índex de massa corporal entre 31 i 52) comparant amb subjectes control (índex de massa corporal entre 17 i 27) (Karason, Molgaard, Wikstrand, Sjöström, 1999). I respecte al sedentarisme, hi ha força estudis que han analitzat els beneficis de l'exercici aeròbic sobre l'HRV en humans (per a una revisió: Routledge, Campbell, McFetridge-Durdle, Bacon, 2010). Per exemple, en un estudi epidemiològic fet amb 3.328 subjectes (29% de dones, entre 45-68 anys) es va veure que les persones moderadament o vigorosament actives mostraven una major

variabilitat i una predominança del SNP (només en homes) en comparació a les persones sedentàries (Rennie, Hemingway, Kumari, Brunner, Malik, Marmot, 2003). Sloan i col·laboradors (2009) van entrenar durant 12 setmanes a persones adultes-joves (38% homes, mitjana de 30 anys) a fer exercicis aeròbics o anaeròbics (disseny intersubjecte) i només el grup d'exercici aeròbic (1h/sessió, 3d/set., 12set.) incrementà la variabilitat cardíaca. L'exercici aeròbic suau també augmentà l'HRV en dones (James, Reynolds, Maldonado-Martin, 2010) i en persones grans (mitjana de 70 anys) (Albinet, Boucard, Bouquet, Audiffren, 2010).

Finalment, s'ha descobert que els esportistes amb una elevada intel·ligència emocional mostren una major HRV (mesurada amb el paràmetre RMSSD) i una major activació del SNP (mesurada amb el paràmetre LF/HF) (Laborde, Brüll, Weber, Anders, 2011). De la mateixa manera, s'ha trobat que alguns paràmetres de l'HRV són capaços de distingir entre l'ansietat més baixa dels entrenaments i la més alta de la competició en nedadors (Cervantes, Rodas, Capdevila, 2009). A més, alguns estudis que utilitzen proves de ressonància magnètica en població general han descobert una correlació de l'activació de les àrees frontals del cervell relacionades amb la funció emocional, rostral medial del prefrontal i escorça cingulada anterior, amb l'HRV (Thayer, Ahs, Fredrikson, Sollers III, Wager, 2012). En una metanàlisi recent sobre estudis de HRV i depressió es va concloure que els pacients depressius mostraven una menor variabilitat cardíaca en comparació a subjectes sans; i que el tractament amb antidepressius tricíclics augmentava aquesta variabilitat (Kemp, Quintana, Gray, Felmingham, Brown, Gatt, 2010).

Pel que fa als efectes de l'exercici aeròbic sobre la variabilitat cardíaca en rates, les dades obtingudes fins ara no són consistents. S'ha vist que l'entrenament a la cinta ergomètrica a una intensitat moderada-alta reduïa els BPM (Li, *et al.*, 2008; Sanches, Sartori, Jorge, Irigoyen, De Angelis, 2009). A molt llarg termini, 36 set. d'exercici a una intensitat elevada (20m/min) incrementà la variabilitat cardíaca (mesurada en

milisegons, ms), en un model de rates mascles de regurgitació de la vàlvula aòrtica severa (Lachance, Plante, Bouchard-Thomassin, Champetier, Roussel, Drolet, *et al.*, 2009). Per contra, en rates sanes i usant també un protocol d'intensitat moderada-alta (anava augmentant, mantenint-se entre el 50-70% de la capacitat màxima dels animals) es trobà una reducció de l'HRV (Moraes-Silva, De La Fuente, Mostarda, Rosa, Flues, Damaceno-Rodrigues, *et al.*, 2010). També s'ha trobat que 8 set. d'exercici voluntari redueixen l'activació del SNS (LH) en un model de rates hipertenses (DiCarlo, Collins, Rodenbaugh, Smitha, Berger, Yeragani, 2002).

Sembla, per tant, que la majoria d'estudis en rosegadors s'han concentrat en estudiar els efectes de l'exercici més intens i que els efectes de l'exercici moderat sobre la variabilitat de la freqüència cardíaca en animals de laboratori no estan encara descrits.

Som el que mengem

Una de les més grans pandèmies que estem patint els humans és l'obesitat (Odgen, Carroll, Curtin, McDowell, Tabak, Flegal, 2006), éssent l'obesitat infantil la que més preocupa i la que augmenta més ràpidament (van Vliet, Heymans, von Rosenstiel, Brandjes, Beijnen, Diamant, 2011). Hi ha nombroses malalties associades a l'obesitat, destacant l'infart de miocardi, l'íctus, la diabetis tipus II, el càncer, la hipertensió, l'asma, etc. (per a una revisió: Dixon, 2010). En relació a les dietes de cafeteria poc saludable que hem comentat en el pròleg, és important saber si hi ha efectes a nivell emocional que puguin associar-se a l'increment del consum. Hi ha dades prèvies que demostren que el consum de dietes saboroses, augmenten en situacions d'estrès, d'ansietat o d'avorriment (Bennett, Greeme, Schwartz-Barcott, 2013). En una recent revisió, Parylak i col·laboradors (2011) trobaren que els humans, davant de situacions emocionals aversives, tendim a menjar major quantitat d'aliments saborosos (rics en greixos, carbohidrats, calories, etc.; "comfort food"); i sembla que això podria estar relacionat amb el sistema del reforçament cerebral i la dopamina.

No hem de deixar de banda els canvis socials relacionats amb els hàbits alimentaris que impliquen passar de consumir àpats regulars (esmorzar, dinar i sopar) i elaborats amb productes naturals, a un consum gairebé de manera continuada de productes manufacturats de consum immediat, rics en sucre, greixos, sals i carbohidrats (James, 2008; Perry i Creamer, 2014). S'ha vist que la influència social és molt important en la població adolescent (Li, Barnett, Goodman, Wasserman, Kemper, 2013) i que els patrons de consum es modifiquen. Nielsen *et al.* (2002) van fer un estudi epidemiològic sobre els hàbits de consum en adolescents, i van trobar que els adolescents dels anys 90 consumien més pizzes, snacks salats, hamburgueses, patates fregides, refrescs, etc. que els adolescents dels anys 70, a més d'incrementar els àpats basats en el *fast food* en detriment de menjar a casa. Aquests canvi d'hàbits es manté; encara que hi ha una petita tendència a disminuir el consum d'aquests productes en els adolescents, però segueix incrementant en els nens (Slining, Mathias, Popkin, 2013).

L'estudi en models animals d'aquestes dietes poc saludables que consumim els humans permet investigar a fons les alteracions metabòliques i avaluar l'eficiència de tractaments i/o intervencions per pal·liar els efectes nocius que provoquen aquestes dietes.

En rates hi ha diversos models que simulen patrons d'alimentació poc nutritius inductors de sobrepès i obesitat. Per exemple, alimentar als animals amb llard (la Fleur, Akana, Manalo, Dallman, 2004) o donar als animals pinsos amb un elevat contingut calòric (per exemple, Scarpace, Matheny, Strehler, Shapiro, Cheng, Tümer, *et al.*, 2012). També es poden emprar models genètics d'obesitat (per a una revisió: Guerre-Millo, 2013), com les Zucker Diabetic Fatty Rats (Aleixandre de Artiñano i Castro, 2009; Unger, 1998), o els ratolins *Lep/Lep* o *ob/ob* (Zhang, Proenca, Maffei, Barone, Leopold, Friedman, 1994). Una altra estratègia és treballar amb un model de dieta de cafeteria (CAF) per a rosegadors, composta per productes de consum humà rics en sucres, greixos, calories, carbohidrats, etc., com ara: snacks de formatge, galetes,

salsitxes de frankfurt, bacon, brioixeria industrial, salami, xocolata, llet ensucrada, etc. (Caimari, Oliver, Rodenburg, Keijer, Palou, 2010; Goularte, Ferreira, Sanvitto, 2012). S'ha demostrat que aquest tipus de dieta produeix profundes alteracions metabòliques en rates (Sampey, Vanhoose, Winfield, Freemerman, Muehlbauer, Fueger, *et al.*, 2011) i altera l'expressió de l'enzim que degrada la insulina (insulin-degrading enzyme) a més a més d'altres aspectes relacionats amb patologia metabòlica (Castell-Auví, Cedó, Pallarès, Blay, Ardévol, Pinet, 2012).

Igual que a les persones, aquestes dietes saboroses agraden molt als animals, de manera que, el consum de pinso en els animals alimentats amb dieta CAF representava el 15% del que consumien les rates alimentades només amb dieta estàndard (Sampey, *et al.*, 2011). Per altra banda, sembla que els patrons de consum que utilitzen les rates també s'assemblen força als dels humans. En un estudi, els investigadors van distingir entre "meals" (dinars) i "snacks" (picar entre hores); considerant que després de menjar un "meal" la rata es renta (*grooming*) i dorm o descansa, mentre que després d'un "snack" no segueix aquest patró. Trobaren que les rates amb dieta CAF incrementaven significativament els "snacks" en detriment dels "meals", i que hi havia una correlació positiva entre l'augment del pes corporal i el consum d'"snaks" en la dieta CAF (Martire, Holmes, Westbrook, Morris, 2013). Hi ha indicis que les rates més consumidores de pinso ric en greix, oli de blat de moro i llard mostraven menys ansietat que les rates alimentades amb pinso normal (Alsiö, Roman, Olszewski, Jonsson, Fredriksson, Levine, *et al.*, 2009). En un altre estudi, rates adolescents, que havien patit separació maternal durant la seva infància, i que posteriorment havien estat alimentades amb dieta CAF i/o van fer exercici, mostraven menys conducta ansiosa que les rates control de separació breu (Maniam i Morris, 2010). En un altre estudi, la xocolata contrarestà els efectes de la immobilització en rates femelles (Krolow, Noschang, Arcego, Adreazza, Peres, Gonçalves, *et al.*, 2010). A més a més, altres investigadors trobaren que una dieta rica en greixos (pinso) reduïa la conducta ansiosa i la conducta depressiva (Boukouvelas,

Antoniou, Papalexi, Kitraki, 2009). A més a més, hi pot haver diferències de gènere en els efectes d'aquestes dietes. Per exemple, una dieta rica en carbohidrats incrementà el pes i els nivells triglicèrids en les femelles adolescents que havien sofert estrès, però aquest efecte es diluï en l'edat adulta; mentre que en els mascles, els efectes foren més persistents (Krolow, Noschang, Arcego, Huffell, Marcolin, Benitz, *et al.*, 2013).

Si bé hi ha evidència que la dieta CAF indueix patologia metabòlica en rates, la caracterització conductual d'aquest tipus de dieta encara no està ben definida.

Objectius i Hipòtesis

L'objectiu principal és avaluar en un model animal els efectes de conductes relacionades amb l'estil de vida saludable, l'exercici físic i la dieta, abordant conjuntament aspectes cognitius, emocionals, socials, neuroendocrins, cardiovasculars i metabòlics, tot considerant diferències de gènere.

Els objectius específics que ens hem plantejat han estat:

1. Establir i caracteritzar un protocol d'exercici moderat i regular adaptat per a rates i que no generi respostes d'estrès.
2. Comprovar si l'exercici moderat i regular a llarg termini té beneficis, fisiològics, cognitius, emocionals i/o cardiovasculars en relació a l'ansietat i l'estrès.
3. Avaluar els efectes de la dieta de cafeteria sobre la conducta ansiosa en rates mascles i femelles.
4. Estudiar els efectes diferenciats de l'exercici moderat i regular i de la dieta CAF en mascles i femelles.

Les hipòtesis inicials són:

1. Un exercici moderat, regular i al llarg de tota la vida hauria de disminuir l'ansietat i afavorir l'aprenentatge, de la mateixa manera que hauria de millorar la salut cardiovascular.
2. Aquests efectes beneficiosos haurien de ser observables tan en mascles com en femelles.
3. La dieta CAF hauria d'afectar negativament el metabolisme i la composició corporal dels animals i, també, l'emotivitat, la tolerància a l'estrès i l'activitat motora.

Metodologia General

Malgrat ser una tesi per compendi de publicacions, on en cada article es descriu la metodologia que s'ha seguit, hi ha elements metodològics comuns en el model d'exercici físic i la dieta que volem destacar en aquest apartat.

Animals

Tots els experiment es van fer amb rates de la soca Sprague-Dawley obtingudes dels serveis d'estabulari de la UAB i de la UB. Tots els animals, excepte els utilitzats en Lanza *et al.* 2014, van ser estabulats per parelles, per tal d'evitar estrès per aïllament. Es mantingueren en unes condicions de cicle de llum/fosc de 12h (els llums s'encenen a les 8:00), estàndards de temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) i humitat ($50\pm 10\%$), amb pinso i aigua *ad libitum*. Tots els protocols van ser aprovats pel comitè d'ètica de la UAB o la UB (en funció de l'experiment), seguint els "Principles of laboratory animal care" i realitzats d'acord a "European Communities Council Directive (86/609/EEC)".

Cinta Ergomètrica o Treadmill

Els *treadmills* que hem fet servir consten de 3 carrils (45cm de llarg, 11cm d'ample i 12cm d'alçada; Columbus Instruments, USA) en paral·lel separats per parets de les mateixes característiques, amb una única cinta d'una amplada de 38cm. Els carrils tenen una inclinació de 0° i no utilitzem electroshock "motivador" al final del carril (Figura 6). Les sessions d'entrenament es van fer a la sala d'estabulació, entre 4 i 5 dies per setmana, durant la fase diürna amb una durada de 30 minuts. Els animals del grup entrenat (TM) eren habituats a la cinta ergomètrica durant la primera sessió de 30min sense velocitat; per minimitzar l'estrès induït per la novetat i facilitant l'habitució a l'aparell i a la situació d'entrenament. A la segona sessió, l'exercici ja començava suaument i anava augmentat gradualment durant 3 setmanes aproximadament fins a una velocitat de 12 metres/minut (m/min), que es mantenia fins al final de l'experiment.

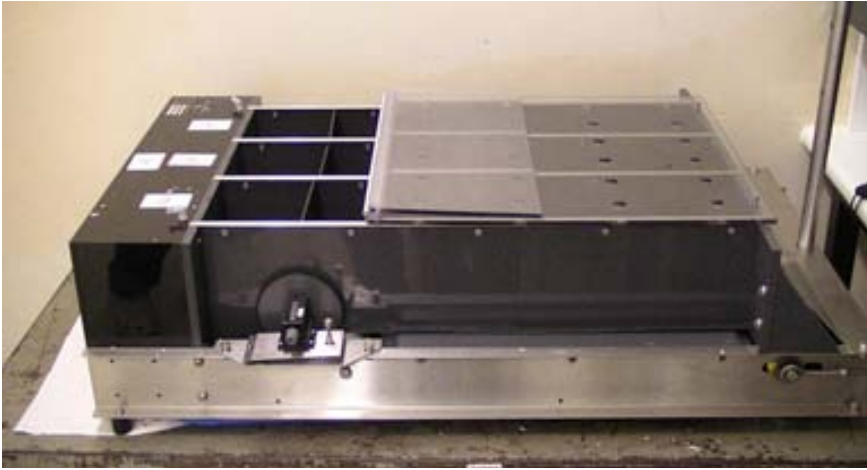


Figura 6. Cinta ergomètrica (o *treadmill*) emprada en aquesta tesi (Columbus Instruments, USA)

Dieta de Cafeteria

La dieta de cafeteria (CAF) consistia en: llet ensucrada (220gr de sucre per un litre de llet sencera), bacon o frankfurt, magdalena o ensaïmada, galeta maria amb formatget i paté, i pastanaga (aquest últim ingredient es va incloure per tal de garantir l'aportació de vitamines necessàries pel desenvolupament dels animals). La dieta CAF també va incloure pinso de creixement (2018 Teklad Global 18% protein Rodent Diet, Harlan, USA) i aigua *ad libitum*.

Disseny experimental

Utilitzarem 2 tipus de grups controls. El primer grup control l'anomenem sedentari (SED) i el componen animals que sempre romangueren a la seva gàbia. El segon és el grup anomenat control (CON) i el componen animals manipulats exactament igual que els que fan exercici, però la cinta estava parada durant tota l'estona que durava la sessió. Es treien cada dia de la gàbia i es col·locaven a la cinta ergomètrica durant la mateixa estona que les rates d'exercici. D'aquesta manera podem controlar els efectes de la manipulació i l'exposició a l'aparell, i distingir-los dels de l'exercici exclusivament. Finalment, hi ha el grup de rates que feien exercici, a aquest grup l'anomenem TM.

Variables dependents

Variables Conductuals

Els comportaments que hem avaluat i els tests on els analitzàrem (Taula 2) van ser:

- Conducta ansiosa (o ansietat) i reacció a la novetat: *Hole Board* (HB), *Elevated Plus Maze* (EPM) i *Open Field* (OF).
- Activitat motora i reacció a la novetat: HB, EPM, OF.
- Desesperança conductual (o estat d'ànim): *Forced Swimming Test* (FST).
- Aprenentatge en situació de conflicte (o Estratègies d'afrontament): *Shuttle Box* o *Two-way Avoidance Task* (SB).
- Sociabilitat en rates adolescents: *Social Test* (ST).

Les característiques de cada prova en particular foren:

Hole Board (Boissier, Simon, Lwoff, 1964) (Figura 7): Consistia en una caixa de fusta quadrada (66cm d'amplada i llargada i 47cm d'alçada) de color beix amb 4 forats equidistants (3.7cm de diàmetre i 18cm de profunditat) i dividit en 16 quadrats per línies vermelles. Les variables mesurades van ser: temps i número de *head-dippings*, definits com ficar el cap al forat fins el nivell dels ulls. Les variables d'activitat motora foren el número de *rearings* (l'animal aixecat amb les potes del darrera) i el número de *crossings* (cada cop que creuava d'un quadrat amb les 4 potes).



Figura 7: *Hole Board* (HB).

Elevated Plus Maze (Handley i Mithani, 1984; Pellow, Chopin, File, Briley, 1985) (Figura 8): L'EPM consistia en 4 braços (50cm de llarg i 10cm d'ample) de fórmica negra en forma de "+". Dos braços oposats tenien parets de 40cm d'alt (braços tancats, *closed arms*) i els altres dos oposats no tenien parets però sí un sòcul de 0.5cm per evitar rrelliscades i caigudes a l'animal (braços oberts, *open arms*). L'aparell estava aixecat 50cm del terra. Col·locavem els animals al centre de l'aparell de cara al mateix braç tancat. Les variables d'ansietat que vam mesurar foren: les entrades i el temps als braços oberts, el temps al centre i l'avaluació de conductes de risc (*stretched attend postures*, SAP). Les variables d'activitat motora foren el temps i les entrades als braços tancats.



Figura 8: Pla frontal de l'*Elevated Plus Maze* (EPM).

Open Field (Hall, 1934; Goma i Tobeña, 1978) (Figura 9): Consistia en una arena (100cm de llarg, 50cm d'ample i 45cm d'alt. En Lanza et al., 2014 en vam usar un de: 75×45×45cm) de Plexiglass blanc. L'animal es col·locava al centre de l'arena i és mesurava la distància recorreguda (usant el sistema de video-tracking, ViewPoint, França) i les defecacions com a variables d'ansietat. En Lanza et al. (2014), a més, es va mesurar el temps en l'àrea central, mitjançant el sistema de video-tracking Smart (Panlab, Barcelona, Espanya).



Figura 9: *Open Field* (OF) de 100 x 50 cm amb dos compartiments independents.

Forced Swimming Test (Porsolt, Le Pichon, Jalfre, 1977) (Figura 10A): Els animals es submergien en un cilindre transparent de metacrilat (60cm d'alçada i 19cm de diàmetre) omplert d'aigua a 25°C (35-40cm de fondària, en funció de la mida de la rata). El test es componia de dues sessions separades per 24h, la primera durava 15min i la segona 5min. La immobilitat de la segona sessió de 5min s'interpreta com desesperança apresada i, per tant, com estat d'ànim deprimat. Dues rates es col·locaven en dos cilindres diferents, separats per una paret negra (40cm d'alçada), i es mesuraven al mateix temps, gravant-se en un pla frontal. Les variables que es van mesurar foren (Dal-Zotto, Martí, Armario, 2000) (Figura 10B): temps d'immobilitat, la rata roman sense moure's, traient només el cap de l'aigua; temps de lluita (*struggling*), la rata intenta activament escapar de la l'aigua, submergint-se, escalant per les parets i movent activament les quatre potes; natació suau, correspon a la resta del temps.



Figura 10: A) Esquema d'un aparell de *Forced Swimming Test* (FST). B) Imatge de la conducta de lluita a l'esquerra, de la conducta de natació suau al mig i d'immobilitat a la dreta, basat en Dal-Zotto, *et al.* (2000).

Shuttle Box o Evitació Activa en dos Sentits (Fernández-Teruel, Escorihuela, Núñez, Zapata, Boix, Salazar, *et al.*, 1991)(Figura 11A): Consisteix en dos compartiments negres iguals amb una graella al terra (25cm de llarg, ample i alt) i comunicats per una porta. Estava encabida dins una caixa també fosca, opaca i insonoritzada (Figura 11B). L'animal havia d'aprendre (Figura 11C) a associar un llum (7w) i un so (2400hz a 40db) (estímul condicionats) amb una descàrrega elèctrica (0.6mA i 10sec. que durava l'estímul incondicionat) que rebia per les potes, i a canviar de compartiment per evitar la descàrrega durant els 10 segons de duració de l'estímul condicionat (llum+to). Un cop transcorregut el període de descans de 40sec. (intertrial), apareix un altre cop l'estímul condicionat i es tornava a repetir la seqüència anterior. Quan l'animal canviava de costat o si no ho feia, quan s'acabaven els 20sec. d'estímul incondicionat, començava el període de descans. En la primera sessió, els animals tenien 5min d'habitució a la SB, a les fosques i sense cap mena d'estímul. En Lanza *et al.* (2012) els animals van fer una única sessió de 40 assaigs; mentre que en Lanza *et al.* (sotmès a *Physiology and Behavior*) els animals van fer 5 sessions de 30 assaigs cadascuna. Les variables que es mesuraven eren: el número d'evitacions (respostes correctes), quan la rata és capaç de canviar de compartiment durant els 10sec. de l'estímul

condicionat; el criteri d'aprenentatge 8 (la rata fa 8 evitacions seguides dins una mateixa sessió; Escorihuela, Tobeña, Driscoll, Fernández-Teruel, 1995); la latència d'evitació i/o escapada, defecacions i número de creuaments durant el període d'habitució.

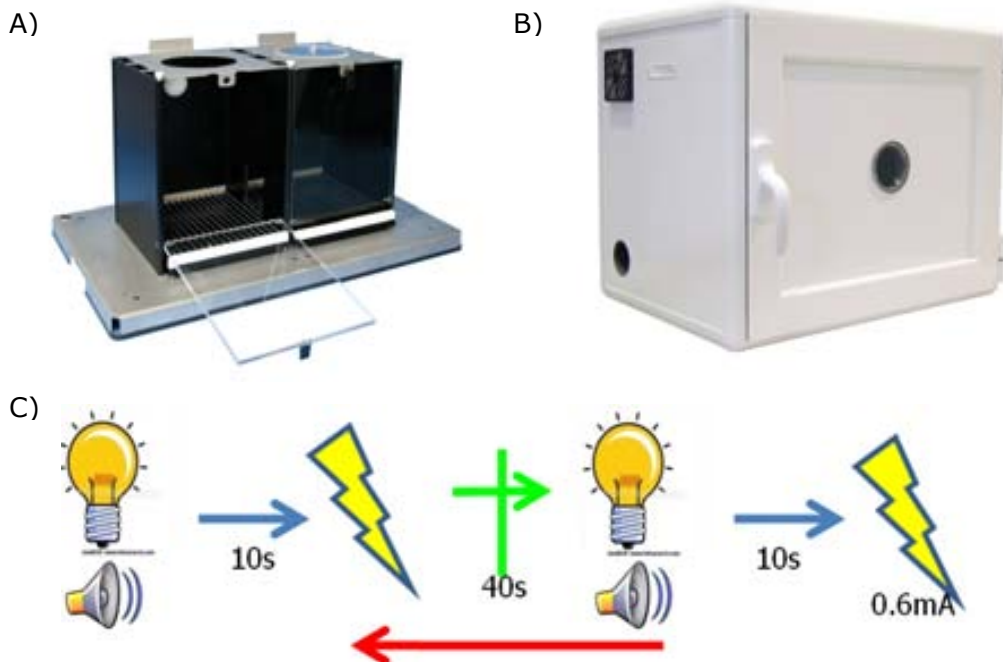


Figura 11: A) Aparell de *Shuttle Box* i B) caixa d'insonorització per la *Shuttle Box* (SB) (Panlab, Barcelona, Spain). C) Esquema d'adquisició que ha de seguir la rata per evitar el shock elèctric.

Social Test (ST) (File i Hyde, 1978; File i Seth, 2003) (Figura 12): El test de joc social es feia a l'*Open Field*. Primer cal habituar els animals a l'aparell durant 5min; el dia següent es col·loquen dues rates del mateix sexe, una d'elles experimental i l'altra naïve, al mateix temps; durant 5min. Les rates naïve s'anaven alternant per evitar l'habitució dels animals de manera que cadascuna es va fer servir un màxim de 3 vegades. Les variables que es mesuraven en les rates experimentals foren (Trezza, Baarendse, Vanderschuren, 2010): i) *poucing*: saltar sobre el clatell del company/a (que es considera una sol·licitud per iniciar el joc social); ii) *boxing/wrestling*: totes dues rates es mantenen

dretes sobre les potes posteriors i fan simulacres de lluita amb les potes davanteres (segueix al *pouncing* es considera una resposta positiva a la sol·licitud de joc social; iii) *following/chasing*: una de les rates persegueix a l'altra; iv) *social grooming*: olorar o llepar qualsevol part del cos del company/a; v) *pinning*: la rata manté a l'altra en posició supina.



Figura 12: Dos exemples de joc social en rates. (A): pouncing i (B) pinning. (Trezza, *et al.*, 2010).

Tots les proves conductuals es van fer en una sala diferent a la sala d'establació i entrenament. Normalment s'utilitzava una sala pintada de negre (excepte en la part 3, que és blanca) i il·luminada per una o dues bombetes de 40w. En els experiments que s'avaluaven dos animals simultàniament, els dos animals eren sempre de la mateixa gàbia, no es podien veure entre ells durant la prova i es col·locaven individualment en aparells idèntics. Les proves conductuals sempre es

van fer entre les 8:30h i les 14:30h (fase de llum) i els aparells eren netejats amb una solució d'etanol al 10% després de cada subjecte. A la Taula 2 es resumeix la cronologia i la seqüència, que sempre era de menys a més estressant per l'animal, de cada una de les parts que inclou aquesta tesi (McIlwain, Merriweather, Yuva-Paylor, Paylor, 2001).

Taula 2: Cronologia dels tests conductuals en funció de l'experiment

		Part de resultats			
		1	2A	2B	3
Test	Hole-Board	1	1		1
	Elevated Plus Maze	2	2		2
	Open-Field		3		3
	Forced Swimming Test	3			
	Shuttle Box		4*	1	
	Social Test				4

Els nombres corresponen a l'ordre seguit. *va ser utilitzada per induir estrès, no com a test de conducta.

Variables Neuroendocrines

L'estudi neuroendocrí es va fer en col·laboració amb el grup de recerca dirigit pel Dr. Antonio Armario (Institut de Neurociències, Unitat de Fisiologia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona) i amb la participació de Humberto Gagliano i la Dra. Silvia Fuentes. Les mostres de sang s'obtingueren fent un petit tall al final de la cua de l'animal. Aquest procediment sempre es va fer amb dos investigadors i amb la rata tapada per una tovallola, per reduir la seva ansietat i igualar les condicions de presa de mostra entre tots els subjectes. Les mostres de sang es recullen al cap de 15 minuts des de l'inici del test conductual, atès que és el temps mínim que necessita la corticosterona plasmàtica per segregarse amb l'activació de l'ACTH (Armario, 2006). En dies diferents als dels tests, també s'obtingueren mostres basals al matí (9-10h) i al vespre (19-20h) per controlar les fluctuacions circadiàries de l'eix HPA.

Variables Bioquímiques

Els resultats bioquímics s'obtingueren en col·laboració amb el grup dirigit per la Dra. Mercè Pallàs (Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona), i amb la participació del Dr. Sergi Bayod i la Dra. Anna M^a Canudas (Lalanza, *et al.*, 2012). L'estudi metabòlic dels animals alimentats amb dieta CAF es va fer amb col·laboració amb el grup dirigit pel Dr. Lluís Arola (Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (CTNS), TECNIO, CEICS, Reus), i amb la participació del Dr. Josep M^a del Bas i el Dr. Antoni Caimari (Lalanza, *et al.*, 2014).

Variables Cardiovasculars

La variabilitat de la freqüència cardíaca (HRV) s'ha obtingut amb el sistema telemètric de Data Science International (DSI, St Paul, USA) (Figura 13, 14). A la cavitat abdominal de l'animal es va implantar un transmissor TA11CA-F40 (Figura 13); els seus dos elèctrodes es van inserir subcutàniament al pectoral dret de l'animal i a la paret abdominal esquera. Una versió igual del mateix model, però inoperant, s'implantà en altres animals per controlar l'efecte de la cirurgia i de l'impant. Tal i com es pot veure en la Figura 15, els transmissors no impedièren la correcta mobilitat de l'animal ni generaven cap alteració física. Totes les cirurgies es van fer en un entorn asèptic al Servei d'Estabulari de la UAB. Els animals s'anestesiaren amb isoflorà (3-4%) i reberen un tractament analgèsic (metoxicam, s.c. 1mg/kg/0.2 ml) entre 20-30 minuts abans de l'intervenció, a l'endemà i 48h després. En cas que alguna rata, al cap de les 48h, encara mostrés signes de dolor, rebia una dosi de metoxicam diària fins que li revertia.



Figura 13: Transmissors cardíac TA11CA-F40 (DSI, USA).



Figura 14: Receptor RCP-1 (DSI, USA). La gàbia amb l'animal implantat es posava al damunt d'aquesta placa.



Figura 15: Rata (de l'Annex 1) després de ser sotmesa a l'intervenció quirúrgica per implantar-li el transmissor de registre de l'ECG i l'HRV. Això no li implica cap malestar físic.

Els intervals RR es rebien a través d'un receptor RCP-1 (Figura 14) connectat al PC. Es va desenvolupar *ad hoc* un detector del complex QRS amb el MATLAB (MATLAB R2009b, Mathworks, USA), basant-nos amb l'algoritme de Pan-Tompkins (Pan i Tompkins, 1985) adaptat a la rata. El detector va ser desenvolupat pel grup del Dr. Juan Ramos i el Dr. Miguel Ángel García-González (Grup d'Instrumentació Biomèdica i Electrònica, Departament d'Enginyeria Electrònica, Universitat

Politécnica de Catalunya, Barcelona), amb qui també vam fer l'anàlisi d'HRV complert. Els càlculs dels paràmetres d'HRV estan basats en els estàndards proposats per la Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996) (i en: García-González, Fernandez-Chimeno, Ferrer, Escorihuela, Parrado, Capdevila, *et al.*, 2011). Aquests paràmetres són (resumits a la Taula 3): i) la mitjana dels intervals R-R (**RR**, ms) i els batecs per minut (**BPM**); ii) la desviació estàndard de RR (**SDRR**, ms), que seria el paràmetre d'HRV més directe (a major variabilitat major salut); iii) l'arrel quadrada del valor mig de la suma de les diferències al quadrat de tots els RR successius (**RMSSD**, ms); iv) l'espectre a baixes freqüències, situades entre 0,06Hz i 0,85Hz (**LF**, ms²), que es considera un indicador de l'activació del SNS; v) l'espectre a altes freqüències, situades entre 0,85Hz i 3Hz (**HF**, ms²), que es considera un indicador de l'activació del SNP; vi) la proporció entre baixes i altes freqüències (**LF/HF**, %), que es considera un indicador del balanç entre activació simpàtica i parasimpàtica; vii) la freqüència central, el rang on es troba més de la meitat de freqüència de l'espectre (**CF**, hz); viii) el 95% de l'ample de l'espectre definit com el rang de freqüències centrals que contenen el 95% del total de l'espectre (**BW95**, hz).

Anàlisi Estadística

Totes les dades s'analitzaren amb el programari "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS v17 i 18). S'aplicaren proves paramètriques (T-Test, Oneway-ANOVA, Twoway-UNIANOVA i GLM) i no paramètriques quan es vulnerava l'homogeneïtat de variàncies (Kruskal-Wallis). Les comparacions *post hoc* es van fer amb els tests de Bonferroni, Duncan o Tukey en funció del nombre de comparacions. En l'apartat metodològic de cada article es descriuen en detall cada una de les proves estadístiques. S'ha considerat un nivell de significació estadística $p < 0.05$.

Taula 3: Resum de les principals variables analitzades per l'anàlisi de l'HRV, classificades en funció del tipus i relació amb l'estat de salut global.

	Paràmetre (unitat)	Breu descripció	Per a una major salut...:
Domini del Temps	RR (ms)	Interval entre els pics R	↑
	AvRR (ms)	Duració mitjana dels RR	↑
	BPM	Càlcul del nombre de pics R en 1 minut	↓
	SDRR (ms)	Desviació Std. de RR	↑
	RMSSD (ms)	Arrel de les diferències entre els RR	↑
Espectral	LF (ms ²)	Predominància del SNS	↓
	HF (ms ²)	Predominància del PNS	↑
	LF/HF (%)	Equilibri del ANS	↓
	CF (hz)	Rang on es troba >50% de l'espectre	↓
	BW95 (hz)	Rang on es troba el 95% de l'espectre	↓

Resultats

Els resultats d'aquesta tesi s'agrupen en 4 estudis identificats com a Part 1, Part 2A, Part 2B i Part 3. Dos d'aquests estudis estan ja publicats (Part 2A i Part 3) i els altres són manuscrits no publicats. En cada part hem fet un resum on s'agrupen diferents resultats afins i s'interpreten segons els objectius plantejats, es comenten les principals aportacions i s'especifiquen les conclusions que se'n deriven. Les referències, les taules i les figures específiques dels manuscrits no publicats es poden localitzar al final de la Part corresponent.

Part 1: L'exercici moderat incrementa la conducta exploratòria i millora els paràmetres de la freqüència cardíaca en rates mascles adultes

Aquest primer manuscrit no publicat inclou dos experiments on hem explorat si un protocol d'exercici moderat i regular (12m/min) durant 9 setmanes afecta la conducta ansiosa (experiment 1) i la salut cardiovascular, mesurada a través de la variabilitat de la freqüència cardíaca (HRV) (experiment 2). El procediment experimental del segon també inclou una segona fase on s'atura la pràctica de l'exercici durant 3 setmanes i s'avaluen els canvis deguts a la interrupció i manca d'entrenament. Comparats amb el nivell de línia base, les 9 setmanes d'exercici van reduir els batecs per minut (BPM) en els animals i incrementaren l'HRV mesurada amb la CF i la bw95. Sorprenentment, després de les tres setmanes d'haver aturar l'entrenament els valors cardíacs tornaren als nivells basals. Els resultats conductuals (experiment 1) indicaren que després de 9 setmanes d'exercici els animals corredors incrementaren el temps de *head-dipping* al HB en comparació al grup SED. Igualment, l'exercici incrementà el temps i les entrades als braços oberts de l'EPM en comparació amb el grup SED. El grup manipulat (CON) es va comportar de manera semblant al grup d'exercici i també va fer més temps d'exploració al HB que el grup SED. No es van trobar efectes en el FST.

Aquests resultats es poden interpretar en el sentit que el protocol d'exercici moderat no augmenta la conducta ansiosa dels animals, més aviat al contrari, la disminueix de manera semblant a com ho fa la manipulació. La variabilitat de la freqüència cardíaca (HRV) augmenta en alguns paràmetres però no en tots, la qual cosa concorda amb els efectes esperats, si bé els canvis que s'observen són d'una magnitud modesta. Per tant, el protocol d'exercici és vàlid, no provoca estrès en els animals i pot ser útil per avaluar efectes de l'exercici moderat i regular a més llarg termini.

Regular Low-moderate Exercise Increases Exploratory Behavior and Improves Heart Rate Parameters in Adult Male Rats

Abstract: The present study was aimed to investigate the effects of moderate exercise on exploratory behavior, anxiety and mood, as well as on heart rate parameters. Rats were trained in the treadmill (12m/min, 30min/day, 5days/week) for 6 weeks and compared with sedentary control and handled animals in the hole-board, elevated plus maze and forced swimming test (experiment 1). In the second experiment, telemetric devices were implanted in naïve animals to measure the heart rate and RR interval in baseline conditions, over 9 weeks of training and 3 weeks after exercise cessation. Both handling and trained increased exploratory behavior compared with sedentary control group, but only the trained group showed reduced anxiety. No significant effects were found in behavioral despair. As expected, heart rate decreased over training and increased after exercise was interrupted, while the opposite changes occurred with the RR interval. Heart rate variability was not significantly modified, a marginally increase appeared in the SDNN variable. However, two spectral indices of the power spectrum of RR time series, such as the location of the dominant oscillator, were robustly decreased over treadmill training and increased after training cessation. In conclusion our data indicate that moderate forced exercise increases exploration, reduces anxiety-like behavior, lengthens RR interval and diminishes central frequency and bandwidth 95. These findings are consistent with other reports showing that physical exercise has positive effects on affective states and HRV indices related with stress

Keywords: forced exercise; head-dipping behavior; Heart Rate; Heart Rate Variability; Central Frequency; 95% bandwidth.

1. Introduction

It has been extensively reported that the regular practice of physical exercise has robust benefits in the prevention and treatment of cardiovascular diseases in humans [1]. More recently, it has also been shown that exercise can enhance cognition, brain functioning [2] and mental health [3]. Moreover, animal research in rodents has consistently demonstrated that exercise induces neurogenesis, synaptogenesis, angiogenesis, and enhances learning and memory in tests of spatial memory, fear conditioning, passive avoidance or object recognition [4].

However, more studies are needed in order to further characterize the specific effects of different types of exercise in both healthy and pathological conditions. Although regular moderate aerobic exercise has been widely recommended in humans [5], animal studies investigating the effects of exercise of moderate intensity are still scarce. It appears that regular moderate physical exercise could provide more beneficial cardio-vascular, immunological and metabolic effects on the body than excessive exercise and over training [6]. Forced intensive protocols could overstress the animals [7] and produced alterations and immune responses associated with chronic stress [8].

In rodents, the two main animal models used for investigating the effects of exercise are the voluntary wheel running and the forced treadmill training and the form that produces better benefits does not concur among the different studies [9, 10]. Voluntary wheel running consists of placing a free access running wheel inside the home cage, thus allowing the subject to perform exercise *ad libitum*. The main disadvantage of this model is that animals perform different amounts of exercise and self-administer heterogeneous training intensities, thus leading a great amount of variability between subjects and training procedures [11]. This disadvantage is not present in the forced treadmill, which consists of placing the subjects in the lines of the apparatus for a certain time period during which the intensity of exercise, as well as the duration and the frequency of the session are scheduled by the

experimenter. However, forced treadmill can involve a certain degree of stress [10], and in some cases of hard training procedures animals are motivated to run by using aversive stimuli. In a previous work we found that long-term moderate forced treadmill training (12m/min, 4-5days/week, 30 min/session) reduced adrenocorticotropin response to mild and severe stressor [12].

Regarding anxiety-like and affective behaviors inconsistent effects have been reported. Fulk et al [13] showed that treadmill exercise during 10 or more weeks decreased anxiety in the open field and the elevated plus maze tests [13]. Burghardt et al [9] found no effects in those tests and others such as the social interaction and the conditioned freezing [9], whereas Costa et al. [14] reported recently that more than 3 treadmill sessions per week increased anxiety in the elevated plus maze test rats. Additionally, the effects of exercise on the affective behavior have been reported to be neutral [15], negative [16], or positive [17, 18].

Heart rate and some heart rate parameters, such as the R peak from QRS complex [19], have become one of the most used cardiac parameters for both, human [20] and animal research [21], since it is non-invasive and easy use [22]. Heart rate variability (HRV) reflects the cardiovascular control mediated by the sympathetic and parasympathetic (vagal) systems, and a reduction of HRV is clinically associated with an increased risk of cardiac death [23]. In humans, exercise may improve HRV in myocardial infarction, chronic heart failure and revascularization by increasing vagal tone and decreasing sympathetic activity [24], and more recently, improvements in HRV have been associated to a decreased risk of cardiovascular disease in depressed patients [25], decreased inflammatory markers [26], or improved performance in cognitive tests [27]. By contrast, impairments in HRV indices have been associated with negative emotional state, stress, anxiety and mood disorders [28, 29] and reduced HRV in a mouse model of innate anxiety has been recently reported [30].

Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of moderate exercise on anxiety-like behaviors, mood and HRV indices. Exploratory behavior, anxiety and behavioral despair; as well as heart rate, RR interval and HRV were investigated in order to evaluate the effects of the forced low-moderate training in adult rats. It has been reported that long-term exercise improved survival and HRV indices in animal models of cardiovascular disease [31-33], but the long-term effects of the regular low-moderate training protocol remain to be elucidated.

2. Method

2.1 Subjects

The subjects were Sprague-Dawley male rats bred and raised at the main animal facility (Servei d'Estabulari) of the Universitat Autònoma de Barcelona. Animals were housed in pairs in standard macrolon cages (50 x 55 x 14 cm.), fed *ad libitum* and maintained in standard conditions of temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity ($50 \pm 10\%$) and on a 12-12 h light-dark schedule (lights on at 0800h). Subjects of experiment 1 were 5 weeks-old when the treadmill training started, and subjects of experiment 2 were 10 weeks-old before surgery. All behavioral procedures were performed during the light phase of the light-dark cycle, between 0830h and 1700h. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona, following the 'Principles of laboratory animal care' and was carried out in accordance to the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

2.2 Experiment 1: training

Animals of experiment 1 were randomly assigned to sedentary (SED, n=8), control (CON, n=8) and treadmill (TM, n=10) groups by stratifying the total body weight (mean \pm SEM: SED, $179.9 \pm 8.5\text{g}$; CON, $181.7 \pm 9.0\text{g}$ and TM, $180.9 \pm 4.7\text{g}$). The treadmill apparatus (Cibertec, Spain) consisted of three lines separated by a plexiglass panel. The TM subjects

were trained for a total of 9 weeks (45 sessions, 30 min/day) (from Monday to Friday) reaching the intensity of 12 meter/minute with a gradual increase. Neither electrical shock nor physical prodding was used to force training. CON rats were placed in the treadmill (0 m/min) for the same number of sessions and the same duration than TM rats. SED rats were handled once a week for cage cleaning and tail marking.

2.3 Experiment 1: Behavioral procedures

Animals were tested in the hole-board (HB) the day after the last training session, in the elevated plus-maze (EPM) in the next day, and in the forced swimming tests (FST) two days later. All experiments were carried out in the morning (between 0900h and 1400h) in an isolated experimental room painted black with dim lighting. The whole procedures were videotaped and further analyzed by an experimenter who was unaware of the treatment that each animal received.

The hole-board test for measuring exploratory behavior consisted of a white (66cm x 66cm x 47cm) wooden box with four equidistant holes (3.7cm in diameter, 18 cm deep) in the floor, which was divided in 16 equal squares with a red marker. The animal was placed in the centre of the floor apparatus and allowed to explore the holes for five minutes. The test was recorded by a video camera, and the number of squares crossed (ambulation), the number of head dips and the time spent head dipping were measured.

The elevated plus maze test apparatus consisted of four arms made of black formic extending from a 10 cm square centre positioned 90° from each other to form the shape of a plus sign. Each arm was 44 cm long and 10 cm wide. Two of the opposing arms had wooden walls (closed arms, 40 cm high) whereas the other two were the open arms which had only a 0.5 cm ridge to provide additional grip. The whole maze was elevated 50 cm above the floor. The rat was placed in the centre of the maze (always facing the same closed arm) and during five minutes the behavior was videotaped. The number of open and closed arm entries

(defined as placing all four paws into a given arm), as well as the total time spent in the open and closed arms were scored. The number of entries and time spent in the open arms is indicative of the anxiety levels of the animal, with a high amount of time and entries in the open arms being an indicative of low anxiety.

For the forced swimming test, the animals were immersed into the transparent cylindrical plastic tank (height 40 cm, diameter 19 cm) containing water (25°C) with a depth of 24 cm. They underwent two trials of 15 and 5 min, respectively, spaced 24 h. The trials were videotaped and the following behaviors were recorded: (1) climbing, defined as active forepaw contact with the wall; (2) swimming, defined as an active attempt to keep the head above water by moving the limbs, and (3) immobility, recorded when no additional activity was observed other than required to keep the rat's head above the water surface. After each trial, the rats were carefully dried with a towel and returned to their home cage, and the water of the tank was changed before the next rat was tested.

2.4 Experiment 2: Heart Rate Variability

The devices for electrocardiogram (ECG) recordings were implanted in 10-week-old male rats ($n=6$; $451\pm 29g$). The telemetry system (Data Sciences Int., St Paul, MN, USA) consisted of a transmitter device (TA11CA-F40), a receiver (RPC-1) and a personal computer with the acquisition software (version 4.0). The transmitter was implanted into the abdominal cavity and the 2 electrodes for ECG recording were positioned subcutaneously; the positive lead was fixed to the right of the xyphoid process and the negative lead was fixed to the right pectoral muscle. Animals received three doses of metoxicam (s.c. 1mg/kg/0,2 ml), 20-30 min before anaesthesia (with isofluorane), 24 h and 48 h post-surgery.

After transmitter implantation the animals were individually housed and three weeks later a cage partner was introduced into the home cage to

avoid isolation [34]. Treadmill sessions started 2 weeks after the animals were pair-housed and ECG recordings were done every 3 weeks during the weekend, from Friday evening until Monday morning, with a sampling frequency of 5 kHz. Each home cage was placed on the corresponding platform receiver (RPC-1) during recordings. Three recordings were included in the repeated measures ANOVA analysis: 1) baseline, just before starting the treadmill exercise, 2) after 6 weeks of treadmill training, and 3) after 9 weeks of training. When the training period had finished and the animals had remained 19-21 days without doing physical activity, a fourth ECG recording was done.

Data were extracted from the ECG recordings in segments of 1 minute. The portion of the electrocardiogram comprising the Q, R, and S waves, together representing ventricular depolarization (QRS complexes), were detected offline with a QRS detector developed in MATLAB (MATLAB R2009b, Mathworks, USA) and tailored to the characteristics of the ECG of these rats. The QRS detector was based on the Pan-Tompkins algorithm [35] with an adaptation to this animal species. The enhancement of the QRS complex was performed by band pass filtering of the ECG signal in the 50 Hz to 100 Hz range. The time elapsing between two consecutive R waves in the electrocardiogram (RR interval) were obtained as RR time series and saved for further processing. RR time series with less than a 5% of artifacts were included in the study. Artifacts were identified and corrected automatically prior to analysis as follows: i) for a false positive, a corrected RR beat whose value was close to the mean of the previous ten RR intervals; ii) a false negative was split in as many RR intervals with equal value as needed to be close to the mean of the previous ten RR intervals; and iii) an ectopic beat like was substituted with two equal RR intervals corresponding to the mean of the two RR intervals involved. We removed the slow frequency components with a smoothness prior detrending procedure [36] with $\lambda=3000$. After resampling with cubic splines at 30 Hz, the power spectrum of each one-minute long RR time series was computed using the Fast Fourier Transform with a Hann window. The following

parameters were calculated from the raw RR time series: 1) mean R-R intervals (in ms); 2) standard deviation of all normal RR intervals (SDNN, ms); 3) square root of the mean square successive differences between successive normal intervals (RMSSD, ms). From the power spectrum the calculated parameters were: 4) the power in the low frequency band defined between 0.06 Hz and 0.85 Hz (LF); 5) the power in the high frequency band defined between 0.85 Hz and 3 Hz, 6) the central frequency of the power spectrum defined as that frequency in which the integration of the power spectrum from 0 Hz to CF Hz produces half the total power (CF); 7) the 95% power bandwidth defined as the range of frequencies centered on CF that contain the 95% of the total power (bw95, Hz) [37].

For each rat, the indices were averaged to a single 24-h period for each recording, and subsequently for two 12-h blocs corresponding to the light and the dark period of the light-dark cycle. One animal was excluded for presenting an increasing number of ectopic beats after 3 weeks of treadmill training.

2.5 Statistical analysis

Data was analyzed with the SPSS (v.17.0, SPSS Inc., USA) applying the one way analysis of variance (one-way ANOVA), and Bonferroni test was used for the *post hoc* comparisons between groups. A Repeated measures ANOVA was used to analyze heart rate (beats per minute), RR intervals and HRV indices over treadmill training, with 'session' and 'light-dark' as a within-subjects factors. The data obtained from the different weeks were compared by paired t-test. $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 Experiment 1: Hole-Board and Elevated Plus Maze

Results of experiment 1 indicated that CON and TM groups increased the time spent head-dipping ($F(2,24)=9.67$, $p=0.001$; Fig. 1C) in the hole-board whereas no effects appeared in the number of head dips ($F(2,24)=2.07$, n.s.; Fig. 1B) and ambulation counts ($F(2,24)=2.052$, n.s.; Fig. 1A). *Post-hoc* comparisons revealed that both, CON and TM groups spent more time head-dipping than SED group (Bonferroni: $p<0.01$). No differences were found in the number of total entries in the elevated plus maze ($F(2,19)=0.15$, n.s.; Fig. 2A), and a marginal significant effect was obtained in the percentage of entries in the open arms and the percentage of time spent in the open arms ($F(2,19)>2.73$, $p=0.094$ and $p=0.083$, respectively; Figs. 2B and 2C), suggesting decreased emotionality in the TM group compared with the SED group. In fact, TM animals increased the percentage of time and entries in the open arms as compared with SED animals ($p<0.05$ t-test), whereas CON animals did not reach such a difference. In the forced swimming test the three groups showed the same amount of immobility time during the testing session (SED: 259.7 ± 21.8 ; CON: 242.9 ± 13.9 ; TM: 240.9 ± 11.5).

3.2 Experiment 2: ECG recordings

Heart rate (Fig. 3A) was overall higher during the dark phase in comparison with the light phase (LD cycle: $F(1,4)=194.716$, $p<0.0001$), decreased over training (session: $F(2,8)=9.594$, $p<0.01$) and, the decrease was more pronounced in the dark phase (session x LD cycle interaction $F(2,8)=9.117$, $p<0.01$). Nine weeks of training significantly decreased heart rate in comparison with the baseline value ($p<0.05$ paired t-test), but this difference during the light phase of the LD cycle disappeared 3 weeks after the exercise had been interrupted. The analysis of the RR intervals revealed that the mean length of the interval increased as a result of training (session: $F(2,8)=18.74$, $p<0.01$; Fig.

3B) and was longer during the light period than during the dark period of the light-dark cycle ($F(1,4)=91.99$, $p<0.001$). The increase of the RR intervals recorded during the dark phase appeared to be significant from week 6, whereas the values recorded during the light phase reached significance from baseline at week 9 ($p<0.05$). In addition, RR intervals decreased over the sedentary period without treadmill training, the light measure of that record being not different from baseline value. Moreover, bw95 decreased over the training period ($F(2,8)=12.72$; $p<0.01$; Fig. 3D), and the effect was more pronounced during the light phase of the light-dark cycle in comparison with the dark phase ('weeks of training x light-dark' interaction: $F(2,8)=7.76$; $p<0.05$). The bw95 values recorded 3 weeks post exercise were greater than those recorded after 9 weeks of training ($p<0.05$), thus indicating again that the sedentary period reverted the change observed over training. In addition, bw95 did not differ from baseline after the three weeks of inactivity (Fig. 3D). Central frequency (CF) decreased over session ($F(2,8)=6.18$, $p<0.05$; Fig. 3C), but there were no effects or interactions with the light-dark factor on that variable. Finally, the analysis of the parameters calculated from the RR series showed that SDNN marginally increased over session ($F(2,8)=3.93$, $p=0.065$), whereas the rest of the variables analyzed did not show any significant effects (table 1).

4. Discussion

The behavioral results from the HB showed a similar behavioral pattern for the treadmill trained and the control groups. In comparison with the sedentary group, those two increased the exploration time. Exercise increased time in the open arms (EPM), suggesting decreased anxiety; whereas no differences were found regarding behavioral despair in the FST. A possible explanation for exploration is a main effect caused by the handling manipulation involved in the treadmill training procedure. It consisted of individually handling the subjects out of the home cage to be placed in the treadmill line for a daily period of 30 min. During the first minutes of that period, the subjects of the control group usually

explored the apparatus and the subject placed in the adjacent line; being ambulatory, rearing and sniffing behaviors initially observed and progressively decreased over the 30-min session. In another experiment performed in our laboratory, we have recently observed that treadmill handling over a long period can robustly affect the behavior in different tests [12], which is also in agreement with other authors.

For example, O'Callaghan *et al.* [38] found that not only 8 months of exercise, but also handling improved spatial learning and enhanced long-term potentiation in the dentate gyrus. This interpretation is also consistent with previous studies reporting increased exploratory behavior in early handled animals [39]. In fact, the effects of handling could be considered as a subtype of environmental enrichment [40], which has widely been proved as treatment to reduce anxiety and increase cognition [41]. Our experimental design including the SED, CON and TM groups allowed us to evaluate the effects of treadmill handling alone.

In the elevated plus maze, the trained animals showed an increase of 40-50% in the percentage of entries and time in the open arms of the maze, whereas the percentage of sedentary animals was around 20% in those variables. This result suggests that regular low-moderate forced training decreased anxiety and is in agreement with Fulk *et al.* [13] who reported a reduction of anxiety-like behavior in treadmill trained rats compared with sedentary animals that remained in their home cages. Moreover, other authors have also shown anxiolytic effects of more intensive training procedures (60-75% peak oxygen uptake for 50min; and 15m/min for 60min) [42, 43, respectively]. By contrast, Costa *et al.* [14] have recently evaluated the effects of different treadmill protocols and found that the only protocol that diminished anxiety in the middle-aged rats was one 20-min session per week (12m/min), whereas other protocols in which the frequency of the exercise sessions was higher increased anxiety in the elevated plus maze test. Thus, all those results indicate that in addition to the form of exercise, others parameters such as the intensity and the frequency can be crucial to determine the long-

term effects of the exercise. It has been hypothesized that exercise could reduce anxiety, because of exercise attenuates hyperresponsiveness of the HPA axis to other stressors [44], caused by an adrenal hypertrophy [12] that enhances capability of the HPA axis to respond to further challenges [45] like HB or EPM.

On the other hand, no effects of treadmill training were observed in the swimming forced test in the present study. This is in line with another study showing no significant changes [46], and contrasts with others reporting positive [17, 18] or negative effects [16]. In the studies of Marais et al. [18] and Huang and Lin [17], wheel running and treadmill training, respectively, reversed the increase of immobility time induced by early maternal deprivation; while Arunrut et al. [16] reported that treadmill exercise alone decreased swimming time, although exercise combined with a norepinephrine reuptake inhibitor increased climbing and diving in the tank. Thus, it is possible that such an antidepressant-like effect of exercise could be observed only in those circumstances where affective behavior had been impaired as a result of previous stress or other factors. With this in mind, we can not discard that regular low-moderate forced exercise could show the antidepressant-like effect in other circumstances and reveal that more experiments need to be done to conclude this point.

In the present study, regular low-moderate forced exercise significantly decreased heart rate and induced a progressive increase in the length of RR intervals, whereas the standard deviation of all normal RR intervals (SDNN) marginally increased over session. Moreover, low-moderate forced exercise also decreased two spectral indices of the power spectrum of RR time series such as the location of the dominant oscillator, measured by the central frequency (cf) and the bandwidth at 95% of power (bw95).

Although these indices need more evaluation, both measures appear to be related with stress, with lower values indicative of diminished stress [37]. The significance of spectral indices without band definition have

been recently suggested as an alternative analysis to account for the great differences in the mean heart rate among humans and rodents and the subsequent imprecise definition of very low, low and high frequency bands [21, 37]. In the present experiment, we did not observe significant changes of LH and HF bands over training although a tendency to increase SDNN over treadmill training sessions appeared (table 1). Heart rate variability has been briefly studied in rats. Few were addressed to evaluate the relationship between anxiety and cardiovascular function. Contradictory results were found, since social defeat reduced RR interval and HRV [47], but maternal separation plus restraint exerted no effects [48]. Other alternative cardiovascular parameters were also assessed. It has recently demonstrated that learning the startle task was correlated with increasing of blood pressure and decreasing of sympathetic tone [49]. Finally, only 1-day of ethanol withdrawal increased the QT dispersion (a parameter related with sudden death and ventricular arrhythmias) and the LF [50]. There are a few number of studies investigating the effects of regular moderate exercise on HRV; Li et al. [51] reported that an acute session of exercise reduced RR interval (or increases beats per minute), and it has been shown that intensive training protocols increased HRV in rats [31, 32]. Therefore, functional changes of moderate forced exercise upon HRV indices had not been reported yet, the present study being the first reporting an improvement in cf and bw95 indices of HRV [37]. This result concurs with the reduction of anxiety-like behavior observed in the elevated plus maze, and suggests that moderate exercise could be beneficial for the treatment of anxiety disorders and/or psychopathology of affective states [52]. The neurovisceral model of cardiac and emotion regulation proposes specific links between cardiovascular variability and anxiety disorders mediated by the medial prefrontal cortex and amygdala (among other brain areas) [28]. Moreover, low baseline high frequency HRV has been recently reported in panic, social, obsessive-compulsive and generalized anxiety disorders relative to healthy controls [53].

5. Conclusion

In conclusion, moderate-intensity aerobic treadmill exercise decreased emotional-like behavior in the elevated plus maze test. Regarding the indices of cardiovascular health, an increase of RR interval and a decrease of the spectral indices without band definition as a result of moderate-intensity aerobic exercise in adult rats are reported for the first time.

References of Manuscript Part 1

- 1 Blair, S.N.; Morris, J.N. Healthy Hearts—and the Universal Benefits of Being Physically Active: Physical Activity and Health. *Annals of Epidemiology* **2009**, *19*, 253-256.
- 2 Voss, M.W.; Nagamatsu, L.S.; Liu-Ambrose, T.; Kramer, A.F. Exercise, brain, and cognition across the life span. *Journal of Applied Physiology* **2011**, *111*, 1505-1513.
- 3 Silveira, H.; Moraes, H.; Oliveira, N.; Coutinho, E.S.F.; Laks, J.; Deslandes, A. Physical Exercise and Clinically Depressed Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuropsychobiology* **2013**, *67*, 61-68.
- 4 van Praag, H. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neuroscience* **2009**, *32*, 283-290.
- 5 Haskell, W.L.; Lee, I.; Pate, R.R.; Powell, K.E.; Blair, S.N.; Franklin, B.A.; Macera, C.A.; Heath, G.W.; Thompson, P.D.; Bauman, A. Physical activity and public health-Updated recommendation for adults from the American college of sports medicine and the American heart association. *Circulation* **2007**, *116*, 1081-1093.
- 6 Radak, Z.; Chung, H.Y.; Koltai, E.; Taylor, A.W.; Goto, S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews* **2008**, *7*, 34-42.
- 7 Chennaoui, M.; Merino, D.G.; Lesage, J.; Drogou, C.; Guezennec, C.Y. Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats. *Acta Physiologica Scandinavica* **2002**, *175*, 113-121.

- 8 Walsh, N.P.; Gleeson, M.; Shephard, R.J.; Gleeson, M.; Woods, J.A.; Bishop, N.C.; Fleshner, M.; Green, C.; Pederson, B.K.; Hoffman-Goetz, L.; Rogers, C.J.; Northoff, H.; Abbasi, A.; Simon, P. Position Statement Part one: Immune function and exercise. *Exercise Immunology Review* **2011**, *17*, 6-63.
- 9 Burghardt, P.R.; Fulk, L.J.; Hand, G.A.; Wilson, M.A. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Research* **2004**, *1019*, 84-96.
- 10 Leasure, J.L.; Jones, M. Forced and Voluntary Exercise Differentially Affect Brain and Behavior. *Neuroscience* **2008**, *156*, 456-465.
- 11 García-Capdevila, S.; Portell-Cortés, I.; Torras-Garcia, M.; Coll-Andreu, M.; Costa-Miserachs, D. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behavioural Brain Research* **2009**, *202*, 162-170.
- 12 Lalanza, J.F.; Sanchez-Roige, S.; Gagliano, H.; Fuentes, S.; Bayod, S.; Camins, A.; Pallàs, M.; Armario, A.; Escorihuela, R.M. Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 1745-1754.
- 13 Fulk, L.J.; Stock, H.S.; Lynn, A.; Marshall, J.; Wilson, M.A.; Hand, G.A. Chronic physical exercise reduces anxiety-like behavior in rats. *International Journal of Sports Medicine* **2004**, *25*, 78-82.
- 14 Costa, M.S.; Ardais, A.P.; Fioreze, G.T.; Mioranza, S.; Botton, P.H.S.; Portela, L.V.; Souza, D.O.; Porciúncula, L.O. Treadmill running frequency on anxiety and hippocampal adenosine receptors density in adult and middle-aged rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **2012**, *36*, 198-204.
- 15 Gorton, L.M.; Vuckovic, M.G.; Vertelkina, N.; Petzinger, G.M.; Jakowec, M.W.; Wood, R.I. Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse. *Behavioural Brain Research* **2010**, *213*, 253-262.
- 16 Arunrut, T.; Alejandre, H.; Chen, M.; Cha, J.; Russo-Neustadt, A. Differential behavioral and neurochemical effects of exercise, reboxetine and citalopram with the forced swim test. *Life Science* **2009**, *84*, 584-589.

- 17 Huang, T.; Lin, C. A comparison between chronic exercise training and desipramine as treatments for the depression-like behavior of early-life maternal deprivation rats. *Neuroscience Letters* **2010**, *480*, 201-205.
- 18 Marais, L.; Stein, D.J.; Daniels, W.M.U. Exercise increases BDNF levels in the striatum and decreases depressive-like behavior in chronically stressed rats. *Metabolic Brain Disease* **2009**, *24*, 587-597.
- 19 Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *European Heart Journal* **1996**, *17*, 354-381.
- 20 Lavie, C.J.; Thomas, R.J.; Squires, R.W.; Allison, T.G.; Milani, R.V. Exercise Training and Cardiac Rehabilitation in Primary and Secondary Prevention of Coronary Heart Disease. *Mayo Clinic Proceedings* **2009**, *48*, 373-383.
- 21 Aubert, A.E.; Vandeput, S.; Beckers, F.; Liu, J.; Verheyden, B.; Van Huffel, S. Complexity of cardiovascular regulation in small animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical Physical and Engineering Sciences* **2009**, *367*, 1239-1250.
- 22 Rodas, G.; Pedret, C.; Ramos, J.; Capdevila, L. Variabilidad de la frecuencia cardiaca: concepto, medidas y relación con aspectos clínicos (parte I). *Archivos de Medicina del Deporte* **2008**, *25*, 41-47.
- 23 Thayer, J.F.; Yamamoto, S.S.; Brosschot, J.F. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *International Journal of Cardiology* **2010**, *141*, 122-131.
- 24 Routledge, F.S.; Campbell, T.S., McFetridge-Durdle, J.A., Bacon, S.L. Improvements in heart rate variability with exercise therapy. *Canadian Journal of Cardiology* **2010**, *26*, 303-312.
- 25 Kemp, A.H.; Quintana, D.S.; Gray, M.A.; Flemingham, K.L.; Brown, K.; Gatt, J.M. Impact of Depression and Antidepressant Treatment on Heart Rate Variability: A Review and Meta-Analysis. *Biological Psychiatry* **2012**, *67*, 1067-1074.

- 26 Haensel, A.; Mills, P.J.; Nelesen, R.A.; Ziegler, M.G.; Dimsdale, J.E. The relationship between heart rate variability and inflammatory markers in cardiovascular diseases. *Psychoneuroendocrinology* **2008**, *33*, 1305-1312.
- 27 Hansen, A.L.; Johnsen, B.H.; Thayer, J.F. Relationship between heart rate variability and cognitive function during threat of shock. *Anxiety Stress Coping* **2009**, *22*, 77-89.
- 28 Thayer, J.F.; Lane, R.D. Claude Bernard and the heart-brain connection: Further elaboration of a model of neurovisceral integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **2009**, *33*, 81-88.
- 29 Kemp, A.H.; Quintana, D.S. The relationship between mental and physical health: Insights from the study of heart rate variability. *International Journal of Psychophysiology* **2013**, *89*, 288-296.
- 30 Gaburro, S.; Stiedl, O.; Giusti, P.; Sartori, S.B.; Landgraf, R.; Singwald, N. A mouse model of high trait anxiety shows reduced heart rate variability that can be reversed by anxiolytic drug treatment. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **2011**, *14*, 1341-1355
- 31 Lachance, D.; Plante, E.; Bouchard-Thomassin, A.; Champetier, S.; Roussel, E.; Drolet, M.; Arsenault, M.; Couet, J. Moderate Exercise Training Improves Survival and Ventricular Remodeling in an Animal Model of Left Ventricular Volume Overload. *Circulation: Heart Failure* **2009**, *2*, 437-445.
- 32 Moraes-Silva, I.C.; De La Fuente, R.N.; Mostarda, C.; Rosa, K.; Flues, K.; Damaceno-Rodrigues, N.R.; Caldini, E.G.; De Angelis, K.; Krieger, E.M.; Irigoyen, M.C. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **2010**, *37*, e114-e120.
- 33 Sanches, I.C.; Sartori, M.; Jorge, L.; Irigoyen, M.C.; De Angelis, K. Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2009**, *42*, 942-948.

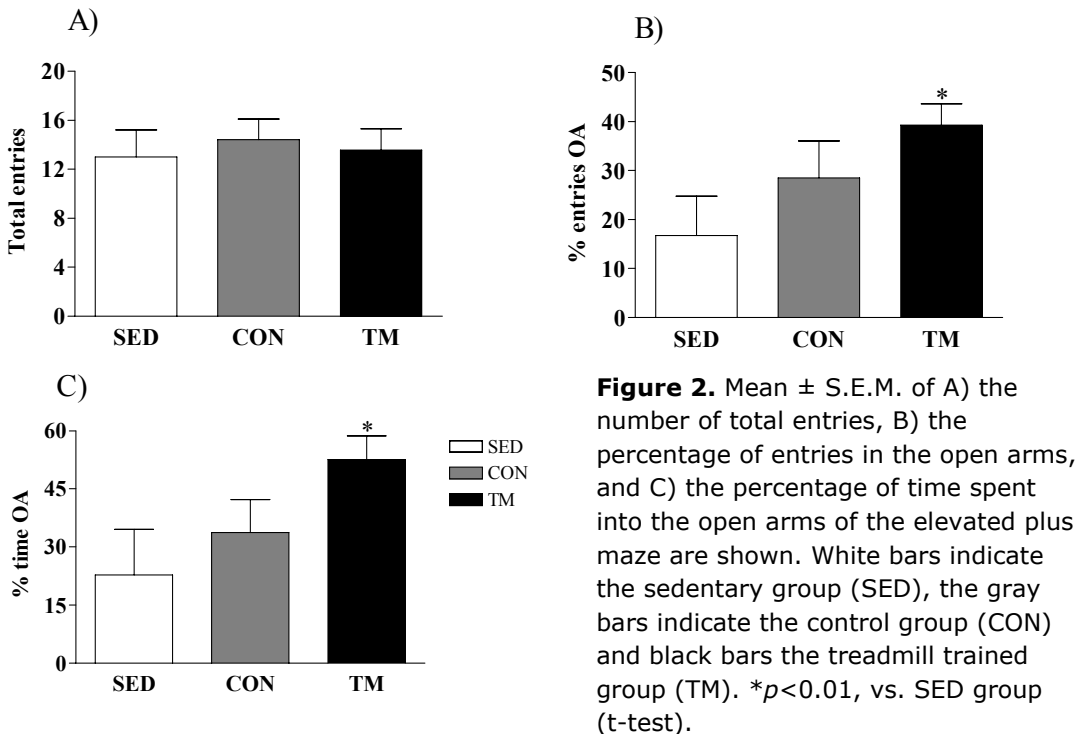
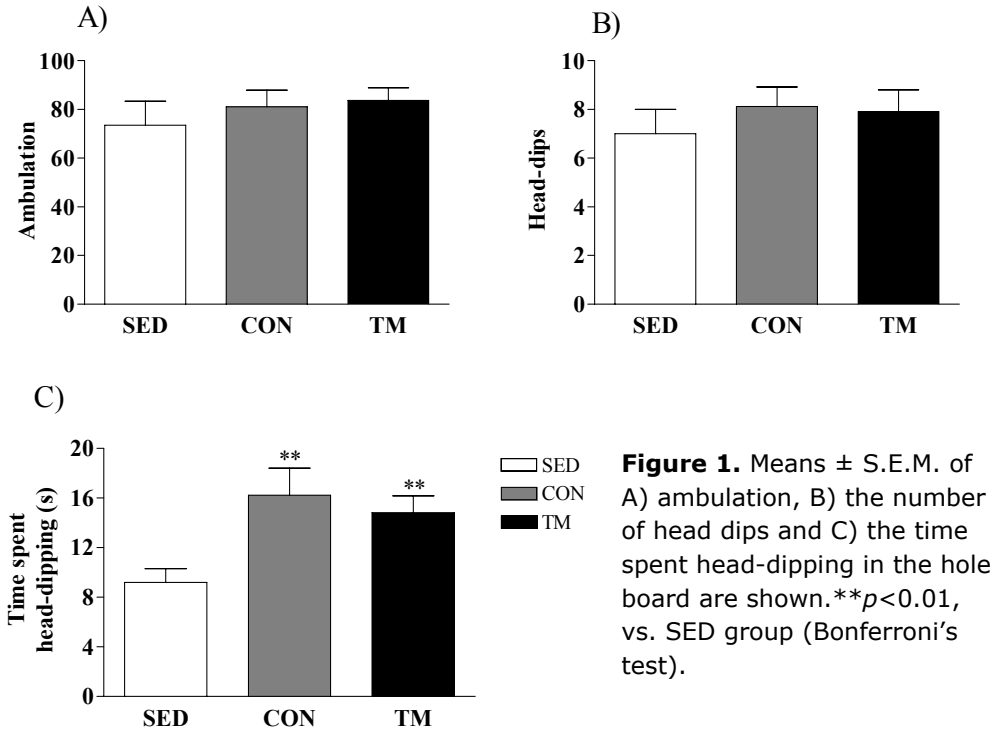
- 34 Stranahan, A.M.; Khalil, D.; Gould, E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nature Neuroscience* **2006**, *9*, 526-533.
- 35 Pan, J.; Tompkins, W.J. A Real-Time QRS Detection Algorithm. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* **1985**, *32*, 230-236.
- 36 Tarvainen, M.P.; Ranta-aho P.O.; Karjalainen, P.A. An advanced detrending method with application to HRV analysis. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* **2002**, *49*, 172-175.
- 37 Garcia-Gonzalez, M.A.; Fernandez-Chimeno, M.; Ferrer, J.; Escorihuela, R.M.; Parrado, E.; Capdevila, L.; Benitez, A.; Angulo, R.; Rodriguez, F.A.; Iglesias, X.; Bescos, R.; Marina, M.; Padullés, J.M.; Ramos-Castro, J. New indices for quantification of the power spectrum of heart rate variability time series without the need of any frequency band definition. *Physiological Measurement* **2011**, *32*, 995-1009.
- 38 O'Callaghan, R.M.; Griffin, E.W.; Kelly, A.M. Long-Term Treadmill Exposure Protects Against Age-Related Neurodegenerative Change in the Rat Hippocampus. *Hippocampus* **2009**, *19*, 1019-1029.
- 39 Fernandez-Teruel, A.; Gimenez-Llort, L.; Escorihuela, R.M.; Gil, L.; Aguilar, R.; Steimer, T.; Tobeña, A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment - Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology Biochemistry Behavior* **2002**, *73*, 233-245.
- 40 Simpson, J.; Kelly, J.P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research* **2011**, *222*, 246-264.
- 41 Nithianantharajah, J.; Hannan, A. Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Neuroscience Reviews* **2006**, *7*, 697-709.
- 42 Mello, P.B.; Benetti, F.; Cammarota, M.; Izquierdo, I. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiology of Learning and Memory* **2009**, *92*, 364-369.
- 43 Salim, S.; Sarraj, N.; Taneja, M.; Saha, K.; Tejada-Simon, M.V.; Chugh, G. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-

- induced anxiety-like behavior in rats. *Behavioural. Brain Research* **2010**, *208*, 545-552.
- 44 White-Welkley, J.E.; Bunnell, B.N.; Mougey, E.H.; Meyerhoff, J.L.; Dishman, R.K. Treadmill Exercise Training and Estradiol Differentially Modulate Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Cortical Responses to Acute Running and Immobilization. *Physiology & Behavior* **1995**, *57*, 533-540.
- 45 Armario, A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurological Disorders - Drug Targets* **2006**, *5*, 485-501.
- 46 Yoo, H.S.; Bunnell, B.N.; Crabbe, J.B.; Kalish, L.R.; Dishman, R.K. Failure of 2 neonatal clomipramine treatment to alter forced swim immobility: chronic treadmill or 3 activity-wheel running and imipramine. *Physiology & Behavior* **2000**, *70*, 407-411.
- 47 Sévoz-Couche, C.; Brouillard, C.; Camus, F.; Laude, D.; De Boer, S.F.; Becker, C.; Benoliel, J.-J. Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarius in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats. *The Journal of Physiology* **2013**, *591*, 1871-1887.
- 48 Trombini, M.; Hulshof, H.J.; Graiani, G.; Carnevali, L.; Meerlo, P.; Quaini, F.; Sgoifo, A. Early maternal separation has mild effects on cardiac autonomic balance and heart structure in adult male rats. *Stress* **2012**, *15*, 457-470.
- 49 Hsu, Y.-C.; Yu, L.; Chen, H.-I.; Lee, H.-L.; Kuo, Y.-M.; Chauying, J.J. Blood Pressure Variations Real-Time Reflect the Conditioned Fear Learning and Memory. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32855.
- 50 Shirafuji, S.; Liu, J.; Okamura, N.; Hamada, K.; Fujimiya, T. QT Interval Dispersion and Cardiac Sympathovagal Balance Shift in Rats with Acute Ethanol Withdrawal. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **2010**, *34*, 223-230.
- 51 Li, J.; Kuo, T.B.J.; Hsieh, S.S.Y.; Yang, C.C.H. Changes in electroencephalogram and heart rate during treadmill exercise in the rat. *Neuroscience Letters* **2008**, *434*, 175-178.
- 52 Gaul-Alácová, P.; Boucek, J.; Stejskal, P.; Kryl, M.; Pastucha, P.; Pavlík, F. Assessment of the influence of exercise on heart rate

variability in anxiety patients. *Neuro Endocrinol Lett.* **2005**, *26*, 713-718.

- 53 Pitting, A.; Arch, J.J.; Lam, C.W.R.; Craske, M.G. Heart rate and heart rate variability in panic, social anxiety, obsessive-compulsive, and generalized anxiety disorders at baseline and in response to relaxation and hyperventilation. *International Journal of Psychophysiology* **2013**, *87*, 19-27.

Figures and Tables



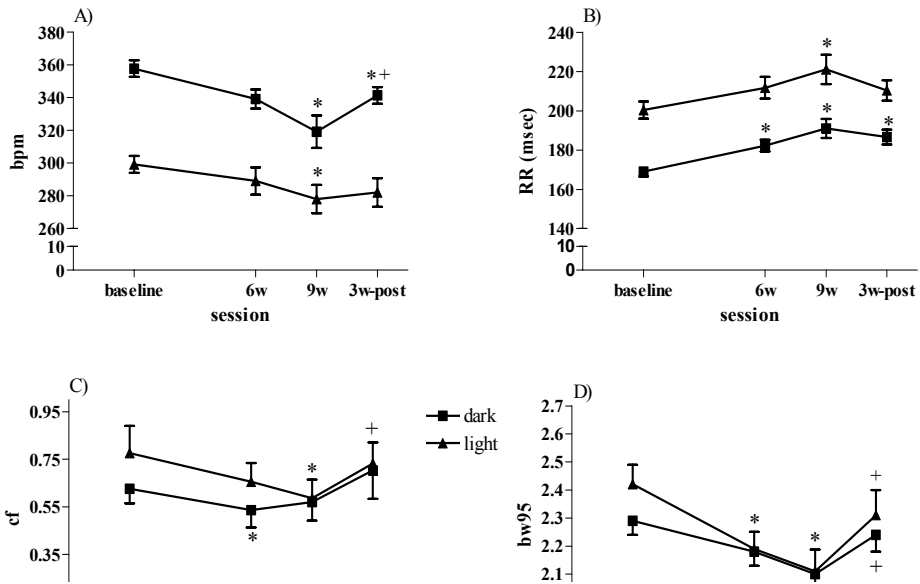


Figure 3. Low-moderate treadmill training over 9 weeks decreased heart rate (A), and increased RR intervals (B). The two indices of heart rate variability, C) central frequency (cf) and D) bandwidth 95 (bw95) also decreased over training. Mean \pm S.E.M. during the light (triangles) and the dark (squares) phases of the light-dark cycle, previously to start treadmill training (baseline), 6 weeks (6w) and 9 weeks (9w) after physical exercise was initiated and, 3 weeks after exercise was finished (3w-post). Those changes observed over the treadmill sessions decreased after 3 sedentary weeks (3w-post). * $p < 0.05$ vs baseline, and + $p < 0.05$ vs 9w (paired t-test).

Table 1. HRV parameters (mean \pm S.E.) averaged over the corresponding weekend recording (baseline, 6 weeks or 9 weeks after the treadmill training started, and 3 weeks after the treadmill training finished). SDNN, Standard deviation of RR intervals; RMSSD, square root of the mean square successive differences between successive normal intervals; LF, power in the low frequency band; HF, power in the high frequency band.

	Dark				Light			
	baseline	6w	9w	3w- post	baseline	6w	9w	3w- post
SDNN	7.28 \pm	7.86	8.67 \pm	8.35 \pm	7.34 \pm	8.18	9.38 \pm	8.83 \pm
(ms)	0.75	0.85	1.02	0.82	0.64	\pm	1.26	0.79
RMSSD	3.19 \pm	3.35	4.46 \pm	4.34 \pm	3.87 \pm	3.94	5.26 \pm	5.10 \pm
(ms)	0.52	\pm .49	0.91	0.59	0.83	\pm	1.58	0.91
LF	7.89 \pm	8.73	14.34	13.09	6.89 \pm	8.05	18.19	13.14
(ms²)	1.75	2.31	\pm 5.46	\pm 2.74	1.59	\pm	\pm	\pm 5.39
HF	3.55 \pm	3.76	7.99	6.62	5.69 \pm	5.19	11.72	8.85 \pm
(ms²)	0.97	0.89	\pm 3.70	\pm 1.91	2.16	\pm	\pm 7.16	3.47
						1.30		

Part 2A: Conseqüències fisiològiques i conductuals d'un exercici moderat a llarg termini a la cinta ergomètrica

En aquesta segona part avaluem els efectes a llarg termini de l'exercici moderat i regular en resposta a situacions d'estrès i en aprenentatge en situacions de conflicte.

Resposta d'estrès

En Lanza *et al.* (2012) hem demostrat que després de 36 setmanes d'exercici moderat i regular (12m/min) les rates entrenades mostraren una resposta hormonal de l'eix HPA disminuïda immediatament després d'un estímul estressant d'intensitat mitjana (exposició a la novetat) i, també, immediatament després d'una situació molt aversiva, com és la fase inicial de l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits a la gàbia *Shuttle Box* (en ACTH). A més a més, en mesures de corticosterona immediatament després de la *Shuttle Box* i al cap de 30min les rates entrenades es van recuperar més ràpid que les no entrenades. Aquest resultat demostra una major capacitat de les rates TM en recuperació neuroendocrina, i de funció de l'eix HPA en general. Les rates TM també presentaren una glàndula suprarenal més gran, en coherència amb resultats anteriors. No hi va haver diferències entre grups en nivells basals d'hormones. Cal afegir que l'exercici reduí els nivells de colesterol i triglicèrids, en concordància amb els efectes esperats. L'aportació novedosa d'aquest treball demostra per primera vegada que l'exercici forçat de moderada intensitat practicat a llarg termini pot reduir la resposta d'estrès en rates adultes.

Manipulació

En la primera part havíem trobat que l'exercici augmentava l'exploració al *Hole Board*, la conducta als braços oberts de l'*Elevated Plus Maze* i a l'*Open Field*, en comparació a les rates SED. No obstant, no hi va haver diferències en comparació amb el grup CON, la qual cosa indica que la manipulació per si sola té efectes similars als de l'exercici en aquestes proves. Les rates CON tampoc va mostrar una menor ansietat que el sedentari. Les dades hormonals de la segona part indiquen que la

manipulació no modifica significativament la resposta de l'eix HPA a estímuls estressants, mentre que l'exercici disminueix significativament la resposta a l'estrès.



Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise

Jaume F. Lanza^{a,c}, Sandra Sanchez-Roige^a, Humberto Gagliano^b,
Silvia Fuentes^b, Sergi Bayod^{d,e}, Antoni Camins^{d,e}, Mercè Pallàs^{d,e},
Antonio Armario^{b,*}, Rosa M. Escorihuela^{a,**}

^a Institut de Neurociències, Dept. de Psiquiatria i Medicina Legal, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^b Red de trastornos adictivos (RTA) and Institut de Neurociències, Unitat de Fisiologia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^c Departament de Psicologia Bàsica, Evolutiva i de l'Educació, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^d Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain

^e Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

Received 22 December 2011; received in revised form 7 March 2012; accepted 8 March 2012

KEYWORDS

Long-term moderate exercise;
Treadmill;
Hole board;
Elevated plus maze;
Open field;
Stress responsiveness;
ACTH;
Corticosterone;
Metabolism

Summary The benefits of long-term moderate exercise for health are widely accepted in humans, but few animal studies have been undertaken to characterize the effects of such activity on emotionality and responsiveness to stress. The present study describes the effects of long-term moderate forced treadmill training (36 weeks) on exploratory activity, anxiety-like behaviour, and the resting or stress levels of some physiological variables, including pituitary-adrenal (PA) hormones. Five-week-old male Sprague-Dawley rats were trained on the treadmill (TM) for 36 weeks, using a more moderate training (12 m/min, 30 min/day, 4–5 days/week) than that currently used in the literature. Two groups were used as controls: a non-handled sedentary (SED) group, receiving no manipulation, and a control (CON) group exposed to a stationary treadmill for the same amount of time as the TM group. In accordance with literature data, TM rats showed lower resting levels of glucose, triglycerides and cholesterol than the other two groups. The TM and CON groups both showed higher ambulation than the SED group in some behavioural tests, without evidence for altered anxiety. Resting levels of adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone did not differ among the groups, but a reduced ACTH response to both a novel environment (mild stressor) and an active escape-avoidance task (severe stressor) was observed in TM rats, whereas changes in corticosterone were modest. The results support the view that the physiological consequences of long-term moderate training are beneficial, including reduced PA responsiveness to stress, even though exercise training did not affect anxiety-like behaviour.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Animal Physiology Unit (Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology), School of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain. Tel.: +34 93 5811840; fax: +34 935812390.

** Corresponding author at: Department of Psychiatry and Forensic Medicine, School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain. Tel.: +34 93 5813296; fax: +34 935811435.

E-mail addresses: antonio.armario@uab.es (A. Armario), rosamaria.escorihuela@uab.cat (R.M. Escorihuela).

1. Introduction

Considerable evidence now supports the idea that an active lifestyle produces benefits for overall health, preventing cardiovascular diseases (Blair and Morris, 2009; Crimi et al., 2009), enhancing cognitive function (Dishman et al., 2006; Kramer et al., 2006; Cotman et al., 2007; van Praag, 2009) and improving mood (Russo-Neustadt et al., 2001; Greenwood et al., 2003; Deslandes et al., 2009; Marais et al., 2009). Exercise has also been associated with a reduced risk of dementia and could help to reduce late-life cognitive impairment (Kramer et al., 1999; Colcombe and Kramer, 2003; Abbott et al., 2004; Weuve et al., 2004), although the oldest age at which starting physical activity can benefit cognition has still not been determined (Bunce and Murden, 2006).

Exercise of moderate intensity for 30 min, five days per week, has been widely recommended for humans (Haskell et al., 2007; Nelson et al., 2007), but there are few studies specifically aimed at characterizing the exercise conditions (intensity and duration) that can produce the most robust effects in both healthy people and those with pathological conditions (Kramer et al., 2006; Rolland et al., 2010). It is unclear the extent to which increased levels of exercise can exert additional healthy effects (Blair et al., 2004), but there is evidence that moderate exercise is better than excessive exercise and over-training in terms of improvement of cardiovascular function, upregulation of the immune system or modulation of redox homeostasis (Radak et al., 2008).

It is well accepted that exercise improves cognition in humans (van Praag, 2009) and most data in animals favour this hypothesis, although the effects are not always consistent. For instance, wheel running in rats for 13 months (from 5 to 18 months of age) showed no protective effect on spatial memory (Hansalik et al., 2006). In contrast, in another study, improvement of age-related impairment of spatial learning and associated cellular mechanisms (long-term potentiation, LTP, in the dentate gyrus) was observed in middle-age rats after 8 months of treadmill training (O'Callaghan et al., 2009). Quite interestingly, in the latter study, the beneficial effect was also observed in the group of animals receiving the same treatment in a stationary treadmill, suggesting a contribution of enriched environmental information acquired by the animals, rather than a specific contribution of exercise.

Less is known about the influence of exercise on emotional reactivity and anxiety-like behaviour in experimental animals. Indeed, to our knowledge, there have been no animal studies about the influence of prolonged periods of exercise (several months) on these two aspects of behaviour. With shorter periods of exercise (1–10 weeks), the results are clearly inconsistent and cannot be explained by the species used (rat or mice), the type of exercise (wheel running vs. treadmill), the period of exposure, or the age of the animals (e.g. Dishman et al., 1996; Fulk et al., 2004; Trejo et al., 2008; García-Capdevila et al., 2009; Fuss et al., 2010). There are two possible reasons for these inconsistencies. First, exercise-trained animals are exposed to handling and other manipulations that can reduce the response to such procedures, as compared to non-trained (sedentary) animals that have not been subjected to the same manipulations. Second, although certain training procedures may initially increase anxiety, this effect may progressively disappear over time,

thereby, making long-lasting exercise training the most appropriate protocol for discovering any real beneficial effects of exercise on anxiety.

Given the critical role of glucocorticoids on cognitive function and aging-associated neurodegeneration (de Kloet et al., 1999), considerable attention has been paid to the influence of exercise on the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, one of the key systems in the response to stress (Armario, 2006). Although it is well documented that acute exercise can activate the HPA axis, less is known about the influence of long-lasting exercise on resting HPA function, and its responsiveness to additional superimposed stressors. Moreover, all studies have used a relatively short period of training (2–10 weeks). The general pattern is that increases in resting levels of corticosterone can be observed during the first week after wheel running, with normalization after 4 or 8 weeks (Fediuc et al., 2006; Campbell et al., 2009). This pattern results in null or small effects of prolonged periods of exercise on resting levels of HPA hormones, either in rats or mice (Watanabe et al., 1991, 1992; Chennaoui et al., 2002; Droste et al., 2003, 2006, 2007). Regarding the PA response to predominantly emotional stressors, normal (Chennaoui et al., 2002; Droste et al., 2006, 2007) or reduced (Watanabe et al., 1992; Droste et al., 2003) response has usually been reported.

On the basis of the above studies, the main objective of the present work was to characterize the still untested effects of a long-term regular moderate exercise procedure (36 weeks) on exploratory and anxiety behaviour, HPA function, cholesterol and triglyceride levels in adult male rats. The treadmill model was used to administer the same amount and intensity of exercise to the animals throughout the entire period of training, thereby, avoiding the differences described with voluntary running models (Narath et al., 2001; García-Capdevila et al., 2009). Furthermore, an additional control group of rats, which was exposed to the stationary treadmill, was included to rule out a specific influence on the variables of interest, by daily handling and other procedures associated to treadmill exposure.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Sprague-Dawley rats (from the *Servei d'Estabulari, Universitat Autònoma de Barcelona*) were used. They were housed 2 per cage in standard macrolon cages (40 cm in length × 23 cm in width × 18 cm in depth) and maintained under 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 08:00 h) in standard conditions of temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($50 \pm 10\%$), with free access to food and water. Animals, which were 5 weeks old at the start of the training, were randomly assigned to three groups, balancing the total body weight before starting the training sessions: sedentary (SED, $n = 8$, 95.85 ± 4.8 g), control (CON, $n = 8$, 102.2 ± 5.2 g) and treadmill (TM: $n = 11$, 99.4 ± 3.7 g). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the *Universitat Autònoma de Barcelona*, and was carried out following the 'Principles of laboratory animal care', in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

2.2. Moderate forced treadmill training procedure

Two treadmills were used, each consisting of 3 parallel runways (35 cm × 8 cm × 24 cm, Cibertec, Spain; and 45 cm × 11 cm × 12 cm, Columbus Instruments, USA) without inclination. Training sessions were conducted in the colony room, 4–5 days per week, between 1330 h and 1630 h, and lasted for 30 min. Subjects were habituated to the treadmill for 30 min (0 m/min) on the first day, to minimize novelty-induced stress. Exercise training began gently the day after, and the intensity of the treadmill speed was gradually increased until reaching a maximum intensity of 12 m/min, which was maintained until the end of the experiment. The treadmill (TM) and control (CON) rats were weighed daily before being placed in the treadmill. The CON rats stayed in a stationary treadmill (0 m/min) for the same number of sessions and the same amount of time as the TM rats. The SED rats remained in their own cages and were weighed weekly. Neither electrical shock nor physical prodding was used to motivate the animals. During the first sessions, some animals slowed their gait over the session and displaced towards the back wall of the lane; on such occasions they were gently pushed by hand for a few seconds to stay at the front part of the lane. Despite these cautions, 25% of the rats had to be rejected from the experiment because they refused to run. This percentage is similar to that reported by other authors (Dishman et al., 2000). Rats were trained for 36 weeks, receiving a total of 152 sessions. Behavioural tests were intercalated between the last 20 sessions to avoid training interruption and a possible decrease in the effects of exercise.

2.3. Behavioural procedures

All experiments were performed in a room painted black and illuminated by one 40 W bulb or two 40 W bulbs, in the experiments where the two animals of the same cage were being simultaneously tested on two separate apparatus. The testing battery was administered over five weeks between 09:00 h and 14:00 h (except for basal hormones, see physiological variables) as follows: hole board, day 1; basal hormones, day 3; elevated plus maze, day 7; open field, day 14; and the shuttle box stress test for escape-avoidance behaviour, day 31. Apparatus were cleaned with a 20% ethanol solution after each rat.

2.3.1. Hole-board test

The two hole-board (HB) apparatus were beige wooden boxes (66 cm × 66 cm × 47 cm), with four equidistant holes (3.7 cm diameter, 18 cm deep) on the floor, which were divided into 16 equal squares with red lines. A score was kept of the number of head dips (HD), the time spent head dipping, and the number of crossings. The two animals housed in the same home cage were tested simultaneously, and were recorded by two cameras; each placed 140 cm above one of the two hole-board apparatus. The rat was placed into the centre of the arena and allowed to explore it for 15 min and then, immediately afterwards, blood was taken from each rat by tail nick (see below) in a different room.

2.3.2. Elevated plus maze (EPM)

The EPM consisted of four arms made of black Formica, extending from a 10-cm square centre positioned 90° from each other to form the shape of a plus sign. Each arm was 50 cm long and 10 cm wide. Two opposing arms had wooden walls (enclosed arms, 40 cm high), whereas the other two were open arms with a 0.5 cm ridge to provide additional grip. The whole maze was elevated 50 cm above the floor. The rat was placed in the centre of the maze facing a closed arm, and during the 5 min test the following data were recorded: total entries; entries in open and enclosed arms; time in enclosed and open arms, as well as in the central area; latency to enter for the first time into an open arm; and the number of defecations. An entry was defined as "placing all four paws into a given arm".

2.3.3. Open field (OF)

A 10-min OF session was administered. The two animals of the same home cage were tested simultaneously in two identical apparatus, which each consisted of a white open arena (100 cm × 50 cm × 45 cm) made of white Plexiglas. The animal was placed in the centre of the arena and the distance travelled was measured using video tracking software (View-Point S.A.).

2.3.4. Shuttle box (SB)

Shuttle Box apparatus (Panlab, S.L.) was divided into two equally sized compartments (25 cm × 25 cm × 25 cm) connected by an opening door (8 cm wide and 10 cm high). A trial consisted of simultaneously presenting a light (7 W, 10 s) and a sound (2400 Hz at 40 dB) stimulus, followed immediately by a scrambled electric shock (0.6 mA), which was administered through the metal grid floor of the box. Animals received 30 trials for a period of 30 min, with an inter-trial interval of 15 s.

2.4. Physiological variables

Plasma levels of some physiological variables were measured under resting conditions or in response to stress. Samples were taken by tail nick (ACTH, corticosterone, glucose) or by decapitation (cholesterol, triglycerides). The tail nick was carried out by gently wrapping the animals with a cloth, making a 2-mm incision at the end of the tail vein and then massaging the tail whilst collecting, within 2 min, 300 µl of blood into ice-cold EDTA capillary tubes (Sarsted, Granollers, Spain). The two cage-mated animals were sampled simultaneously by two experimenters in a separate room from the colony room and the testing room.

To evaluate the HPA response to a mild stressor, the animals were exposed for 15 min to the HB in a testing room. Immediately afterwards, the animals were transported to another room and sampled. This time point was chosen because 15 min is the minimum time needed for plasma corticosterone to reflect initial ACTH release (Armario, 2006). To evaluate the HPA axis response to a more severe stressor, the animals were previously exposed to the SB. Immediately after the SB session, and again 30 min after its termination (SB30), rats were sampled by tail nick. Basal samples were taken two days after the HB exposure, on a day when neither behavioural testing nor treadmill training was being undertaken to prevent possible interferences with

hormonal data. Sampling was carried out, under resting conditions, during the morning (09:00–10:00 h) and during the evening (19:00–20:00 h).

2.5. Radioimmunoassays

Plasma ACTH and corticosterone levels were determined by double-antibody radioimmunoassay (RIA). In brief, ACTH RIA used ¹²⁵I-ACTH (PerkinElmer Life Science, Boston, USA) as the tracer, rat synthetic ACTH 1–39 (Sigma, Barcelona, Spain) as the standard and an antibody raised against rat ACTH (rb7) kindly provided by Dr. W.C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA). The characteristics of the antibody have been described previously (Engeland et al., 1989), and we followed a non-equilibrium procedure. Corticosterone RIA used ¹²⁵I-corticosterone-carboxymethylloxime-tyrosine-methyl ester (ICN-Biolink 2000, Barcelona, Spain), synthetic corticosterone (Sigma, Barcelona, Spain) as the standard, and an antibody raised in rabbits against corticosterone-carboxymethylloxime-BSA kindly provided by Dr. G. Makara (Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary). The characteristics of the antibody and the basic RIA procedure have been described previously (Zelena et al., 2003). All samples to be statistically compared were run in the same assay to avoid inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was 3.8% for ACTH and 7.8% for corticosterone. The sensitivity of the assays was 12.5 pg/ml for ACTH and 0.1 µg/dl for corticosterone.

2.6. Cholesterol and triglyceride determination

Blood samples for cholesterol and triglyceride determinations were collected in 5% EDTA-tubes at the time of death; plasma was obtained by centrifugation and stored at –80 °C until needed. Plasma triglyceride and cholesterol concentrations were measured by using the colorimetric test kits for triglyceride and cholesterol, respectively, from Wako Chemicals GmbH (Neuss, Germany).

2.7. Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the ‘Statistical Package for Social Sciences’ (SPSS, version 17.0), using one-way ANOVA and repeated measures ANOVA. All values are expressed as mean ± standard error for the mean. All post hoc contrasts were carried out with Bonferroni correction, with *p* < 0.05 considered to be significant.

3. Results

3.1. Body weight

Body weights were analysed by repeated measures ANOVA with treatment as the between-subjects factor and age as the within-subjects factor. The ages included in the analysis were: 4 weeks (pre-exercise), 5 weeks (1 week after treadmill training had started) and 9, 13, 17, 21, 25, 29, and 33 weeks. The analysis indicated (Fig. 1) a significant effect of age [*F*(8, 160) = 1857.4; *p* < 0.0001], but not for group or interaction [*F*(2, 20) = 0.64, ns; age*group: *F*(16, 160) = 0.54, ns; respectively].

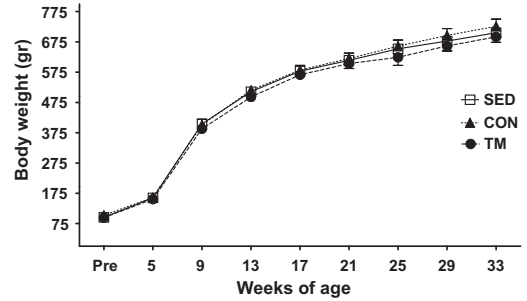


Figure 1 Mean (±SEM) of the body weight changes over the weeks of the training period. Groups were: sedentary (SED), control (CON) and treadmill (TM) (*n* = 7–8/group). No significant differences were observed between groups.

3.2. Hole board

A repeated measure ANOVA was used to analyse exploratory behaviour in the HB, with groups as the between-subjects factor and time (3 time bins of 5 min) as the within-subjects factor. The analysis of the number of head dips did not show any significant main effect or interaction [Fig. 2A; group:

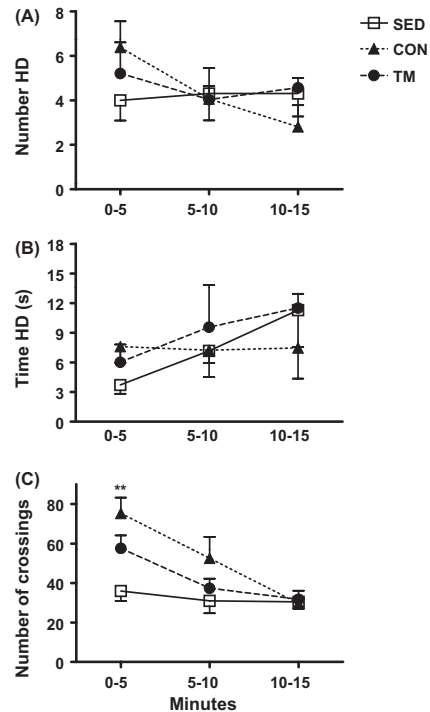


Figure 2 Control group (CON) made more crossings (C) than the sedentary group (SED), during the first 5 min of the hole-board test. Mean ± SEM of (A) the number of head dips, (B) the time spent head dipping, and (C) the number of crossings are shown over 3 time bins of 5 min in the hole-board test. TM, treadmill group (*n* = 7–8/group). ***p* < 0.01 vs. SED (Bonferroni).

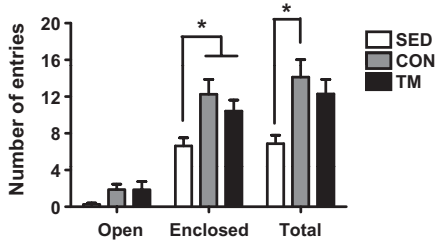


Figure 3 Animals in the sedentary (SED) group showed a reduced number for enclosed and total entries in the elevated plus maze. This figure shows the mean \pm SEM of number of total entries and entries in both open and closed arms. CON, control group; TM, treadmill group ($n = 7-8$ /group). * $p < 0.05$ (Bonferroni) between the indicated groups.

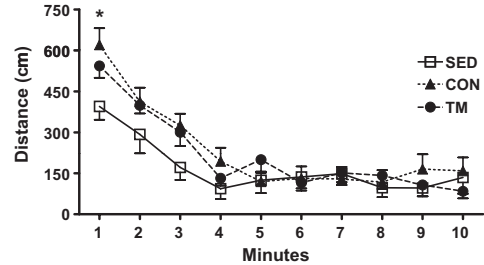


Figure 4 Control (CON) group was more active than the sedentary (SED) group during the first minute of the Open field test. This figure shows the mean \pm SEM of the distance travelled over the 10 min of exposure to the open field test. TM, treadmill group ($n = 7-8$ /group). * $p < 0.05$ vs. SED group (Bonferroni).

$F(2, 20) = 0.07$; time: $F(2, 40) = 1.79$; group*time: $F(4, 40) = 1.43$]. Time was significant in the analysis of time spent head dipping [Fig. 2B; $F(2, 40) = 3.59$; $p < 0.05$], but not for group and group*time [$F(2, 20) = 0.21$, ns; $F(4, 40) = 1.09$, ns, respectively]. A trend toward significance was found for the effect of group [$F(2, 20) = 3.32$; $p < 0.06$], whereas the significant effects of time [$F(2, 40) = 29.12$; $p < 0.0001$] and interaction group*time [$F(4, 40) = 6.39$; $p < 0.0001$] appeared for the number of crossings (Fig. 2C). Decomposition of that interaction revealed that groups differed during the first 5 min [$F(2, 20) = 9.12$; $p < 0.01$], with the CON group making more crossings than the SED one (Bonferroni, $p < 0.01$; Fig. 2C).

3.3. Elevated plus maze

The one-way ANOVA revealed an overall significant effect for group on the number of total entries, as well as of entries into the closed arms [$F(2, 20) = 6.39$; $p < 0.01$ and $F(2, 20) = 5.23$; $p < 0.05$, respectively]. Animals in the SED group showed reduced activity (Bonferroni, $p < 0.05$) in the EPM in comparison with those in the CON (both measures) and TM (closed arms only) groups (Fig. 3). The time spent in the open [$F(2, 20) = 1.32$, ns] or closed arms [$F(2, 20) = 1.32$, ns], the latency to enter for the first time in an open arm [$F(2, 20) = 2.52$, ns], and the defecation rate [$F(2, 20) = 1.25$, ns] were not affected by handling and/or exercise (data not shown).

3.4. Open field

A repeated measures ANOVA (between-subjects factor: group; within-subjects factor: 10 time bins of 1 min) was used to analyse the distance travelled in the OF. The analysis indicated no significant effect for group [$F(2, 20) = 1.318$, ns], but significant effects for time [$F(9, 180) = 45.12$; $p < 0.0001$] and the group*time interaction [$F(18, 180) = 1.85$; $p < 0.05$] (Fig. 4). Decomposition of that interaction showed that the CON group was more active than SED group during the first minute [$F(2, 20) = 4.98$; $p < 0.05$; post hoc test (Bonferroni): $p = 0.017$] (Fig. 4).

3.5. Physiological variables

3.5.1. Baseline levels

A repeated measures ANOVA (between-subjects factor: group; within-subjects factor: time of the day: morning or evening) was applied to analyse baseline levels of HPA hormones and glucose. A significant time effect was observed for: ACTH [$F(1, 20) = 18.34$; $p < 0.0001$]; corticosterone $F(1, 20) = 73.57$; $p < 0.0001$]; and glucose [$F(1, 19) = 24.48$; $p < 0.0001$]; with higher levels for the three variables in the evening (Fig. 5A-C). A significant effect for group was found for glucose [$F(2, 19) = 4.664$; $p < 0.05$; Fig. 5C), but not for ACTH or corticosterone [$F(2, 20) = 0.669$, ns; $F(2, 20) = 1.694$, ns, respectively]. Further comparisons showed that overall glucose levels of the TM group were significantly

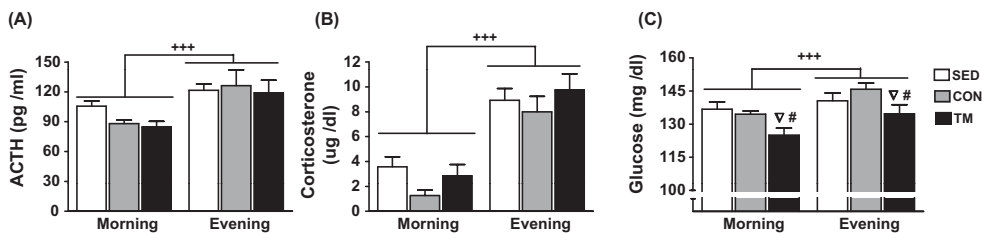


Figure 5 Overall evening levels of ACTH (A), corticosterone (B) and glucose (C) were higher than morning levels. Treadmill group (TM) presented less glucose than sedentary (SED) and control (CON) groups. This figure shows the mean \pm SEM of hormones and glucose levels under resting conditions during the morning and the evening ($n = 7-8$ /group). *** $p < 0.001$ overall time of day effect; $\nabla p < 0.025$, # $p = 0.011$ vs. SED and CON groups, respectively (regardless of time of day).

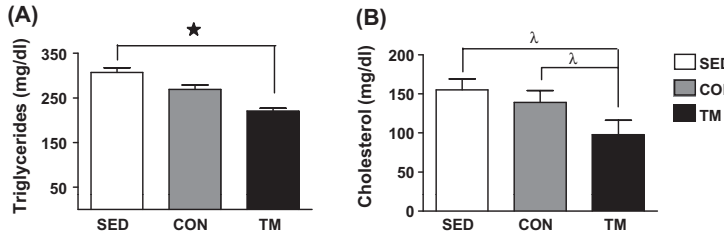


Figure 6 Mean ± SEM of: (A) triglycerides and (B) cholesterol are shown, both were reduced in the treadmill (TM) group, as compared with the sedentary (SED) and control (CON) groups ($n = 5-6/\text{group}$). * $p < 0.05$ (Bonferroni) between the indicated groups; $\lambda p = 0.065$ vs. SED and $p = 0.085$ vs. CON.

lower than those of the SED ($p = 0.025$) and CON ($p = 0.011$) groups. Group*time interactions were not significant.

One-way ANOVA analysis showed significant differences for measurements of plasma cholesterol and triglycerides [$F(2, 15) = 4.246$; $p < 0.05$ and $F(2, 17) = 3.983$; $p < 0.05$, respectively; Fig. 6A and B]. The TM group showed lower levels of triglycerides than the SED group (Bonferroni, $p < 0.05$). A trend toward significance was found in cholesterol levels of the TM group, as compared to the SED and the CON groups ($p = 0.065$; $p = 0.085$, respectively).

3.5.2. Response to stressors

Plasma glucose was not studied for the HB response, because glucose response is low or null after mild stressors. Analysis of the ACTH and corticosterone responses indicated a significant effect of group for ACTH [$F(2, 20) = 3.59$; $p < 0.05$] (Fig. 7A), but not for corticosterone (Fig. 7B). Further comparisons of ACTH indicated that TM animals showed lower ACTH levels than CON ones (Bonferroni, $p = 0.05$), but they did not differ from SED animals (Fig. 7A).

Behavioural data regarding escape-avoidance behaviour in the SB could not be recorded due to technical problems, but the available data indicate that the number of escapes was similar in the three groups (SED 26.38 ± 1.2 , CON 27.5 ± 0.9 and TM 25.5 ± 2.3 , $p = 0.67$), suggesting that the amount of shocks received were also similar. A repeated measures ANOVA (between-subjects factor: group; within-subjects factor: time SB, SB30) was conducted to analyse the ACTH response to the SB (Fig. 8A), and showed significant effects for time [$F(1, 20) = 237.23$; $p < 0.0001$] and group [$F(2, 20) = 4.63$; $p < 0.05$], but not for interaction group*

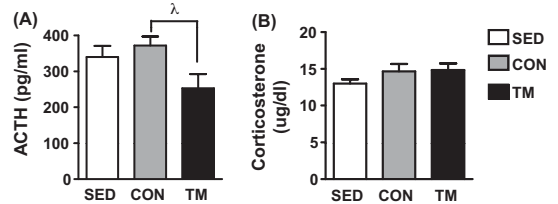


Figure 7 Treadmill (TM) animals presented reduced ACTH levels (A), but not reduced corticosterone levels (B), than the control (CON) group, immediately after exposure to the hole-board test. Means ± SEM are shown. SED, sedentary group ($n = 7-8/\text{group}$). $\lambda p = 0.05$ (Bonferroni).

time [$F(2, 20) = 0.59$, ns]. Contrast comparisons indicated lower ACTH levels in the TM group, as compared with the SED ($p = 0.07$) and the CON groups ($p = 0.063$) (Fig. 8A). The analysis of corticosterone showed a significant effect for group*time interaction [$F(2, 20) = 4.47$; $p = 0.025$], but no significant effects for group or time [$F(2, 20) < 0.8$, ns] (Fig. 8B). Decomposition of the interaction revealed that the TM group showed a decrease in corticosterone levels, during recovery after shuttle-box stress, whereas the SED and the CON groups did not (Fig. 8B). This decrease was also confirmed by analysis of the difference between SB30 and SB levels for each group (SB30-SB: SED: 4.76 ± 0.87 , CON: 3.06 ± 1.24 , TM: -4.47 ± 3.96) [$F(2, 20) = 4.47$, $p < 0.05$]; post hoc test (Bonferroni, $p = 0.021$) TM < SED. The analyses of glucose showed a significant effect for time [$F(1, 20) = 134.78$;

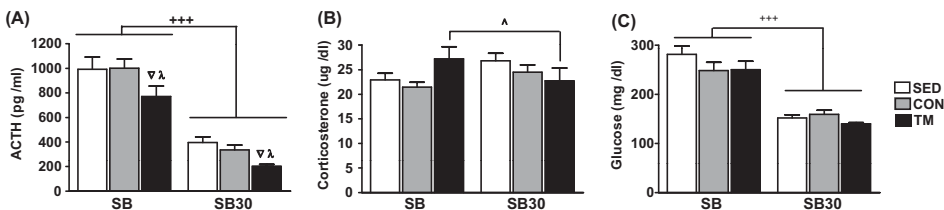


Figure 8 Lower ACTH levels (A) were found in the TM animals, as compared to the sedentary (SED) and control (CON) groups, immediately after the shuttle-box stress session (SB) and after 30 min of recovery (SB30). Corticosterone (B) decreased only in the TM group during the post-shuttle period, and overall levels of glucose (C) decreased after recovery. Mean ± SEM is shown ($n = 7-8/\text{group}$). *** $p < 0.001$ (general effect of sampling time); $\wedge p < 0.05$ between the indicated groups; $\nabla p = 0.07$ vs. SED and $\lambda p = 0.063$ vs. CON group (regardless of sampling time).

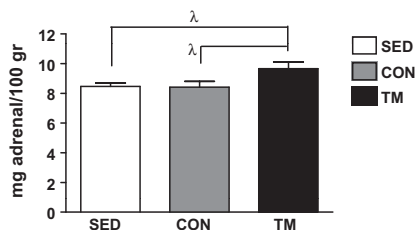


Figure 9 Mean \pm SEM of the relative adrenal weight of sedentary (SED), control (CON) and treadmill (TM) groups ($n=7-8$ /group). $^{\lambda}p=0.077$ vs. SED and $p=0.095$ vs. CON groups.

$p < 0.0001$], which reflected the decrease in glucose levels during the post-SB period (Fig. 8C). There were no significant effects for group or the group*time interaction [$F(2, 20) = 1.17$, ns; $F(2, 20) = 1.58$, ns, respectively].

Finally, the ANOVA revealed a significant effect for group on relative whole adrenal weight (Fig. 9; $F(2, 20) = 3.63$; $p < 0.05$), but comparison of groups (post hoc Bonferroni test) only revealed marginally significant effects: $p = 0.095$ (TM > SED) and $p = 0.077$ (TM > CON).

4. Discussion

The present study is, to our knowledge, one of the first to expose young rats to long-term moderate treadmill exercise (36 weeks) to find out the influence of this exposure on exploratory and anxiety-like behaviour, as well as on the resting and stress levels of some physiological parameters. Two groups of control rats were included, one sedentary (SED) group that always remained in their home cages, and another control (CON) one, exposed to the very same procedure as the treadmill (TM) trained rats, except that they could not run on the treadmill. In this way, a non-specific effect could be ruled out for all the procedures associated to TM regarding anxiety and responsiveness to stress. Hence, our study demonstrates for the first time that long-term moderate training has beneficial physiological effects and reduces the ACTH response to stress. Yet, such beneficial effects are not explained by all procedures associated to training.

The moderate training protocol used in the present study (12 m/min, 30 min/day, 4–5 days/week) did not reduce body weight over the entire period of study. Using the treadmill procedure, body weight reduction has been related to the intensity of training (e.g. Watanabe et al., 1992; Chennaoui et al., 2002; Albeck et al., 2006; Hansalik et al., 2006), and our procedure is milder than all those previously described. Therefore, it appears that treadmill running exercise must be above a certain level of intensity to reduce body weight in rats. Despite the lack of changes in body weight, TM rats showed lower resting levels of glucose, cholesterol and triglycerides than CON and SED groups, a result consistent with previous data obtained in rats (Pels et al., 1985; Suzuki and Machida, 1995) and humans (Martí et al., 1990). As lower levels of these variables have beneficial effects on metabolic and cardiovascular diseases (Eriksson et al., 1997), the present data strongly support the efficacy of our moderate exercise programme.

The behavioural data in the three novel environments (HB, EPM and OF) revealed that, in general, both TM and CON rats increased horizontal activity as compared with SED rats. There were no evident differences between rats in the TM and CON groups. Furthermore, no group differences were observed in variables more specifically related to exploration (head dipping in the HB test) or anxiety-like behaviour (e.g. entries and time in the open arms of the EPM). Hence, our results strongly indicate that there is no specific effect of moderate exercise on activity, exploration or anxiety-like behaviour, and that increased activity may be related to the procedures associated to daily exposure to the treadmill, rather than to exercise per se. Throughout the 36 weeks of training, CON animals were picked up from the home cage, weighed, placed in the treadmill for 30 min and returned to the home cage when the session finished, whereas SED animals were only weighed once per week. The animals of the CON group remained in the apparatus without running, sniffed the surrounding, moved forward and backward in the line, and after some time, sat downward and fell asleep. Thus, CON animals were exposed to some kind of enriched rearing condition, and it has been repeatedly reported that even less intensive and brief handling procedures, as well as other environmental rearing conditions involving increased stimulation, are able to modify activity, exploration or anxiety profiles (Fernandez-Teruel et al., 2002; Leal-Galicia et al., 2008; Pena et al., 2009; Simpson and Kelly, 2011). Moreover, the behavioural similarities between CON and TM rats observed in the present experiments agree with previous studies, which also reported a similar performance by both groups in hippocampal neurotrophin expression, spatial learning, anxiety and social behaviour (Burghardt et al., 2004; O'Callaghan et al., 2009; Spangenberg et al., 2009). In line with this, we have recently reported that both TM and CON rats showed increased serum levels of IGF-1 and brain activation of sirtuin 1 pathway, as compared to SED rats, although the increase was higher in the TM group (Bayod et al., 2011).

Although the research reported in the literature used relatively shorter periods of exercise (1–8 weeks) and more intense training than in the present experiments (when the treadmill was used, allowing comparisons), the effects of exercise on activity in novel environments and on anxiety-like behaviour are clearly inconsistent after treadmill exercise, as well as after voluntary wheel running (e.g. Dishman et al., 1996; Burghardt et al., 2004; Fulk et al., 2004; Leasure and Jones, 2008; Garcia-Capdevila et al., 2009; Grace et al., 2009; Hopkins and Bucci, 2010). More consistent beneficial effects of exercise have been reported when anxiety was enhanced by pharmacological interventions or psychological stress. Wheel running reduced conditioned freezing and reversed the shuttle-box escape deficit produced by uncontrollable stress (Greenwood et al., 2003, 2007), whereas treadmill exercise reversed the increase of anxiety-like behaviour induced by acute sleep deprivation (Voltert et al., 2011), and by a drug that increased oxidative stress markers (L-buthionine-(S,R)-sulphoximine (BSO); Salim et al., 2010). Therefore, future research about the possible beneficial effects of exercise on anxiety may benefit from protocols that assess resilience to stress-provoking stimuli.

The analysis of basal hormones showed that TM animals did not differ from the SED and CON groups in plasma ACTH

and corticosterone levels, measured at two points of the circadian cycle. It cannot be ruled out that transient changes appeared during the initial phases of training, which progressively normalized over the long-term period of training (36 weeks). For instance, increases in resting levels of corticosterone during the first week after wheel running, with normalization after 4 or 8 weeks, have been reported (Fediuc et al., 2006; Campbell et al., 2009). Our results concur with those generally reported in the literature, and indicate only null or small effects of exercise on resting levels of HPA hormones, either in rats or mice (Chennaoui et al., 2002; Droste et al., 2003, 2006, 2007; Watanabe et al., 1991, 1992).

To our knowledge, the present study demonstrates for the first time an important impact of long-lasting moderate levels of exercise on PA response to stress. TM animals showed a reduced ACTH response to either a mild stressor (exposure to a novel environment), or a severe stressor (escape-avoidance training using foot shock as the aversive stimulus, SB). That is, the TM group presented a lower ACTH response to stress than both the SED and CON groups. This reduced ACTH response to the escape-avoidance task cannot apparently be explained by a reduced number of shocks related to better learning of the task, as the number of escapes was similar in all groups.

Corticosterone response followed a partially different pattern. No group differences were observed in response to the novel environment. In response to the escape-avoidance task, slightly higher levels were found in TM rats, as compared to SED or CON rats immediately after the task, whereas the post-task decline was greater in TM animals, in accordance with the greater post-task decline in ACTH in these animals. Discrepancies between the ACTH and corticosterone responses can at least be explained in part by enhanced adrenal responsiveness to circulating ACTH in TM rats. These TM rats showed a trend toward a higher relative adrenal weight, and this parameter correlated with maximal adrenocortical responsiveness to ACTH (Marquez et al., 2004).

In general, previous studies on the influence of exercise on PA responsiveness to stress have used much shorter periods of exercise (2–10 weeks), and the results showed normal (Chennaoui et al., 2002; Droste et al., 2006, 2007) or reduced (Droste et al., 2006; Watanabe et al., 1992) ACTH response to predominantly emotional stressors. With these relatively short periods of exercise, it is important to consider the dynamic changes in the HPA axis to adapt to exercise. For instance, Campbell et al. (2009) reported that, after 2 weeks of exercise, rats showed reduced ACTH but higher corticosterone response to restraint stress, whereas a response similar to that of sedentary groups was observed after 8 weeks of exercise. The dissociation between ACTH and corticosterone response after 2 weeks was explained by the observation of enhanced adrenocortical responsiveness to ACTH. Dissociation between both hormones has also been observed in mice exposed to wheel running (Droste et al., 2003, 2006, 2007), suggesting some ACTH-independent specific effect of exercise on adrenocortical function. Moreover, the positive effects of exercise on HPA responsiveness to a stressor may extend beyond the acute response to stressors, as Sasse et al. (2008) observed a normal corticosterone response to noise stress, but a significantly improved habituation to daily repeated noise in exercised animals.

In TM rats, there was no reduced glucose response parallel to the reduction observed in the ACTH response. As stress-induced hyperglycaemia is a reflection of adrenaline release (Marti and Armario, 1998), it can be tentatively assumed that long-lasting moderate training did not substantially modify medullo-adrenal responsiveness to predominantly emotional stressors. However, there are other alternative possibilities. First, exercise-induced metabolic changes may alter glucose metabolism, independently of circulating levels of adrenaline. Second, a reduced ACTH response to stress in TM rats may be the consequence of an altered regulation of the HPA axis in the pituitary, the PVN or above, rather than a reflection of a generalized lower response to stressors. The present results concur with previous reports that 8–10 weeks of treadmill training do not have effects on the noradrenaline and adrenaline response to noise stress (Overton et al., 1991), although it is possible that exercise can be beneficial for reducing noradrenaline and adrenaline response to stress in certain vulnerable animals, such as borderline hypertensive rats (Cox, 1991).

In conclusion, moderate forced exercise practiced from early ages has an important long-term impact in adulthood. Exercise, but not handling, reduced plasma levels of glucose, cholesterol and triglycerides, suggesting beneficial metabolic consequences. The two components involved in the treadmill training procedure, handling and exercise, can affect behaviour and responsiveness to stress in a different manner. Treadmill handling increased horizontal activity, but did not affect anxiety. Although any treatment altered basal hormone levels, the present study is probably the first to demonstrate that long-term moderate treadmill exercise, but not the handling procedures, reduces the ACTH response to both mild and severe stress challenges.

Role of the funding source

The funding sources (cited in the acknowledgements section) had no further role in the study or in the writing of this article.

Conflict of interest statement

All authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Ministerio de Educacion y Ciencia (PSI 2008-06417-C03-01,02, 03, SAF2008-01175 and SAF-2009-13093), Instituto de Salud Carlos III (DPS2008-06998-C01,C02 and RD06/0001/0015), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, and Generalitat de Catalunya (SGR2009-16, 2009/SGR00893). J.F.L. was supported by a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2011).

References

- Abbott, R.D., White, L.R., Ross, G.W., Masaki, K.H., Curb, J.D., Petrovitch, H., 2004. Walking and dementia in physically capable elderly men. *JAMA: J. Am. Med. Assoc.* 292, 1447–1453.

- Albeck, D.S., Sano, K., Prewitt, G.E., Dalton, L., 2006. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behav. Brain Res.* 168, 345–348.
- Armario, A., 2006. The hypothalamic–pituitary–adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5, 485–501.
- Bayod, S., Del Valle, J., Canudas, A.M., Lalanza, J.F., Sanchez-Roige, S., Camins, A., Escorihuela, R.M., Pallas, M., 2011. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J. Appl. Physiol.* 111, 1380–1390.
- Blair, S., LaMonte, M., Nichaman, M., 2004. The evolution of physical activity recommendations: how much is enough? *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 913–920.
- Blair, S.N., Morris, J.N., 2009. Healthy hearts – and the universal benefits of being physically active: physical activity and health. *Ann. Epidemiol.* 19, 253–256.
- Bunce, D., Murden, F., 2006. Age, aerobic fitness, executive function, and episodic memory. *Eur. J. Cogn. Psychol.* 18, 221–233.
- Burghardt, P.R., Fulk, L.J., Hand, G.A., Wilson, M.A., 2004. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res.* 1019, 84–96.
- Campbell, J.E., Rakhshani, N., Fediuc, S., Bruni, S., Riddell, M.C., 2009. Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training. *J. Appl. Physiol.* 106, 66–72.
- Chennaoui, M., Merino, D.G., Lesage, J., Drogou, C., Guezennec, C.Y., 2002. Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo–pituitary–adrenal axis in rats. *Acta Physiol. Scand.* 175, 113–121.
- Colcombe, S., Kramer, A.F., 2003. Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychol. Sci.* 14, 125–130.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., Christie, L., 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30, 464–472.
- Cox, R., 1991. Exercise training and response to stress – insights from an animal-model. *Med. Sci. Sports Exerc.* 13, 853–859.
- Crimi, E., Ignarro, L.J., Acciariello, F., Napoli, C., 2009. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* 6, 292–300.
- de Kloet, E., Oitzl, M., Joels, M., 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* 22, 422–426.
- Deslandes, A., Moraes, H., Ferreira, C., Veiga, H., Silveira, H., Mouta, R., Pompeu, F.A.M.S., Freire Coutinho, E.S., Laks, J., 2009. Exercise and mental health: many reasons to move. *Neuropsychobiology* 59, 191–198.
- Dishman, R.K., Dunn, A.L., Youngstedt, S.D., Davis, J.M., Wilson, S.P., Wilson, M.A., 1996. Increased open field locomotion and decreased striatal GABA binding after activity wheel running. *Physiol. Behav.* 60, 699–705.
- Dishman, R.K., Renner, K.J., White-Welkley, J.E., Burke, K.A., Bunnett, B.N., 2000. Treadmill exercise training augments brain norepinephrine response to familiar and novel stress. *Brain Res. Bull.* 52, 337–342.
- Dishman, R.K., Berthoud, H., Booth, F.W., Cotman, C.W., Edgerton, V.R., Fleshner, M.R., Gandevia, S.C., Gomez-Pinilla, F., Greenwood, B.N., Hillman, C.H., Kramer, A.F., Levin, B.E., Moran, T.H., Russo-Neustadt, A.A., Salamone, J.D., Van Hooymissen, J.D., Wade, C.E., York, D.A., Zigmond, M.J., 2006. Neurobiology of exercise. *Obesity* 14, 345–356.
- Droste, S.K., Schweizer, M.C., Ulbricht, S., Reul, J.M.H.M., 2006. Long-term voluntary exercise and the mouse hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis: impact of concurrent treatment with the antidepressant drug tianeptine. *J. Neuroendocrinol.* 18, 915–925.
- Droste, S.K., Gesing, A., Ulbricht, S., Muller, M.B., Linthorst, A.C.E., Reul, J.M.H.M., 2003. Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis. *Endocrinology* 144, 3012–3023.
- Droste, S.K., Chandramohan, Y., Hill, L.E., Linthorst, A.C.E., Reul, J.M.H.M., 2007. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis mainly at the adrenal level. *Neuroendocrinology* 86, 26–37.
- Eriksson, J., Taimela, S., Koivisto, V.A., 1997. Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia* 40, 125–135.
- Engeland, W.C., Miller, P., Gann, D.S., 1989. Dissociation between changes in plasma bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin after hemorrhage in awake dogs. *Endocrinology* 124, 2978–2985.
- Fediuc, S., Campbell, J.E., Riddell, M.C., 2006. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J. Appl. Physiol.* 100, 1867–1875.
- Fernandez-Teruel, A., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R.M., Gil, L., Aguilar, R., Steimer, T., Tobena, A., 2002. Early-life handling stimulation and environmental enrichment – are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 233–245.
- Fulk, L.J., Stock, H.S., Lynn, A., Marshall, J., Wilson, M.A., Hand, G.A., 2004. Chronic physical exercise reduces anxiety-like behavior in rats. *Int. J. Sports Med.* 25, 78–82.
- Fuss, J., Ben Abdallah, N.M., Vogt, M.A., Touma, C., Pacifici, P.G., Palme, R., Witzemann, V., Hellweg, R., Gass, P., 2010. Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 20, 364–376.
- García-Capdevila, S., Portell-Cortés, I., Torras-Garcia, M., Coll-Andreu, M., Costa-Miserachs, D., 2009. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behav. Brain Res.* 202, 162–170.
- Grace, L., Heschem, S., Kellaway, L.A., Bugarith, K., Russell, V.A., 2009. Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress. *Metab. Brain Dis.* 24, 643–657.
- Greenwood, B.N., Foley, T.E., Day, H.E.W., Campisi, J., Hammack, S.H., Campeau, S., Maier, S.F., Fleshner, M., 2003. Free wheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J. Neurosci.* 23, 2889–2898.
- Greenwood, B.N., Strong, P.V., Dorey, A.A., Fleshner, M., 2007. Therapeutic effects of exercise: wheel running reverses stress-induced interference with shuttle box escape. *Behav. Neurosci.* 121, 992–1000.
- Hansalik, M., Skalicky, M., Viidik, A., 2006. Impairment of water maze behaviour with ageing is counteracted by maze learning earlier in life but not by physical exercise, food restriction or housing conditions. *Exp. Gerontol.* 41, 169–174.
- Haskell, W.L., Lee, I., Pate, R.R., Powell, K.E., Blair, S.N., Franklin, B.A., Macera, C.A., Heath, G.W., Thompson, P.D., Bauman, A., 2007. Physical activity and public health – updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation* 116, 1081–1093.
- Hopkins, M.E., Bucci, D.J., 2010. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94, 278–284.
- Kramer, A.F., Hahn, S., Cohen, N.J., Banich, M.T., McAuley, E., Harrison, C.R., Chason, J., Vakil, E., Bardell, L., Boileau, R.A., Colcombe, A., 1999. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400, 418–419.
- Kramer, A.F., Erickson, K.I., Colcombe, S.J., 2006. Exercise, cognition, and the aging brain. *J. Appl. Physiol.* 101, 1237–1242.
- Leal-Galicia, P., Castaneda-Bueno, M., Quiroz-Baez, R., Arias, C., 2008. Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synap-

- tic plasticity markers in aging. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 511–518.
- Leasure, J.L., Jones, M., 2008. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience* 156, 456–465.
- Marais, L., Stein, D.J., Daniels, W.M.U., 2009. Exercise increases BDNF levels in the striatum and decreases depressive-like behavior in chronically stressed rats. *Metab. Brain Dis.* 24, 587–597.
- Marquez, C., Nadal, R., Armario, A., 2004. The hypothalamic–pituitary–adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 123, 601–612.
- Martí, B., Suter, E., Riesen, W.F., Tschopp, A., Wanner, H.U., Gutzwiller, F., 1990. Effects of long-term, self-monitored exercise on the serum lipoprotein and apolipoprotein profile in middle-aged men. *Atherosclerosis* 81, 19–31.
- Marti, O., Armario, A., 1998. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 241–260.
- Narath, E., Skalicky, M., Viidik, A., 2001. Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Exp. Gerontol.* 36, 1699–1711.
- Nelson, M.E., Rejeski, W.J., Blair, S.N., Duncan, P.W., Judge, J.O., King, A.C., Macera, C.A., Castaneda-Sceppa, C., 2007. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39, 1435–1445.
- O’Callaghan, R.M., Griffin, E.W., Kelly, A.M., 2009. Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. *Hippocampus* 19, 1019–1029.
- Overton, J., Kregel, K., Davisgorman, G., Seals, D., Tipton, C., Fisher, L., 1991. Effects of exercise training on responses to central injection of Crf and noise stress. *Physiol. Behav.* 49, 93–98.
- Pels, A., White, T., Block, W., 1985. Effects of exercise training on plasma-lipids and lipoproteins in rats. *J. Appl. Physiol.* 58, 612–618.
- Pena, Y., Prunell, M., Rotllant, D., Armario, A., Escorihuela, R.M., 2009. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary–adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1390–1404.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Koltai, E., Taylor, A.W., Goto, S., 2008. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res. Rev.* 7, 34–42.
- Rolland, Y., van Kan, G.A., Vellas, B., 2010. Healthy brain aging: role of exercise and physical activity. *Clin. Geriatr. Med.* 26, 75–87.
- Russo-Neustadt, A., Ha, T., Ramirez, R., Kessler, J.P., 2001. Physical activity-antidepressant treatment combination: impact on brain-derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. *Behav. Brain Res.* 120, 87–95.
- Salim, S., Sarraj, N., Taneja, M., Saha, K., Tejada-Simon, M.V., Chugh, G., 2010. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 208, 545–552.
- Sasse, S.K., Greenwood, B.N., Masini, C.V., Nyhuis, T.J., Fleshner, M., Day, H.E.W., Campeau, S., 2008. Chronic voluntary wheel running facilitates corticosterone response habituation to repeated audiogenic stress exposure in male rats. *Stress* 11, 425–437.
- Simpson, J., Kelly, J.P., 2011. The impact of environmental enrichment in laboratory rats – behavioural and neurochemical aspects. *Behav. Brain Res.* 222, 246–264.
- Spangenberg, E., Dahlborn, K., Essen-Gustavsson, B., Cvek, K., 2009. Effects of physical activity and group size on animal welfare in laboratory rats. *Anim. Welf.* 18, 159–169.
- Suzuki, K., Machida, K., 1995. Effectiveness of lower-level voluntary exercise in disease prevention of mature rats. 1: cardiovascular risk factor modification. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 71, 240–244.
- Trejo, J.L., Lorens-Martin, M.V., Torres-Aleman, I., 2008. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 402–411.
- van Praag, H., 2009. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.* 32, 283–290.
- Vollert, C., Zagaar, M., Hovatta, I., Taneja, M., Vu, A., Dao, A., et al., 2011. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behav. Brain Res.* 224, 233–240.
- Watanabe, T., Morimoto, A., Sakata, Y., Wada, M., Murakami, N., 1991. The effect of chronic exercise on the pituitary adrenocortical-response in conscious rats. *J. Physiol. London* 439, 691–699.
- Watanabe, T., Morimoto, A., Sakata, Y., Tan, N., Morimoto, K., Murakami, N., 1992. Running training attenuates the Acth responses in rats to swimming and cage-switch stress. *J. Appl. Physiol.* 73, 2452–2456.
- Weuve, J., Kang, J.H., Manson, J.E., Breteler, M.M.B., Ware, J.H., Grodstein, F., 2004. Physical activity, including walking, and cognitive function in older women. *JAMA: J. Am. Med. Assoc.* 292, 1454–1461.
- Zelena, D., Mergl, Z., Foldes, A., Kovacs, K.J., Toth, Z., Makara, G.B., 2003. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary–adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E1110–E1117.

Part 2B: L'exercici a llarg termini promou les estratègies d'afrontament en rates mascles i femelles

En el següent manuscrit no publicat, que està compost per dos experiments independents, trobarem que l'exercici millorà l'adquisició de la resposta d'evitació activa en dos sentits (*Shuttle Box*). Malgrat que tant les rates mascles com les femelles amb exercici assoliren el criteri d'aprenentatge (evitar el shock durant 8 trials seguits) significativament abans que les control i les sedentàries; al final de les sessions d'aprenentatge, totes les femelles assoliren un nivell de respostes correctes per sobre del 90%, mentre que en els mascles fora del 70-72% (CON i SED) i 85% (TM). Quelcom similar va ocórrer amb les rates corredores. Mentre que les femelles TM ja evitaven més i més ràpid que les femelles SED a la primera sessió, els mascles TM ho van fer a la segona. Finalment, el grup CON no va mostrar un ritme tant ràpid d'adquisició com el grup TM; a l'analitzar la progressió en blocs de 10 assaigs vàrem veure que el grup CON es situava entre el TM i el SED.

Long-term moderate treadmill exercise promotes stress-coping strategies in male and female rats

Abstract

The current study examined the capacity of long-term moderate treadmill running to modify behavioural coping strategies (active vs. passive) and learning performance in the two-way avoidance task. Around 32-weeks after the exercise intervention, Sprague-Dawley rats were tested over five 30-trial sessions in the shuttle-box with two separate experiments for females and males. Two groups were used as controls: a non-handled sedentary (SED) group, receiving no manipulation, and a control (CON) group exposed to a stationary treadmill for the same amount of time as the trained (TM) group. In the first experiment, SED females were slower to respond and performed fewer avoidances during the first session in comparison to CON and TM females, whereas TM females showed the fastest learning rates. All groups of females reached an asymptotic level of performance with over 90% correct responses. In contrast, the performance of male rats was below 90% correct. The SED and CON males achieved 70-72% of avoidance tasks, whereas the TM males responded with shorter latencies than the other two male groups, and achieved 85% of tasks. Overall, long-term moderate forced exercise accelerates active copying strategies in male and female rats, and implies that exercise may benefit in conflict situations involving anxiety.

Key Words

physical activity, shuttle box avoidance, gender, anxiety, learning

1. Introduction

Clinical data reveal that a physically active lifestyle is an effective way for promoting benefits to physiological and mental health. The earlier hypothesis that physical activity needs to be intense or vigorous

to induce health gain has been modified by more recent evidence showing health benefits after moderate levels of physical activity [1].

In humans, 12 weeks to 10 months of brisk walking resulted in enhanced executive control, increased brain matter volumes and task-related cerebral activity (reviewed in [2]), although the findings for working memory were less conclusive [3]. In rodents, eight months of regular moderate running improved spatial learning [4] and increased neurogenesis [5], while a longer period of exercise improved neuroprotection in the hippocampus [6].

Another important positive effect of physical activity and exercise is observed regarding anxiety. In humans, consistent evidence supports the prescription of exercise in addition to the pharmacological and psychological treatment of anxiety disorders [7], although it remains unclear as to which type and intensity of exercise (moderate to hard or very light to light) is more effective for the reduction of anxiety symptoms [8]. In animal models, 8-10 weeks treadmill intervention led to a reduction in anxiety-like behaviour [9], and counteracted the impairments produced by postnatal-maternal deprivation on fear memories [10]. We recently reported that long-term moderate treadmill training reduced hormonal response after acute mild and severe stress [11], and Greenwood et al. [12] reported that wheel running for 6 months reversed an escape deficit induced by uncontrollable foot shock stress.

Given the aforementioned benefits of moderate physical activity on learning and the reduction of stress response, we investigated the capacity of long-term moderate physical activity for improving learning performance in a conflict situation involving stress. To examine this hypothesis, the two-way (shuttle-box) active avoidance acquisition test was used. This test involves a fear-mediated conflict between a tendency to freeze against a tendency to actively run (i.e. "passive avoidance-active avoidance conflict") in a box (shuttle-box) of two compartments separated by an open door. The animal is required to change compartments to actively escape or avoid the upcoming foot shock signalled by a light and/or a tone. Low baseline levels of anxiety

(e.g. low anxious rats, anxiolytic drugs, anxiolytic early postnatal handling) are associated with enhanced acquisition and faster active avoidance responses in this task, whereas high anxious profiles increased the freezing response and favoured passive avoidance, resulting in slower learning of the task and longer response latencies [13-15].

In the present study, the long-term effects of a 32-week treadmill intervention at moderate intensity on active/passive responding were evaluated using the shuttle-box paradigm. The characteristics of the protocol used were chosen for two main reasons: a) using a treadmill model, in which the duration and intensity of exercise were adjusted by the experimenter, the heterogeneity described with other models of voluntary exercise was avoided [16]; and b) including two control groups (SED group, receiving no manipulation and CON group exposed to a stationary treadmill under the same conditions as for the TM group) served to detect the influence of other variables, such as daily handling and exposure to the treadmill apparatus [4].

2. Methods

2.1 Animals

Female (n=29, Experiment 1) and male (n=37, Experiment 2) Sprague-Dawley rats (obtained from the *Servei d'Estabulari, Universitat Autònoma de Barcelona*) were housed 2 per cage in standard macrolon cages (40 cm in length x 23 cm in width x 18 cm in depth) and maintained under 12h/12h light/dark cycle (lights on 0800h) in standard conditions of temperature ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) and humidity ($50\pm 10\%$), with free access to food and water. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the *Universitat Autònoma de Barcelona*, and was carried out following the 'Principles of laboratory animal care', in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC). Animals of the same sex were randomly assigned to three groups, which did not differ in initial body weights. (Experiment 1, SED: 331.8 ± 5.6 , CON: 312.3 ± 6.7 , TM: 319.5 ± 11 ;

Experiment 2, SED: 517.5 ± 12 , CON: 545.8 ± 9.3 , TM: 549.9 ± 12.3 ; Mean \pm SEM). Body weight was recorded weekly until the end of the experiment. Body weight gain was calculated as the difference between the body weight measured at the last week of training and the body weight prior to the onset of treadmill training (Table 1).

2.2 Treadmill training

Treadmill training was started when rats were 14 weeks old and lasted 32 weeks. The animals were trained using the procedure described in Lanza et al [11]. Briefly, rats were first habituated to the treadmill apparatus for 30 min. The following day, the intensity of the exercise was gradually increased until it reached a speed of 12 metres/minute (m/min) without inclination. The treadmill apparatus consisted of 3 parallel runways without electroshock (Exer 3/6, Columbus Instruments). Animals were trained in 30-min sessions, 4-5 days/week, between 9h and 14h for 32 weeks. During the first sessions, some rats slowed their gait over the session and displaced towards the black wall of the lane; on such occasions they were gently pushed by hand for a few seconds to stay at the front part of the lane. Despite these cautions, 25% of the male rats refused to run and were removed from the experiment, as seen in other studies [17]. No female rats were rejected.

2.3 Shuttle Box (SB)

Each shuttle box (Panlab, S.L.) was divided into two equally sized compartments (25cm x 25cm x 25cm), both sound-attenuated, connected by an opening door (8 cm wide and 10 cm high). The first session was preceded by a 5 min habituation period followed by five 30-trial sessions administered at 24-h intervals. Each trial consisted of 10 sec of conditioned stimulus (CS, light of 7 W and sound of 2400 Hz at 40 dB, presented simultaneously), immediately followed by a scrambled electric shock (unconditioned stimulus, UCS, 0.6 mA) that was administered through the metal grid floor of the box. CS or UCS finished when the animal crossed to the other compartment (active

response). Once a crossing had been made, a 40-s pause (inter trial interval) was presented. The scores for habituation crossings, the total number of active avoidances (crossings in the presence of CS), the number of avoidances and averaged escape latencies during three 10-trial blocks, and the number of trials required to achieve the criterion of 8 consecutive avoidances ("Criterion 8", adapted from [14]) were all recorded. The warm-up index was calculated as the number of avoidances performed in the third 10-trial block of the previous session minus the number of avoidances performed in the first 10-trial block of the next session.

2.4 Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the 'Statistical Package for Social Sciences' (SPSS, version 18.0). Repeated-measures ANOVA (GLM) was used to analyse the number of active avoidances, the average escape latencies over the three 10-trial blocks (within session) and the warm-up index progression over session. Body weight gain, number of crossings during habituation period, total number of avoidances, total mean latency and criterion 8 were analysed by one-way ANOVA, followed by Duncan *post hoc* comparisons between groups after significant ANOVA. Student t-tests were performed when required. All values are expressed as mean \pm standard error for the mean (SEM). Statistical significance was set at $p < 0.05$ for all tests.

3. Results

Moderate treadmill training did not reduce body weight gain (Table 1, n.s.). There was no difference between groups for the number of crossings performed during the habituation period in the shuttle-box apparatus (data not shown).

In Experiment 1, a significant increase was found in the number of active avoidance responses and a decrease in escape latencies (Fig 1-AB) over the trials (avoidances: $F(2,200)=76.60$, $p < 0.001$; latencies: $F(2,400)=73.74$, $p < 0.001$) and sessions (avoidances: $F(4,200)=126.67$, $p < 0.001$; latencies: $F(2,400)=130.19$, $p < 0.001$). Group differences in

learning acquisition appeared in the number of avoidances (group x block x session interaction, $F(16,200)=3.18$, $p<0.001$) and latencies (group x block x session interaction: $F(16,200)=3.17$, $p<0.001$) of the within-subjects analysis, which were corroborated by the overall residual group differences that appeared in the between-subjects analysis of avoidances (group factor: $F(2,25)=3.37$, $p=0.051$) and latencies (group factor: $F(2,25)=2.79$, $p=0.081$). TM female rats reached "Criterion 8" significantly earlier than the other two groups ($F(2,27)=4.84$, $p<0.05$; Table 1). Indeed, when analysed for the progression of the "warm-up" index, significant differences were found between the SED and TM groups over session ($F(3,54)=6.54$, $p<0.001$) and during sessions 2 and 5 ($p<0.05$), but not between the SED and CON groups.

In Experiment 2, male rats also increased the number of avoidances ($F(4,264)=143.1$, $p<0.001$) and diminished escape latencies over the 10 trial-blocks ($F(4,264)=265.1$, $p<0.001$), as well as over sessions (avoidances: $F(4,264)=78.23$, $p<0.001$; latencies: $F(4,264)=56.87$, $p<0.001$; Fig 2). TM male rats showed shorter escape latencies ($F(2,33)=4.11$, $p<0.05$; Fig 2, Table 1), reached "Criterion 8" earlier ($p<0.05$ t-test vs. the SED group) and displayed a higher number of total avoidance responses ($p<0.05$ t-test vs. the SED group, Table 1) in comparison to the SED group. No significant differences were found in the warm-up index.

4. Discussion

In agreement with previous findings by our group [11] and by others [18], treadmill training did not reduce body weight gain, revealing that higher doses to those reported here (2.5 hours/week of running at moderate intensity) are necessary to reduce body weight gain, as reported both in rodents [19] and humans [1,20].

In Experiment 1, a common pattern of performance was detected across groups, all showing a progressive increase in the number of correct responses (i.e. avoidances) during the initial 0-20 trials until, in the final sessions 4-5, a level of performance of 90% or

higher was reached for avoidances. Specifically, females of both the TM and CON groups increased the number of avoidances in the third 10-trial block of session 1 compared with the SED group. Interestingly, only the TM group differed from SED group in the averaged escape latencies in that final 10-trial block. TM female rats reached "Criterion 8" 16 trials earlier than the CON group and 30 trials earlier than the SED group. As all groups displayed an equal number of crossings during the habituation period, we attributed these differences regarding "Criterion 8" to be a result of the better conflict solving and coping strategy employed by TM rats as compared to that of the other groups, rather than to changes in motor activity. Collectively, TM female rats showed the fastest initial acquisition rate for the two-way active avoidance response in comparison with both SED and CON rats, whereas the SED group performed the lowest number of avoidances in the first 10-trial block of the last session. We suggest that these changes may result from the progression between sessions in the first 10-trial block, as related to the performance of the last block of the previous session, the so-called "warm-up" effect [14].

Considering the high exposure of both CON and TM rats to handling procedures, it is plausible that handling stimulation could partially underlie the improvement observed in the number of avoidances at trials 30 and 130 of CON rats compared to SED female rats. Such results are in agreement with other handling procedures requiring chronic intraperitoneal injections or handling exposure at early age, which also improved shuttle-box learning acquisition and diminished anxiety-like behaviour [21-23].

CON and TM male groups had a similar performance during the initial stage, whereas the SED group showed the slowest acquisition rates. However, from session 2 onwards, TM male rats group performed better than the other groups as was indicated by shorter escape latencies, lower "Criterion 8" and a higher number of total avoidance responses in comparison to the SED group. Overall, in contrast to the 90% acquisition rates observed in females, males learnt the task at a slower pace. TM male rats displayed the best performance, reaching a

level of 82% of correct responses by the third session and maintaining a level of 86% and 85% in sessions 4 and 5, respectively; whereas SED and CON male groups performed 70% and 72% of avoidances, respectively, during session 5.

To our knowledge, we demonstrate here for the first time that long-term moderate treadmill running consistently improved two-way active avoidance acquisition in both male and female rats. Treadmill running accelerated the number of trials for reaching "Criterion 8" in both genders, with TM females being the first group that performed 8 consecutive avoidances. Moreover, female runners increased the number of correct responses during the initial stages, and male runners diminished the escape latencies. A possible interpretation for this result is that long-term moderate running improves the coping strategy and learning performance in a stressful situation. This effect concurs with the reduced ACTH response to mild and severe stressors previously reported in male rats long-term trained in the treadmill [11], but contrasts with a recent study, which found that treadmill training did not prevent fear conditioning or the escape-learning deficit produced by uncontrollable stress [24]. The discrepancy between the aforementioned results and our present ones could, in part, be explained by the differences in the treadmill protocol employed. In that study [24], the rats were motivated to run by foot shocks and the intensity of the exercise was 14-20 m/min, with sessions of over 35 min of duration for a total of 6 weeks. In the present study, no foot shock motivation was used, the animals were trained at a lower intensity and the training lasted for 32 weeks. Additional experiments using different training protocols could help to confirm this explanation.

In summary, the present study demonstrates that long-term moderate treadmill running enhances two-way active avoidance acquisition in both adult male and female rats. This suggests that an exercise regimen of low intensity could improve behavioural coping strategies under stressful conditions, and that it also could be beneficial in clinical approaches.

References of manuscript Part 2B

- [1] Powell KE, Paluch AE, Blair SN. Physical activity for health: What kind? How much? How intense? On top of what? *Annu Rev Public Health* 2011;32:349–65.
- [2] Kaliman P, Párrizas M, Lalanza JF, Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M. Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process. *Ageing Res Rev* 2010;10:475–86.
- [3] Smith PJ, Blumenthal JA, Hoffman BM, Cooper H, Strauman TA, Welsh-Bohmer K, et al. Aerobic Exercise and Neurocognitive Performance: A Meta-Analytic Review of Randomized Controlled Trials. *Psychosom Med* 2010;72:239-252.
- [4] O’Callaghan RM, Griffin EW, Kelley AM. Long-Term Treadmill Exposure Protects Against Age-Related Neurodegenerative Change in the Rat Hippocampus. *Hippocampus* 2009;19:1019–29.
- [5] Uda M, Ishido M, Kami K, Masuhara M. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Res* 2006;1104:64–72.
- [6] Bayod S, del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Camins A, et al. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol* 2011;111:1380–90.
- [7] Asmundson GJ, Fetzner MG, Deboer LB, Powers MB, Otto MW, Smits JA. Let's get physical: a contemporary review of the anxiolytic effects of exercise for anxiety and its disorders. *Depress Anxiety* 2013;30:362-73.
- [8] Jayakody K, Gunadasa S, Hosker C. Exercise for anxiety disorders: systematic review. *Br J Sports Med* 2014;48:187-96.
- [9] Fulk LJ, Stock HS, Lynn A, Marshall J, Wilson MA, Hand GA. Chronic physical exercise reduces anxiety-like behavior in rats. *Int J Sports Med* 2004;25:78–82.
- [10] Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem* 2009;92:364–9.
- [11] Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Gagliano H, Fuentes S, Bayod S, Camins A, et al. Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37:1745–54.
- [12] Greenwood BN, Strong PV, Dorey AA, Fleshner M. Therapeutic effects of exercise: Wheel running reverses stress-induced interference with shuttle box escape. *Behav Neurosci* 2007;121:992–1000.

- [13] Prunell M, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Nunez JF, Tobena A. Anxiolytic Profiles of Alprazolam and Ethanol in the Elevated Plus-Maze Test and the Early Acquisition of Shuttlebox Avoidance. *Pharmacol Res* 1994;29:37-46.
- [14] Escorihuela RM, Tobeña A, Driscoll P, Fernández-Teruel A. Effects of Training, Early Handling, and Perinatal Flumazenil on Shuttle Box Acquisition in Roman Low-Avoidance Rats - Toward Overcoming a Genetic Deficit. *Neurosci Biobehav Rev* 1995;19:353-67
- [15] Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Nuñez JF, Zapata A, Boix F, Salazar W, et al. The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behaviour: psychopharmacological validation. *Brain Research Bulletin* 1991;23:173-176
- [16] García-Capdevila S, Portell-Cortés I, Torras-Garcia M, Coll-Andreu M, Costa-Miserachs D. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behav Brain Res* 2009;202:162-70.
- [17] Kennard JA, Woodruff-Pak DS. A comparison of low- and high-impact forced exercise: Effects of training paradigm on learning and memory. *Physiol Behav* 2012;106:423-7.
- [18] Hansalik M, Skalicky M, Viidik A. Impairment of water maze behaviour with ageing is counteracted by maze learning earlier in life but not by physical exercise, food restriction or housing conditions. *Exp Gerontol* 2006;41:169-74.
- [19] Chennaoui M, Merino DG, Lesage J, Drogou C, Guezennec CY. Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats. *Acta Physiol Scand* 2002;175:113-121.
- [20] Strasser B. Physical activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2013;128:141-59.
- [21] Boix F, Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Tobeña A. Handling-habituation prevents the effects of diazepam and alprazolam on brain serotonin levels in rats. *Behavioral Brain* 1990;36:209-215.
- [22] Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Núñez JF, Zapata A, Tobeña A. Beneficial effects of infantile stimulation on coping (avoidance) behaviour in rats are prevented by perinatal blockade of benzodiazepine receptors with Ro 15-1788. *Neurosci Letters* 1991;126:45-48.
- [23] Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Boix F, Tobeña, A. Effects of different handling-stimulation procedures and benzodiazepines on two-way avoidance acquisition in rats. *Pharmacological Research* 1991;24:273-282.

[24] Greenwood BN, Spence KG, Crevling DM, Clark PJ, Craig WC, Fleshner M. Exercise-induced stress resistance is independent of exercise controllability and the medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 2013;37:469–78.

Figures and Tables

Table 1. Body weight gain after 32 weeks of moderate treadmill training, averaged latencies over the 150 trials, total number of correct responses and Criterion 8 in the two-way avoidance learning for male and female rats.

Experiment	Group	Body weight gain	Mean Latencies	Total avoidances	Criterion 8
Females	SED	112 ± 13.9	6.2 ± 0.5	100.6 ± 6.7	59.7 ± 7
	CON	89.9 ± 11.8	5.4 ± 0.9	116.8 ± 5.7	45 ± 8.7
	TM	103.8 ± 10.8	5 ± 1	118.3 ± 2.8	28.9 ± 5.8*
Males	SED	185.5 ± 16.9	8.2 ± 0.9	79.6 ± 6.4	78.9 ± 10.1
	CON	188.4 ± 13.6	7.5 ± 2.3	87.6 ± 11.1	78.9 ± 12.8
	TM	173 ± 15.4	6.2 ± 1.1*	105.6 ± 4.9	48.5 ± 6.4*

SED, sedentary; CON, control; TM, treadmill group (n=8-14 per group). * $p < 0.05$ vs. SED.

Figure 1

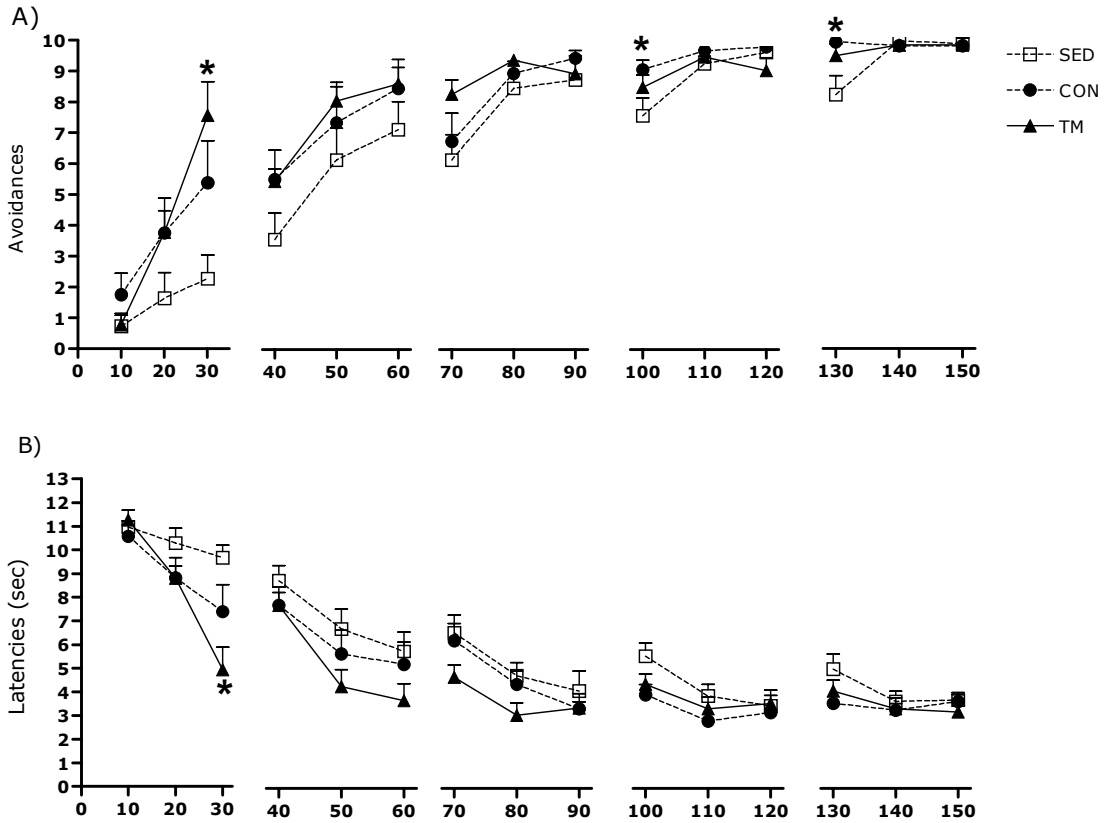


Figure 1. Mean \pm SEM of avoidances and escape latencies in the shuttle box (SB) over 3 10-trial blocks and sessions 1-5 for Experiment 1. SED, sedentary; CON, control; TM, treadmill females (n=8-9 per group). * $p < 0.05$ vs. SED.

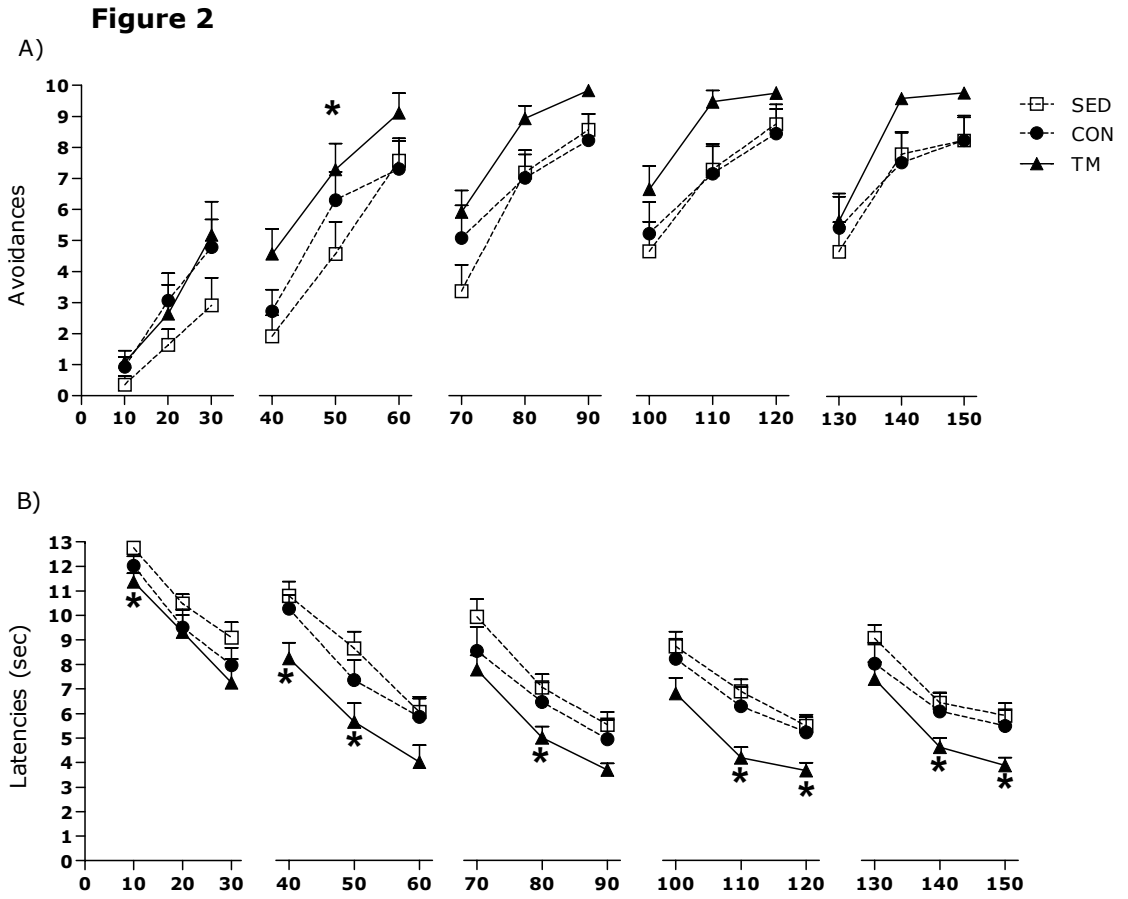


Figure 2. Mean \pm SEM of avoidances and escape latencies in the shuttle box (SB) over 10-trial blocks and sessions 1-5 for Experiment 2. SED, sedentary; CON, control; TM, treadmill males ($n=11-14$ per group). $*p < 0.05$ vs. SED.

Part 3: Dieta de Cafeteria

En aquest estudi vàrem administrar una dieta CAF a rates mascles i femelles adolescents (des del dia 21 de vida, just quan es deslleten) durant 8 setmanes. També vàrem incloure a un grup de mascles alimentats amb dieta CAF durant 7 setmanes als quals retirarem la dieta CAF la setmana 8ena, durant la qual es van alimentar exclusivament amb pinso. L'objectiu en aquest grup era avaluar els efectes conductuals i metabòlics de l'abstinència a la dieta CAF.

La dieta CAF induí sobrepés i síndrome metabòlica en rates mascles femelles i augmentava el pes corporal, el teixit adipós, la mida del fetge, així com un augment dels nivells plasmàtics de glucosa, insulina, triglicèrids colesterol i àcids grassos, en comparació amb les rates alimentades amb pinso del sexe corresponent. Cal destacar que després d'una setmana d'abstinència de la dieta CAF es revertiren significativament els nivells de glucosa, insulina i triglicèrids en plasma, i el pes del fetge en els animals abstinentes. A nivell conductual, la dieta CAF reduí l'ansietat en mascles i en femelles, però només en les femelles la dieta CAF incrementà l'activitat als braços oberts de l'EPM. En l'OF la dieta CAF incrementà el temps en el centre en els mascles. Per tant, tot i que la dieta CAF va reduir l'ansietat globalment, hi hagué efectes diferenciats de gènere en les proves conductuals. Finalment, les femelles van fer més joc social que els mascles (sobretot en el *grooming*), i la dieta CAF incrementà la sociabilitat tant en mascles com en femelles en comparació a la dieta de pinso estàndard.

Per tant, es pot concloure que la dieta CAF en animals adolescents és un bon model per generar síndrome metabòlica i estudiar els efectes nocius d'aquest tipus d'alimentació al llarg de l'adolescència. Les aportacions principals són la demostració de l'efecte ansiolític de la dieta CAF i la reversió parcial de les afectacions metabòliques d'una setmana d'abstinència a la dieta CAF. Finalment, igual que en la Part 2B i en els Annexes, hi ha diferències entre mascles i femelles que haurien de ser considerades en futurs treballs.

Effects of a Post-Weaning Cafeteria Diet in Young Rats: Metabolic Syndrome, Reduced Activity and Low Anxiety-Like Behaviour

Jaume F. Lanza^{1,2}, Antoni Caimari³, Josep M. del Bas³, Daniel Torregrosa¹, Igor Cigarroa^{1,4}, Mercè Pallàs^{5,6}, Lluís Capdevila², Lluís Arola^{3,7}, Rosa M. Escorihuela^{1*}

1 Institut de Neurociències, Departament de Psiquiatria i Medicina Legal, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Laboratori de Psicologia de l'Esport, Departament de Psicologia Bàsica, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (CTNS), TECNIO, CEICS, Reus, Spain, **4** Grado de Kinesiologia, sede Los Angeles, Facultad de Salud, Universidad Santo Tomás, Chile, **5** Secció de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **6** Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain, **7** Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Nutrigenomics Research Group, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

Abstract

Among adolescents, overweight, obesity and metabolic syndrome are rapidly increasing in recent years as a consequence of unhealthy palatable diets. Animal models of diet-induced obesity have been developed, but little is known about the behavioural patterns produced by the consumption of such diets. The aim of the present study was to determine the behavioural and biochemical effects of a cafeteria diet fed to juvenile male and female rats, as well as to evaluate the possible recovery from these effects by administering standard feeding during the last week of the study. Two groups of male and female rats were fed with either a standard chow diet (ST) or a cafeteria (CAF) diet from weaning and for 8 weeks. A third group of males (CAF withdrawal) was fed with the CAF diet for 7 weeks and the ST in the 8th week. Both males and females developed metabolic syndrome as a consequence of the CAF feeding, showing overweight, higher adiposity and liver weight, increased plasma levels of glucose, insulin and triglycerides, as well as insulin resistance, in comparison with their respective controls. The CAF diet reduced motor activity in all behavioural tests, enhanced exploration, reduced anxiety-like behaviour and increased social interaction; this last effect was more pronounced in females than in males. When compared to animals only fed with a CAF diet, CAF withdrawal increased anxiety in the open field, slightly decreased body weight, and completely recovered the liver weight, insulin sensitivity and the standard levels of glucose, insulin and triglycerides in plasma. In conclusion, a CAF diet fed to young animals for 8 weeks induced obesity and metabolic syndrome, and produced robust behavioural changes in young adult rats, whereas CAF withdrawal in the last week modestly increased anxiety, reversed the metabolic alterations and partially reduced overweight.

Citation: Lanza JF, Caimari A, del Bas JM, Torregrosa D, Cigarroa I, et al. (2014) Effects of a Post-Weaning Cafeteria Diet in Young Rats: Metabolic Syndrome, Reduced Activity and Low Anxiety-Like Behaviour. *PLoS ONE* 9(1): e85049. doi:10.1371/journal.pone.0085049

Editor: Nick Ashton, The University of Manchester, United Kingdom

Received: August 13, 2013; **Accepted:** November 25, 2013; **Published:** January 15, 2014

Copyright: © 2014 Lanza et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The research leading to these results has received funding from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (PSI 2011-29807-C02/PSIC), ACCIO (TECRD11-1-0012) and the European Union's Seventh Framework Programme FP7 2007-2013 under grant agreement n° 244995 (BIOCLAIMS Project). JFL received a fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2011) and IC received a fellowship from the Universidad Santo Tomás de Chile. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rosamaria.escorihuela@uab.cat

Introduction

In recent decades, the prevalence rates of paediatric overweight and obesity have been increasing, reaching 20% or more in some countries [1,2]. Paediatric obesity is frequently associated with cardiometabolic risk factors and severe components of the metabolic syndrome, such as impaired insulin resistance, high glucose, triglycerides and HDL-cholesterol levels, as well as high blood pressure values [3,4].

Animal models developed to induce obesity in rodents are usually based on different forms of diet containing high fat, high sugar or palatable foods regularly consumed by humans. Among such diets, the cafeteria (CAF) diet has been shown to consistently increase body weight, induce hyperphagia and alter the metabolic factors clustered in the metabolic syndrome [5,6]. Moreover, because the CAF diet also produces inflammation in fat and liver,

it is a unique and important platform for studying obesity, as it induces the human metabolic syndrome-like phenotype more effectively than a high-fat diet (HFD) [6]. Administration of the CAF diet for 15 days to young adult male and female rats increased adiposity and decreased adiponectin production in white adipose tissue, whereas the levels of insulin in plasma, insulin sensitivity and body weight did not change in males [7]. This finding was interpreted as an early response to obesity because, in both rats and humans, a decreased production of adiponectin secreted by adipose tissue is a characteristic of obesity [8,9] that, in turn, could contribute to insulin resistance. In another study, the CAF diet administered to female rats, from weaning to adulthood, induced obesity by increasing body and fat pad weight, resulting in increased levels of triglycerides, total cholesterol and LDL-cholesterol, as well as induced insulin resistance and reproductive deficits [10].

From a different perspective, emotions are related with eating behaviour. Consistent data suggest that negative mood induces overeating and weight gain, and that eating behaviour reduces anxiety [11]. Palatability is critical in determining food preference [12], and it appears that high levels of stress can increase the consumption of this type of food [13]. A recent study of college students has shown that the desire for and consumption of palatable food were augmented by negative emotions, such as stress, boredom or anxiety [14]. However, the direct emotional implications of eating behaviour and obesity in animal models have not been determined. Work undertaken with non-obese rats showed that low-anxiety rats had a higher preference for a palatable high-fat diet than did high-anxiety rats [15], and that a palatable HFD or chocolate partially ameliorated anxiety as well as depressed mood levels caused by adverse early life experiences [16,17]. Yet, in contrast, another study showed that diet-induced obese rats were more anxious and aggressive than the non-obese ones [18]. In that study, animals were fed with a high-fat non-palatable diet, thereby, emphasizing food palatability as a possible factor required for reducing anxiety. High-fat diets are usually a semi-purified chow diet with an elevated calorie content that, in rodents, did not cause the noticeable hyperphagia that a palatable cafeteria diet does [6,19].

The present experiment aimed to evaluate the behaviour of obese male and female rats fed with the CAF diet in terms of locomotor activity, exploration, anxiety-like behaviour and social interaction tests. As we were interested in studying cafeteria diet-induced obesity in young adulthood, animals were fed with the corresponding CAF or standard (ST) diets for 8 weeks starting at weaning. Our hypothesis was that, as a result of CAF feeding, anxiety-related behaviour and locomotor activity would decrease in young adult obese animals. Body weight, liver weight, retroperitoneal white adipose tissue (RWAT) weight and biochemical parameters clustered in the metabolic syndrome were evaluated to determine diet and gender dependent effects and/or interactions on these variables. It was also investigated whether or not 7 weeks of CAF diet, followed by a shift to standard chow diet during the final 8th week (CAF withdrawal) could partially reverse the negative effects of the palatable CAF diet.

Results

Impact of CAF diet on body and tissue weights

At the beginning of the experiment, body weight did not differ between male and female rats. CAF-fed males and females increased the amount of solid and fluid intake compared to ST-fed animals, with a consequent increase in energy and macronutrient consumption (see Table S1). Body weight increased progressively over weeks, and both male and female CAF-fed animals were significantly overweight from week 5 of the diet onwards, as compared to the corresponding ST-fed rats of the same sex (Figure 1). At the end of the study (8th week), CAF-fed males and females had become overweight by 16.3% and 21.1%, respectively, in comparison with their respective ST-fed controls. Relative liver weight (%) and relative RWAT weight (%) were significantly increased in CAF-fed animals compared with the ST-fed groups (Table 1). This latter effect on RWAT was more pronounced in females than in males (Table 1).

Metabolic consequences of CAF feeding

As shown in Table 1, 8 weeks of CAF feeding significantly increased the plasma glucose and insulin levels in both males and females. Consequently, the homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was higher in these animals,

indicating a decrease in insulin sensitivity as a consequence of the CAF diet intake. Both male and female CAF-fed animals showed increased plasma triglyceride levels, with this effect being more evident in males than in females (Table 1). The plasma cholesterol levels were higher in females than in males, and CAF feeding only raised this parameter in females (Table 1). In both male and female rats, there were no changes in free fatty acid levels in response to CAF feeding (Table 1).

CAF feeding increased exploration

Animals were tested using the hole-board apparatus to evaluate motor activity by the number of crossings (the floor was divided into 16 squares) and exploratory behaviour through the holes in the floor (head-dipping behaviour). More exploration (frequency and duration of head dips) is indicative of high curiosity and interest in novelty-seeking behaviour [20]. Overall, CAF feeding reduced the number of crossings (Figure 2A), but increased both the number of head dips and the time spent head dipping (Figures 2B and 2C), thereby indicating reduced motor activity and increased exploratory behaviour in the CAF-fed animals compared to the ST-fed animals. Females showed a tendency to explore more than males (gender effect: number of head dips: $p = 0.098$; time spent head dipping: $p = 0.051$) (Figures 2B and 2C).

CAF feeding decreased activity and anxiety

To evaluate anxiety-like behaviour, the animals were tested in the elevated plus maze (EPM) consisting of two open arms and two enclosed arms with walls alternatively positioned forming the shape of a plus sign. A high amount of time and number of entries into the open arms is considered to indicate low anxiety [21], while the distance travelled in the enclosed arms is considered to be a measure of locomotion [22].

The intake of the CAF diet reduced the travelled distance in the enclosed arms in both males and females (Figure 3B), while in females, it increased the behaviour in the open arms. CAF-fed females almost doubled the percentage of time spent in the open arms (Figure 3D), and residually increased the percentage of entries in the open arms compared with ST-fed females (Figure 3C).

Overall, females were less active and slightly less anxious than males, as they travelled shorter distances in the enclosed arms (Figure 3B), and also slightly increased the percentage of entries in the open arms in comparison with the males (Figure 3C).

The analyses of activity and anxiety variables measured in the open field were consistent with the results of the EPM. Again, CAF feeding had reduced locomotor activity since CAF-fed male and female rats showed an overall reduction in the distance travelled in the test arena (Figure 4A). Moreover, as CAF-fed animals spent significantly more time in the central area of the open field, they again displayed reduced anxiety-like behaviour, which was lower than that of the animals fed with ST chow (Figures 4B). Regarding gender behavioural patterns, overall females were more active (Figures 4A), and spent less time in the central area of the open field than males (Figure 4B).

CAF feeding increased social behaviour

CAF-fed animals increased the frequency of social behaviour and specifically increased the frequency of pouncing and following (Figures 5A, 5D and 5F). The patterns of social interaction differed between genders. Females did more following, social grooming and total interactions than males (Figures 5A, 5C and 5F), and also showed a residual increase of boxing/wrestling episodes compared with males (Figure 5B). Males slightly increased the number of pursuits in comparison with females (Figure 5D).

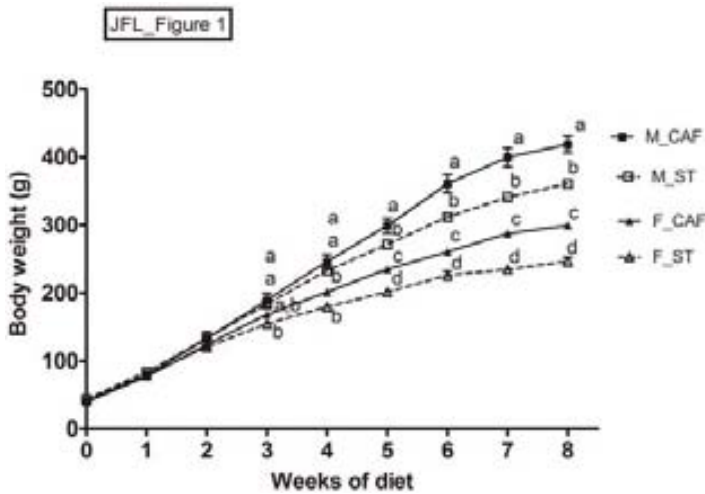


Figure 1. Male (M) and female (F) rats were fed from weaning (at day 21 of life, week 0) and for 8 weeks with standard chow (ST) or cafeteria diet (CAF). The data represent mean \pm SEM of body weight (n=8). The increase of body weight over the 8-week period was greater in animals fed with the CAF diet than in animals fed with the ST diet (diet x week interaction), as well as in males than females (gender x week interaction, two-way ANOVA for repeated measures). ^{abcd}Mean values with unlike letters were significantly different between groups (one-way ANOVA and Tukey's post hoc comparison, $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0085049.g001

Effects of CAF withdrawal on body and tissue relative weights, biochemical parameters and behaviour

The group of males fed the CAF diet for 7 weeks and the ST chow only during the 8th week (CAF withdrawal) showed a slightly reduced body weight gain in comparison with the CAF-fed group of males, and had become overweight by only 8.6% compared to the ST-fed group (Table 1 and Figure 1), which is qualitatively less

than the 16.3% overweight shown by CAF-fed male rats. Moreover, CAF withdrawal reversed the relative liver weight (%) increase observed in the males of the CAF-fed group (Table 1).

CAF withdrawal and the shift to ST feeding only during the 8th week restored insulin sensitivity and completely reversed the increase in glucose, insulin and triglyceride plasma levels induced by CAF feeding during the previous 7 weeks (Table 1).

Table 1. Biometric and plasma parameters of male and female rats fed with a standard chow diet (ST) or a cafeteria diet (CAF) + standard chow diet.

	M_ST	M_CAF	F_ST	F_CAF		M_ABS
Biometric parameters						
Body weight gain (g)	316 \pm 6 ^A a	378 \pm 11 ^B b	204 \pm 7 ^C	259 \pm 4 ^D	D, G	350 \pm 9 ^b
Liver weight (%)*	2.8 \pm 0.1 ^A a	3.1 \pm 0.1 ^B b	2.6 \pm 0.1 ^A	2.7 \pm 0.1 ^A	D, G	2.8 \pm 0.1 ^a
RWAT weight (%)*	0.80 \pm 0.05 ^A a	1.9 \pm 0.3 ^B b	0.82 \pm 0.05 ^A	2.9 \pm 0.1 ^C	D, G, DxG	1.7 \pm 0.2 ^b
Plasma parameters						
Glucose (mmol/L)	5.6 \pm 0.2 ^A a	6.8 \pm 0.3 ^B b	5.6 \pm 0.1 ^A	6.8 \pm 0.3 ^B	D	6.0 \pm 0.2 ^{ab}
Insulin (mmol/L)	7.8 \pm 1.1 ^A a	26.4 \pm 7.0 ^B b	4.8 \pm 0.6 ^A	21.2 \pm 4.4 ^B	D	8.7 \pm 1.4 ^a
HOMA-IR	2.0 \pm 0.3 ^A a	8.6 \pm 2.6 ^B b	1.2 \pm 0.2 ^A	6.6 \pm 1.6 ^B	D	2.3 \pm 0.4 ^a
Triglycerides (mmol/L)	0.70 \pm 0.03 ^A a	1.4 \pm 0.05 ^B b	0.70 \pm 0.04 ^A	1.0 \pm 0.05 ^C	D, G, DxG	0.80 \pm 0.1 ^a
Total cholesterol (mmol/L)	3.1 \pm 0.2 ^A	2.9 \pm 0.1 ^A	3.7 \pm 0.2 ^B	4.7 \pm 0.1 ^C	D, G, DxG	3.1 \pm 0.2
Free fatty acids (mmol/L)	0.70 \pm 0.02 ^{AB}	0.64 \pm 0.04 ^A	0.80 \pm 0.02 ^B	0.68 \pm 0.04 ^{AB}	D	0.61 \pm 0.03

Legend Table 1. Male (M) and female (F) rats were fed from weaning (at day 21 of life) and for 8 weeks with a ST (M_ST and F_ST groups) or a CAF diet (M_CAF and F_CAF groups). An extra group of males were fed with the CAF diet for 7 weeks and with the ST diet only for the final week of the study (M_ABS group). The data are given as the mean \pm SEM (n=7-8). *Relative liver weight and relative RWAT weight were calculated following the formula (100* tissue weight/body weight) and expressed as a percentage of the total body weight. The statistical comparison between males and females fed with a ST (M_ST and F_ST groups) or a CAF diet (M_CAF and F_CAF groups) was performed by two- and one-way ANOVA. D: the effect of the type of diet. G: the effect of the gender (two-way ANOVA, $p < 0.05$). ^{ABC} Mean values within a row with unlike capital letters were significantly different between groups (one-way ANOVA and Tukey's post hoc comparison, $p < 0.05$). In males (M_ST, M_CAF and M_ABS groups), ^{ab} mean values within a row with unlike small letters indicate where there are significant differences between groups (one-way ANOVA and Tukey's post hoc comparison, $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0085049.t001

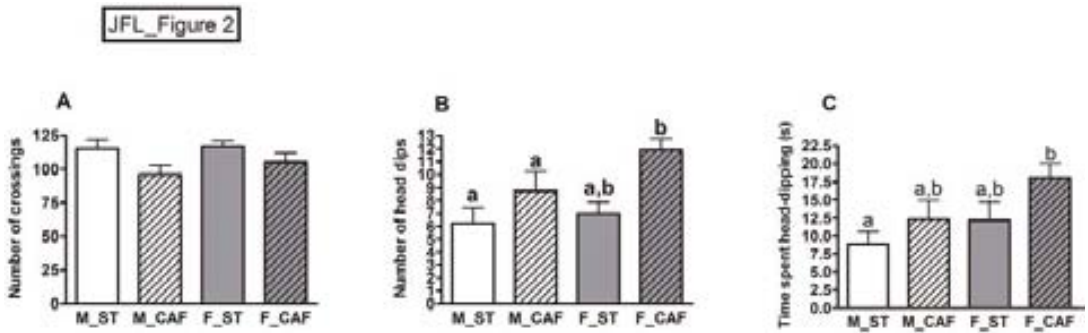


Figure 2. Response to novelty in the hole board. The number of crossings (A), number of head dips (B) and time spent head dipping (C) during the trial was evaluated in male (M) and female (F) rats fed from weaning (at day 21 of life) and for 8 weeks with standard chow (ST) or the cafeteria diet (CAF). The data are given as the mean \pm SEM (n=8). Two-way ANOVAs revealed that the CAF diet decreased the number of crossings ($p < 0.05$) and increased head-dipping behaviour (number: $p < 0.01$; time: $p < 0.05$). Females spent moderately more time head dipping than males ($p = 0.051$, gender effect). ^{ab}Mean values with unlike letters were significantly different between groups (one-way ANOVA and Tukey's post hoc comparison, $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0085049.g002

The analysis of exploration in the hole board (HB), as well as the data for the EPM and the social interaction test revealed no significant changes in the CAF withdrawal group compared to the CAF-fed animals (data not shown). However, analysis of the time spent in the centre of the open field showed a significant effect

(one-way ANOVA: $F(2,22) = 6.33$, $p < 0.01$; means \pm SEM: M_ST, 57.74 ± 9.02 ; M_CAF, 98.73 ± 9.59 ; M_ABS, 86.27 ± 5.7). *Post hoc* comparisons revealed that CAF withdrawal in the last week partially restored the differences, as the CAF-fed group spent significantly more time in the centre of the open field compared to

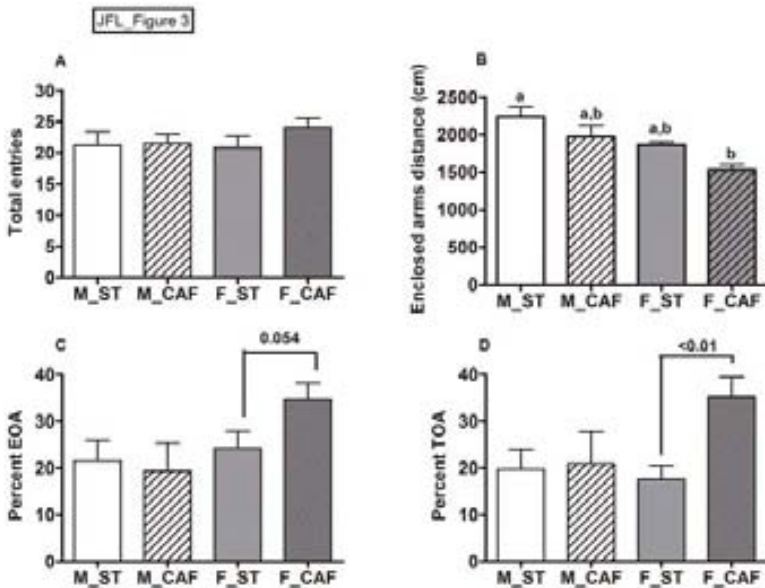


Figure 3. Behaviour in the elevated plus maze test. The number of total entries (A), distance travelled in the enclosed arms (B), percentage of entries into the open arms (C) and percentage of time spent in the open arms (D) during the trial was evaluated in male (M) and female (F) rats fed from weaning (at day 21 of life) and for 8 weeks with standard chow (ST) or the cafeteria diet (CAF). The data are given as the mean \pm SEM (n=8). Two-way ANOVAs revealed that the CAF diet decreased the distance travelled in the enclosed arms (diet effect: $p < 0.05$) and slightly increased the percentage of TOA (diet effect: $p = 0.061$). Females travelled shorter distances than males in the enclosed arms (gender effect: $p < 0.01$) and moderately increased the percentage of EOA (gender effect: $p = 0.055$). ^{ab}Mean values with unlike letters were significantly different between groups (one-way ANOVA and Tukey's post hoc comparison, $p < 0.05$). The significance of a Student's t-test between the groups indicated is shown in (C) and (D), revealing that the F_CAF group increased behaviour in the open arms compared to the F_ST group. doi:10.1371/journal.pone.0085049.g003

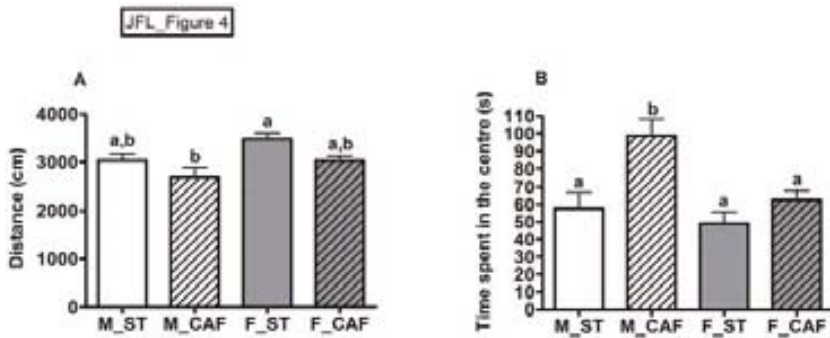


Figure 4. Open field test. The behaviour of the rats was measured during the 5-min session. Panels A and B show the total distance and the time spent in the central area of the apparatus. The data are given as the mean \pm SEM (n=8). The CAF diet decreased the distance travelled ($p<0.01$) and increased time in the centre ($p<0.01$; diet effect in the two-way ANOVA). Females were more active ($p<0.01$) and spent less time in the centre ($p<0.01$) compared to males (gender effect in the two-way ANOVA). ^{ab} Mean values with unlike letters were significantly different between groups (one-way ANOVA and Tukey's post hoc comparison, $p<0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0085049.g004

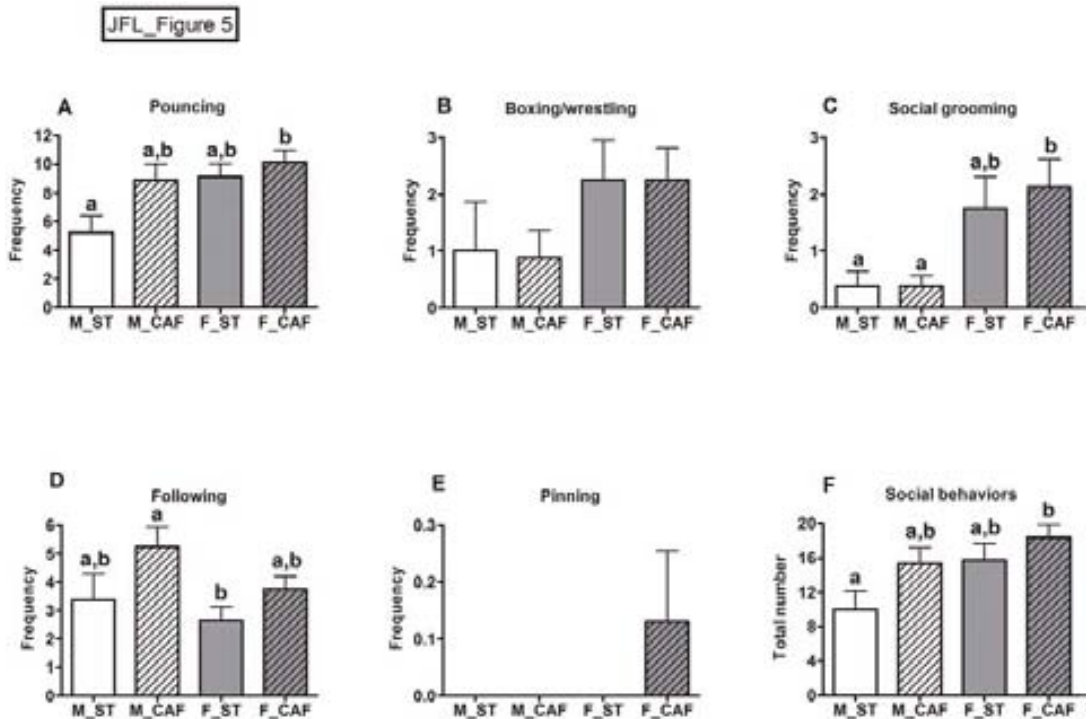


Figure 5. Social play test. The data represent the mean \pm SEM of the following behaviours (n=8): A) pouncing (jumping on or attacking the partner's nape); B) boxing/wrestling (rats stand on their hind paws and struggle using the forepaws); C) social grooming (sniffing or licking the partner); D) following/chasing (pursuing the partner); E) pinning (holding the partner in a supine position); and F) the total number of social play behaviours. Male (M) and female (F) rats were fed from weaning (at day 21 of life) and for 8 weeks with standard chow (ST) or the cafeteria diet (CAF). Two-way ANOVAs indicated that the cafeteria diet increased the frequency of pounces and pursuits and the total number of social behaviours (diet effect in all three variables $p<0.05$). Females showed more pouncing, grooming and total number of behaviours than males (two-way ANOVA, gender: $p<0.05$), as well as a residual increase in boxing (two-way ANOVA, $p=0.059$). Males slightly increased the number of pursuits in comparison with females (two-way ANOVA, $p=0.098$). ^{ab}Mean values with unlike letters were significantly different between groups (one-way ANOVA and Tukey's post hoc comparison, $p<0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0085049.g005

the ST-fed group ($p < 0.01$, Tukey's test), whereas the ST-fed and CAF withdrawal groups showed a residual difference ($p = 0.073$). This result indicated that the administration of standard chow during the last week partially reversed the anxiolytic effect produced by CAF feeding. No significant effects were found for the distance travelled.

Discussion

The present study shows that a palatable CAF diet administered from weaning to male and female rats increased food and fluid consumption, induced body weight gain, increased adiposity and liver weight, and produced different metabolic disturbances strongly related with the development of the metabolic syndrome, such as hypertriglyceridemia, hyperglycaemia and insulin resistance. It is known that CAF feeding induces hyperphagia, increases food, energy, fat and carbohydrate intake [23] leading to overconsumption of the high energy density foods contained in the diet [23]. Moreover, the deleterious effects of the CAF diet on body weight, adiposity, plasma lipid profile and insulin sensitivity have been well described [5–7,24]. The response to CAF diet was different between males and females in some parameters, such as RWAT weight and cholesterol that increased more in CAF-fed males than in CAF-fed females and triglycerides that increased more in CAF-fed males than in CAF-fed females. These results are in line with the reported sex-associated differences in the regulation of proteins controlling body weight [25], and with the gender differential metabolic responses to the consumption of a palatable diet found after administering distinct forms of early stress to the animals [26,27].

Behavioural results indicated that CAF-fed animals were less active than ST-fed animals in all behavioural tests. They consistently crossed a smaller number of squares in the hole board and travelled shorter distances in the enclosed arms of the EPM and in the open field, in comparison with the ST-fed controls. This behavioural pattern concurs with the decreased activity (and hyperphagia) shown by a knockout obese rat model for monogenic obesity in humans [28], and by obese adult rats fed with a high-fat diet [19]. In contrast, Souza et al [29] reported no differences in open field crossings (but increased anxiety-like behaviour) after four months of palatable diet feeding, compared with standard chow feeding. Curiously, no body weight differences were detected as a result of the diet in that study, even though body fat mass, insulin sensitivity and glucose tolerance were all altered in animals fed the palatable diet. Moreover, no changes in locomotor activity or body weight were reported after one week of a choice diet containing chow, lard and sucrose, which increased blood glucose and fat stores (mesenteric, epididymal, inguinal and perirenal white adipose tissues), or after 4 weeks of high fat, high carbohydrate chow [30,31]. In humans, a longitudinal study performed with twin pairs discordant for obesity in young adulthood reported that obese co-twins were less active than non-obese co-twins according to an interview and questionnaire indices, and confirmed by accelerometers [32]. These results corroborate that obesity contributes to reducing activity. Hence, taken altogether, these results suggest that the overweight or obesity induced by the diet appears to be a specific and critical requirement for producing a significant decrease in activity levels.

A relevant finding of our study is that, for almost all variables analysed, the CAF diet produced an increase in exploratory behaviour, as well as a robust anti-anxiety effect. The CAF diet specifically increased head-dipping behaviour in the hole board, which has been validated as a measure of exploration [21]. Interestingly, selectively bred low-anxiety rats also showed

increased head-dipping behaviour [33]. Moreover, manipulations that reduce anxiety, such as environmental enrichment [34], also increased exploratory activity in the hole board [35]. The results obtained in the present study consistently indicated that CAF feeding reduced anxiety. CAF-fed animals spent more time in the centre of the open field and increased the percentage of time and entries into the open arms of the EPM, although the magnitude of the effect varied by gender. In the open field, the effect was more pronounced in males than females, since males spent around 100 s in the centre during the 5-min test, whereas females spent 63 s. In the elevated plus maze the behaviour in the open arms was significantly enhanced to 35% in CAF-fed females compared to 20% in males. As rodents are fearful of open, unprotected or light spaces, the animals showing increased behaviour in such areas were interpreted as being less anxious [22,36]. Previous studies have consistently reported that a palatable CAF diet reduces the negative impact of early stress in terms of anxiety, depression-like symptoms and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) activity [29,37]. There is a discrepancy with one study showing increased anxiety and basal corticosterone levels, but partly increased social interaction in obese rats fed with a high-fat diet [19]. Inconsistent results could be due to methodological differences related to the type of rats, housing conditions or the testing procedure. However, it cannot be ruled out that reduced anxiety is a specific effect produced by palatable food, but not by other non-palatable obesity-inducing diets.

In agreement with the low-anxiety behavioural profile shown in the other tests, animals fed with the CAF diet also showed increased social behaviour and, more specifically, they did more pounces and pursuits than ST-fed rats. Social behaviour has been validated and used for detecting anxiolytic drugs [38,39] and, as a rule, increases in social behaviours indicate low anxiety levels. The main social interaction behaviours in adult rats for which scores have been recorded are social grooming (sniffing and licking), following, boxing and wrestling [38]. In the present study, scores were also recorded for pouncing and pinning, which are social behaviours related with social play in younger rats. Pouncing is considered to be the initial behaviour for soliciting play, while pinning is the most characteristic posture in the social play of juvenile rats [40]. Social play has stress-reducing effects, is rewarding and is crucial for the development of social skills and competences [40]. Our assumption was that, as our animals were young adults aged 10–11 weeks at the time of testing, some play behaviour would be observed. Therefore, the fact that CAF feeding increased pouncing (but not pinning) as well as the total number of social behaviours indicated that the CAF diet enhanced social interest and motivation to play. Moreover, this is consistent with the low levels of anxiety observed in the other tests of the present experiment, with those stress-reducing effects that have already been attributed to palatable food [41], and with another study reporting a reduction of the stress hormone response and a decrease in the corticotropin-releasing factor mRNA levels in the hypothalamus of animals fed with comfort food [42].

We do not know which mechanisms underlie the anxiolytic action of the CAF diet. Several systems modulating anxiety and related with food and feeding behaviour could be candidates. One is the CRF-CRF1 receptor system of the nuclei of the amygdala that has been recently involved in excessive eating of palatable food [43]. A second candidate is the type 1 cannabinoid (CB1) receptor that renders food more or less pleasurable [44] and mediates the reduction of anxiety-like behaviour induced by the inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) [45]. Another potential system is the benzodiazepines (BZs)/GABAA receptor complex, which contains

the site of action of many anxiolytics, anticonvulsants and hypnotics, and mediates benzodiazepines-induced hyperphagia [46]. Further research about any of these systems will help to increase clarification of the molecular mechanisms and the brain regions underlying the behavioural effects of the CAF diet.

Yet, it has also been reported that post-weaning isolation rearing increased anxiety-like behaviour, decreased social interaction and altered hormonal response to stress in both rats [47] and mice [48]. Furthermore, it has been shown that chronic stress can increase the ingestion of palatable food [42]. Hence, it cannot be ruled out that the negative mood associated to isolation rearing contributed to increase food intake, weight gain and obesity in the present animals, which were also isolated after weaning. However, in a different experiment performed in our laboratory with pair-housed rats, body weight gain curves were similar to those found in the present study by both CAF- and ST-fed rats (data not shown). In an exhaustive review, Fone and Pakess [49] argued that the full behavioural change associated with social isolation in rodents requires a strict protocol, and that any form of contact with a conspecific or excessive handling by the experimenter can negate the expected isolation-induced changes. As the CAF diet required daily fresh food, CAF-fed animals were handled daily when measuring water and chow consumption, as were the ST-fed animals. Those daily interventions involved some interaction with the animal and decreased the level of isolation. Further experiments, which allow direct comparisons to be made between isolated and group-housed rats fed with either CAF or ST diets, are required to confirm the possibility that daily interventions reduced the impact of rearing in complete isolation, and increased the “dampening effect” on the final amount of stress suffered by the animals.

Surprisingly, CAF withdrawal during the final 8th week allowed the animals to recover triglycerides, glucose and insulin sensitivity, as well as liver weight. Some studies have shown an improvement in different parameters clustered in the metabolic syndrome in rats switched from the CAF diet to the ST diet [50–52]. In a study performed with adult male Sprague-Dawley rats fed with a CAF diet for 16 weeks, the switch from the CAF diet to ST chow for 9 days produced a significant decrease of the white adipose tissue mass and the plasma levels of leptin and glucose [51]. Ong et al [52] found similar results in female, but not in male, Albino Wistar rats fed with a CAF diet for 8 weeks and then switched to chow for 72 hours. However, in any of these studies no changes were found in plasma insulin levels and no data related to the plasma levels of triglycerides, liver weight and insulin sensitivity were available [51,52]. Therefore, to the best of our knowledge, the present study provides new evidence of a beneficial recovery effect on many parameters clustered in the metabolic syndrome, after only one week of CAF withdrawal.

The animals withdrawn from the CAF diet behaved like CAF-fed animals in most of the behavioural tests except in the open field, where they showed a decrease in the time spent in the centre, thereby indicating increased anxiety compared to the CAF-fed animals. This is consistent with an interesting study of Pickering et al [53] who also found increased anxiety in the open field in diet-induced obese rats after 2 weeks of diet withdrawal. Animals receiving a high-fat high-sugar (HFHS) diet for 7 weeks were divided into obesity-prone and obesity-resistant groups based on the relative weight gain and tested 2 weeks after withdrawal. Interestingly, the withdrawal from the HFHS diet only induced craving in obesity-prone animals, but not in obesity-resistant animals also fed with the HFHS diet, thus suggesting that negative emotions associated with food withdrawal could depend on the severity of overweight or obesity.

In conclusion, the present study shows that CAF feeding of young animals robustly yields reduced activity and decreased anxiety in male and female rats not suffering stressful circumstances in either their past or present life. A major new finding is the partial recovery from some metabolic alterations found only one week after CAF withdrawal, which also occurred simultaneously with an increase of anxiety levels. In addition, our study indicates the behavioural and metabolic implications of CAF feeding in young animals, and that further research is needed to evaluate possible recovery after withdrawal.

Methods

Ethics Statement

The experimental protocol was approved by the *Generalitat de Catalunya (DAAM 6643)*, following the ‘Principles of laboratory animal care’ and was carried out in accordance to the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

Animals and housing conditions

The animals were male and female Sprague-Dawley rats bred and raised at the main animal facility of the *Universitat de Barcelona*. They were weaned at 21–22 days of age, housed singly, maintained in standard conditions of temperature ($22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity (50 ± 10) and on a 12–12 h light-dark schedule (lights on at 0800h), and fed with the corresponding diet (see below).

Cafeteria and standard diets

The rats were fed from weaning (at day 21 of life) and for 8 weeks with either a standard chow (ST) (Harlan, Barcelona, Spain) (M_ST and F_ST groups) or a CAF diet (M_CAF and F_CAF groups) with the following components (quantity per rat): bacon or frankfurter (8–12 g); biscuit with pâté (12–15 g); biscuit with cheese (10–12 g); muffins or *ensaimada* (pastry) (8–10 g); carrots (6–8 g); milk with sugar (220 g/l; 50 ml); water (*ad libitum*); and ST chow. The ST chow had a calorie breakdown of 24% protein, 18% fat and 58% carbohydrates, whereas the calorie breakdown of the CAF diet was: 10% proteins; 41% fat; and 49% carbohydrates. It is worth noting that not all the components of the CAF diet are equally eaten by the animals, as they are accustomed to having a higher preference for compounds that have a higher lipid content [7]. The animals were fed *ad libitum*, and the food was renewed daily. Body weight was monitored weekly over 8 weeks. A third group of males was fed with the CAF diet for 7 weeks and with ST chow only for the 8th week (M_ABS group) to determine the effects of CAF diet withdrawal during the last week of the study.

Food was withdrawn 12–14 h before sacrifice. Animals were sacrificed by beheading and total blood collected. Serum was obtained by centrifugation at 4°C , 2000 g for 15 minutes and stored at -80°C until further use. Retroperitoneal white adipose tissue (RWAT) and liver were dissected and weighed.

Plasma biochemical analysis

Enzymatic colorimetric kits were used for the determination of serum glucose, triglycerides, cholesterol (QCA, Barcelona, Spain) and free fatty acids (WAKO, Neuss, Germany). Serum insulin was determined by a rat/mouse ELISA kit (Millipore, Barcelona, Spain) following the manufacturer’s instructions.

HOMA-IR analysis

Homeostasis model assessment-estimated insulin resistance (HOMA-IR) was calculated following the formula: $(\text{Glucose} \times \text{Insulin})/22.5$ as described previously [54].

Behavioural procedures

Behavioural experiments were carried out during the 7th and 8th weeks of administering the diets, when the animals were 10 and 11 weeks of age.

Animals were tested for exploratory activity in the hole board (HB) (day 1), anxiety in the elevated plus maze (EPM) (day 2), locomotion and activity in the open field (day 3) and social interaction (day 5). All experiments were carried out in the morning (between 9:00 am and 2:00 pm) in an isolated experimental room with dim lighting. All procedures were videotaped and further analysed by a researcher who was unaware of the treatment that each animal had received.

Hole-board test

The hole-board test for measuring exploratory behaviour [20] consisted of a white (66×66×47 cm) wooden box with four equidistant holes (3.7 cm in diameter, 18 cm deep) in the floor, which was divided into 16 equal squares with a red marker. The animal was placed in the centre of the floor apparatus and allowed to explore the holes for five minutes. The number of squares crossed (ambulation), the number of head dips and the time spent head dipping were measured.

Elevated plus maze test

The EPM test [21] apparatus consisted of four arms (44 cm long × 10 cm wide) made of black formica extending from a 10 cm square centre positioned 90° from each other to form the shape of a plus sign. Two of the opposing arms had wooden walls (closed arms, 40 cm high), whereas the other two were the open arms that had only a 0.5 cm ridge to provide additional grip. The whole maze was elevated 50 cm above the floor. The rat was placed in the centre of the maze (always facing the same closed arm) and, for five minutes, scores were recorded for the number of entries into the open and closed arms (defined as placing all four paws into a given arm), and for the total time spent in the open and closed arms. The distance travelled in the enclosed arms was video tracked (Smart 2.4, Panlab, Barcelona, Spain). The behaviour in the open arms is indicative of the anxiety levels of the animal, with a high amount of time and entries into the open arms being indicative of low anxiety.

Open field test

The open field was a wooden grey box (75×45×45 cm). A central area (20 cm × 40 cm) was drawn in the floor of the apparatus to score the time in this central zone that is considered to indicate decreased anxiety [55]. The animals were individually placed in and allowed to explore the apparatus for 5 min. The distance travelled and the time spent in the central area were video tracked.

Social interaction test

The social play interaction test was performed in the open field where the animals had been previously tested. The animals were again placed in the open field the day before the social interaction

test to allow habituation to the apparatus [39]. Naive juvenile male and female rats (5-week-old) were used as social stimulus for interaction. The test consisted of placing the experimental rat and a juvenile rat of the same sex in the box for 5 min. Trials were videotaped and a trained observer, who was blind to the animal's treatment, scored the following social behaviours [40]: pouncing (jumping on or attacking the partner's nape, which is considered to be an initiation or solicitation of play); boxing/wrestling (both rats stand on their hind paws and struggle using the forepaws; usually boxing follows pouncing and is considered to be a positive partner's response to play); following/chasing (moving in the direction of or pursuing the partner); social grooming (sniffing or licking any body part of the test partner) and pinning (the rat holds the partner in a supine position).

Statistical analysis

The data were analysed using the "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS, version 17.0) using ANOVA. Two analyses were undertaken. The first one evaluated the effects of gender and diet, as well as the interaction between these factors (two-way ANOVA; gender (male, female) × diet (ST, CAF)); four groups were included (M_ST, M_CAF, F_ST and F_CAF). The second analysis evaluated the effects on males of the CAF diet administered for 8 weeks, and the effects of the CAF diet for 7 weeks and ST chow feeding during the final week (one-way ANOVA); three groups were included (M_ST, M_CAF and M_ABS). *Post hoc* comparisons between groups were performed by Tukey's multiple range tests after significant ANOVA. Differences between diets were analysed using the independent Student's *t*-test across groups. Body weight data were analysed by a repeated measures ANOVA, with week as a within-subject factor (among 9 measurements, including initial body weight at weaning).

Supporting Information

Table S1 Average daily intake (mean ± SEM) of standard chow, fluids, nutrients and energy over the 8 weeks of the experiment. Male (M) and female (F) rats were fed from weaning (at day 21 of life) and during 8 weeks with a ST (M_ST and F_ST groups) or a CAF (M_CAF and F_CAF groups) diet. An extra group of males were fed with the CAF diet during 7 weeks and with only the ST diet the last week of the study (M_ABS group). g = grams, d = day. (DOCX)

Acknowledgments

We thank Dr Tere Rodrigo and Lara Sedo for their support and technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RME AC JMB LC LA. Performed the experiments: JFL AC JMB DT IC RME. Analyzed the data: RME JFL AC JMB MP. Wrote the paper: RME AC JMB LC LA. Provided animal facility: MP.

References

- Janssen I, Katzmarzyk PT, Boyce WF, Vereecken C, Mulvihill C, et al. (2005) The Health Behaviour in School-Aged Children Obesity Working Group. *Obes Rev* 6: 123–132.
- Odgen CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, et al. (2006) Prevalence of Overweight and Obesity in the United States, 1999–2004. *JAMA* 295: 1549–1555.
- van Vliet M, Heymans MW, van Rosentiel IA, Brandjes DPM, Beijnen JH, et al. (2011) Cardiometabolic risk variables in overweight and obese children: a worldwide comparison. *Cardiovasc Diabetol* 10: 106–114.
- Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, et al. (2004) Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 350: 2362–2374.
- Caimari A, Oliver P, Rodenburg W, Keijer J, Palou A (2010) Slc27a2 expression in peripheral blood mononuclear cells as a molecular marker for overweight development. *Int J Obes* 34: 831–839.
- Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, et al. (2011) Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with

- liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* 19: 1109–1117.
7. Ribot J, Rodriguez AM, Rodriguez E, Palou A (2008) Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female Rats. *Obesity* 16: 723–730.
 8. Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M (2008) Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity* 16: 2081–2087.
 9. Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Di Palo C, Ciotola M, et al. (2003) Meal modulation of circulating interleukin 18 and adiponectin concentrations in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 78: 1135–1140.
 10. Sagae SC, Menezes EF, Bonfleur ML, Vanzela EC, Zacharias P, et al. (2012) Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. *Physiol Behav* 105: 1104–1111.
 11. Canetti L, Bachar E, Berry EM (2002) Food and emotion. *Behavioural Processes* 60: 157–164.
 12. Benton D (2010) The plausibility of sugar addiction and its role in obesity and eating disorders. *Clin Nutr* 29: 288–303.
 13. Sinha R, Jastreboff AM (2013) Stress as a common risk factor for obesity and addiction. *Biological Psychiatry* 73: 827–835.
 14. Bennett J, Greene G, Schwartz-Barcott D (2013) Perceptions of emotional eating behaviour. A qualitative study of college students. *Appetite* 60: 187–192.
 15. Alsió J, Roman E, Olszewski PK, Jonsson P, Fredriksson R, et al. (2009) Inverse association of high-fat diet preference and anxiety-like behavior: a putative role for urocortin 2. *Genes Brain Behav* 8: 193–202.
 16. Maniam J, Morris MJ (2010) Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology* 35: 717–728.
 17. Krolow R, Noschang CG, Arcego D, Andreazza AC, Peres W, et al. (2010) Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner. *Appetite* 55: 108–116.
 18. Buchenauer T, Behrendt P, Bode FJ, Horn R, Brabant G, et al. (2009) Diet-induced obesity alters behavior as well as serum levels of corticosterone in F344 rats. *Physiol Behav* 98: 563–569.
 19. Martire SI, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ (2013) Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity. *PLoS ONE* 8(4): e60407. doi:10.1371/journal.pone.0060407.
 20. File SE, Wardill AG (1975) Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 44: 53–59.
 21. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14: 149–167.
 22. Dawson GR, Tricklebank MD (1995) Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci* 16: 33–36.
 23. Shafat A, Murray B, Rumsey D (2009) Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite* 52: 34–38.
 24. Quesada H, del Bas JM, Pajuelo D, Diaz S, Fernandez-Larrea J, et al. (2009) Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *Int J Obes* 33: 1007–1012.
 25. Rodriguez AM, Quevedo-Coli S, Roca P, Palou A (2001) Sex-dependent dietary obesity, induction of UCPs, and leptin expression in rat adipose tissues. *Obes Res* 9: 579–588.
 26. Krolow R, Noschang C, Arcego DM, Huffell AP, Marcolin ML, et al. (2013) Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism* 62: 1268–1278.
 27. Mela V, Llorente-Berzal A, Diaz F, Argente J, Viveros MP, et al. (2012) Maternal Deprivation Exacerbates the Response to a High Fat Diet in a Sexually Dimorphic Manner. *PLoS ONE* 7(11): e48915. doi:10.1371/journal.pone.0048915.
 28. Mul JD, van Boxtel R, Bergen DJ, Brans MA, Brakkec JH, et al. (2012) Melanocortin receptor 4 deficiency affects body weight regulation, grooming behavior, and substrate preference in the rat. *Obesity* 20: 612–621.
 29. Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR, Pereira AG, Rieger DK, et al. (2007) Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sci* 81: 198–203.
 30. la Fleur SE, Vanderschuren LJ, Luijckx MC, Kloze BM, Tiesjema B, et al. (2007) A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. *Int J Obes* 31:1286–1294.
 31. Teegarden SL, Bale TL (2007) Decreases in dietary preference produce increased emotionality and risk for dietary relapse. *Biol Psychiatry* 61: 1021–1029.
 32. Pietiläinen KH, Kaprio J, Borg P, Plasqui G, Yki-Järvinen H, et al. (2008) Physical inactivity and obesity: a vicious circle. *Obesity* 16: 409–414.
 33. Fernández-Teruel A, Driscoll P, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, et al. (2002) Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 225–231.
 34. Sztainberg Y, Kuperman Y, Tsory M, Lebow M, Chen A (2010) The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Mol Psychiatry* 15: 905–917.
 35. Peña Y, Prunell M, Rotllant D, Armario A, Escorihuela RM (2009) Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 34: 1390–1404.
 36. Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463: 3–33.
 37. Zecni N, Daher C, Fromentin G, Tome D, Darcel N, et al. (2013) A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress* 16: 211–219.
 38. File SE (1980) The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Methods* 2: 219–238.
 39. File SE, Hyde JRG (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol* 62: 19–24.
 40. Trezza V, Baarendse PJ, Vanderschuren LJ (2010) The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 31: 463–469.
 41. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, et al. (2003) Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11696–11701.
 42. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF (2004) Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145: 3754–3762.
 43. Iemolo A, Blasio A, Cyr SAS, Jiang F, Rice KC, et al. (2013) CRF-CRF1 Receptor System in the Central and Basolateral Nuclei of the Amygdala Differentially Mediates Excessive Eating of Palatable Food. *Neuropsychopharmacology* 38: 2456–2466.
 44. Kirkham TC (2009) Cannabinoids and appetite: Food craving and food pleasure. *Int Rev Psychiatry* 12:163–171.
 45. Moreira FA, Kaiser N, Monory K, Lutz B (2008) Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology* 54: 141–150.
 46. Cooper SJ (2005) Palatability-dependent appetite and benzodiazepines: new directions from the pharmacology of GABA(A) receptor subtypes. *Appetite* 44: 33–150.
 47. Lukkes JL, Mokin MV, Scholl JL, Forster GL (2009) Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Horm Behav* 55: 248–256.
 48. Ros-Simó C, Valverde O (2012) Early-life social experiences in mice affect emotional behaviour and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Pharmacol Biochem Behav* 102: 434–441.
 49. Fone KC, Porkess MV (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1087–1102.
 50. Rolls BJ, Rowe EA, Turner RC (1980) Persistent obesity in rats following a period of consumption of a mixed, high energy diet. *J Physiol* 298: 415–427.
 51. South T, Westbrook F, Morris MJ (2012) Neurological and stress related effects of shifting obese rats from a palatable diet to chow and lean rats from chow to a palatable diet. *Physiol Behav* 105: 1052–1057.
 52. Ong ZY, Wanasarua AF, Lin MZP, Hiscock J, Muhlhauser BS (2013) Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system. *Appetite* 65: 189–199.
 53. Pickering C, Alsió J, Hulting AL, Schiöth HB (2009) Withdrawal from free-choice high-fat high-sugar diet induces craving only in obesity-prone animals. *Psychopharmacology* 204: 431–443.
 54. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, et al. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412–419.
 55. Archer J (1973) Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 21: 205–235.

Discussió

Els resultats d'aquest treball ¿ens permeten concloure que un estil de vida actiu, amb 30 minuts d'exercici aeròbic moderat, practicat 5 dies per setmana, redueix l'estrès en termes de resposta conductual, de sistema neuroendocrí i de sistema nerviós autònom, i millora les estratègies d'afrontament en mascles i femelles? Si es tracta de donar una resposta breu, direm no; però, en canvi, si es tracta de donar una resposta més aproximada i argumentada diríem que sí amb algunes limitacions i matisos. Quelcom similar ocorre amb la dieta CAF, perquè tot i que té efectes metabòlics perjudicials per a la salut, els resultats indiquen que té efectes psicològics *a priori* beneficiosos. A més a més, hem vist efectes diferencials en funció del sexe (Taula 3). En els següents apartats analitzarem aquestes respostes en base als resultats obtinguts per nosaltres i per altres autors, amb l'objectiu d'integrar els resultats obtinguts en els diversos treballs afins. Per això iniciem aquesta discussió amb una taula resum de tots els resultats obtinguts. També hem de dir que hi ha alguns experiments que han donat resultats complementaris que de moment no estan inclosos o que estan en esborranys de manuscrits. En la discussió en referirem a alguns d'aquests resultats que els hem inclòs en forma d'Annexos. Advertim que no hi ha cap *goldstandard* en protocols d'exercici ni cap fórmula màgica que solucioni del tot la pregunta inicial. El nostre treball aporta coneixement sobre detalls metodològics, diferències entre grups controls i efectes de l'exercici sobre l'ansietat i l'estrès que suggereixen que l'exercici podria tenir utilitat terapèutica de suport en la clínica dels trastorns d'ansietat i maneig de l'estrès, així com en la capacitat per a solucionar problemes en situacions de conflicte.

Taula 3: Resum de resultats

	Part de Resultats						Annex 1*		Annex 2*
	Part 1	Part 2A	Part 2B		Part 3		Annex 1*		Annex 2*
Setmanes de Exercici / Dieta	9 set.	36 set.	32 set.		8 set. + 1set. abs (M_ABS)	8 set.	48 Set.	36 set.	32 set.
Mostra	Mascles Joves	Mascles Adults	Mascles Adults	Femelles Adultes	Mascles Adolescents	Femelles Adolescents	Mascles Adults-Vells	Femelles Adultes	Femelles Adultes
Batecs per Minut (BPM)	↓ vs Basal. 3set. sense exercici=Basal						TM=CON<SED	TM=CON	
Variabilitat de la Freqüència Cardíaca (SDRR, CF, bw95, LH)	↑ vs Basal 3set. sense exercici=Basal						TM=CON>SED	CON>TM	
Activitat motora (OF, EPM, HB)		TM=CON>SED			CAF<Dieta ST	CAF<Dieta ST			
Exploració (centre, braços oberts i Head-Dippings) en tests d'ansietat (OF, EPM, HB)	TM=CON>SED				CAF>Dieta ST	CAF>Dieta ST ♀>♂			
Lluita en el FST	Sense diferències								
Nivells d'ACTH en resposta a estímuls estressants (HB i SB)		TM<CON=SED							Sense diferències entre grups
Adquisició de l'evitació activa en dos sentits (SB)			TM>CON=SED	TM>CON=SED. ♀>♂					
Conducta Social					CAF>Dieta ST	CAF>Dieta ST. ♀>♂			
Alteracions metabòliques (colesterol, triglicèrids, teixit adipós...)					CAF>Dieta ST Pinso. M_ABS<CAF	CAF>Dieta ST2			

En els annexos 1 i 2 s'incorporen resultats no publicats relacionats amb els que s'han inclòs en les publicacions.

Exercici en situacions d'estrès i conflicte

Els resultats resumits a la Taula 3 mostren que l'exercici moderat practicat a llarg termini redueix *per se* l'activació de l'eix HPA en resposta a l'estrès en els mascles adults. En canvi, a nivell conductual no hi ha diferències entre la conducta dels animals entrenats i la dels manipulats; la qual cosa indica que hi ha efectes diferenciats entre la conducta ansiosa i la funció neuroendocrina.

Efectes de l'exercici moderat sobre la conducta emocional

Més concretament i respecte a la conducta ansiosa, després de 9 i 36 setmanes d'entrenament tan el grup CON com el TM augmentaren les entrades als braços oberts i tancats en l'EPM; també augmentaren la distància i temps de *head dippings* al HB (Lalanza, *et al.*, 2012, en part 1) i la distància a l'OF (Lalanza, *et al.*, 2012). A mode de resum, per tant, podem concloure que els grups CON i TM redueixen moderadament l'ansietat conductual, i que no hi ha efectes específics de l'exercici en la conducta ansiosa mesurada en proves d'activitat espontània.

Pel que fa al FST, no es trobaren diferències entre grups (en Part 1). En rosegadors està demostrat l'efecte positiu de l'exercici en paràmetres relacionats amb trastorns depressius, encara que manca més recerca sobre la quantitat i intensitat del protocol d'exercici necessari. En un dels treballs pioners (Russo-Neustadt, Ha, Ramirez, Kessler, 2001) es demostrà que la combinació d'un antidepressiu IMAO (tranylcypromine) amb una setmana d'exercici voluntari augmentava la conducta de lluita en el FST; més recentment (Lapmanee, *et al.*, 2013), s'ha vist que, després de 4 setmanes d'estrès per immobilitat, les rates amb accés a la roda d'activitat (WR) redueixen el comportament depressiu al FST igual que ho fan els fàrmacs antidepressius (fluoxetina i reboxetina). Però també, s'han trobat resultats negatius. Per exemple, 3 set. d'exercici voluntari no reduïren la immobilitat en el FST en ratolins mascles en comparació al grup sedentari (Fuss, Abdallah, Vogt, Touma, Pacifici, Palme, *et al.*, 2010). Aquest resultat és consistent amb la

manca d'efecte observat en aquesta tesi, el qual es podria explicar pel fet que en els animals evaluats no s'havia induït cap estat depressiu ni havien sofert cap estímul estressant (per a una revisió: Nestler i Hyman, 2012).

L'exercici moderat redueix la resposta hormonal a l'estrès

En relació a la resposta hormonal, hem trobat en mascles que 36 set. d'exercici moderat i regular (12m/min) redueixen els nivells d'ACTH després de l'exposició a un ambient nou i poc estressant (HB) i a una situació molt més aversiva que inclou estímuls elèctrics (SB) (Lalanza, et al., 2012).

Sorprèn que les rates TM, que responen amb nivells d'ACTH més baixos davant d'ambients estressants, presentin unes glàndules suprarenals més grans. A més, en una anàlisi més curós, observem que després de la SB hi havia patrons diferents d'activació per la corticosterona (cort.) i l'ACTH en els animals TM en comparació amb els CON i SED.

El fet de trobar una glàndula suprarenal major en les rates entrenades concorda amb altres estudis on s'ha trobat que l'exercici en el *treadmill* incrementa el tamany de la glàndula suprarenal (Moraska, Deak, Spencer, Roth, Fleshner, 2000) –recordem que l'exercici és un estressor fisiològic– (Stranahan, Lee, Mattson, 2008). La diferència respecte al nostre estudi, però, recau en el protocol d'exercici. Mentre que el nostre protocol d'entrenament es pot considerar suau, atès que les rates corren a un màxim de 12m/min sense estimulació aversiva i sense inclinació, en l'estudi de Moraska et al. (2000) usen protocol d'exercici molt intens de 29.2m/min, durant 60min, amb una estimulació elèctrica de 1.6mA (a la 8ena i última setmana). En el nostre estudi les mesures neuroendocrines post-SB es van prendre immediatament després i al cap de mitja hora d'acabar la sessió d'evitació activa en dos sentits. Les rates del grup TM foren les úniques que havien disminuït els nivells de cort. als 30 min, encara que immediatament després d'acabar la sessió tenien els nivells de cort. més elevats. Això es podria explicar per les

dimensions de la glàndula suprarenal. Alguns dels estudis previs han demostrat que la mida de la glàndula suprarenal correlaciona positivament amb la resposta adrenocorticotropa induïda per l'ACTH (Márquez, Nadal, Armario, 2004). És probable que l'exercici determini una resposta més eficaç de cort. a nivells més baixos d'ACTH i que recuperin abans els nivells basals de cort.. El fet que els nivells basals fossin iguals en els tres grups (SED, CON i TM) al matí i a la tarda; demostra que l'exercici a la cinta ergomètrica *per se* no és estressant. En estudis on es compara l'activació de l'eix HPA entre 4-10 set., tampoc trobaren diferències basals respecte als grups no entrenats (Campeau, Nyhuis, Sasse, Kryskow, Herlihy, Masini, *et al.*, 2010; Chennaoui, *et al.*, 2002; Droste, *et al.*, 2006, 2007; Watanabe, *et al.*, 1991, 1992).

És probable que el factor clau per entendre tot plegat sigui el tipus d'exercici. Se sap que l'exposició crònica al mateix estímul estressant tendeix a habituar (disminuir) la resposta de l'eix HPA, mentre que les exposicions agudes a diferents estressors, encara que siguin repetides en el temps, tendeixen a sensibilitzar (augmentar) la resposta de l'eix HPA (Armario, Escorihuela, Nadal, 2008). Tenint en compte això, Sasse *et al.* (2008) mostraren que 6 set. de WR facilitaven l'habitució neuroendocrina (eix HPA) davant la presentació d'un so estressant (98db); en canvi Brown *et al.* (2007), que havien fet una habituació de 10 dies d'exercici intens a la cinta ergomètrica (30m/min), no van trobar habituació de la resposta de la cort.. Altres estudis (*treadmill* o WR), on s'utilitzen protocols d'exercici curts, han descrit augments dels nivells de cort. durant la primera o segona setmana d'exercici, els quals es normalitzen després de 4/8 setmanes d'entrenament (Campbell, Rakhshani, Fediuc, Bruni, Ridell, 2009; Fediuc, Campbell, Riddell, 2006).

McEwen (2003) proposa que l'exercici i l'activació sobre l'eix HPA podria afavorir l'alostasi, que es defineix com el procés d'aconseguir estabilitat fisiològica o homeostàtica durant els reptes amenaçadors en que es troben els organismes, preparant el sistema per quan hagi de respondre

davant amenaces reals. Seguint aquesta teoria, s'han trobat resultats coherents en rates. Tharp i Buuck (1974) van entrenar a rates usant la cinta ergomètrica durant 2, 4, 6 o 8 set. Només els dos entrenaments més llargs reduïren la resposta de la cort. posterior a la segregació de l'ACTH, demostrant l'adaptació alostàtica de la glàndula suprarenal degut a l'exercici.

Un altre argument prové de les rates LCR ("Low Capacity Runners") i les HCR ("High Capacity Runners"), obtingudes per cria selectiva en funció de la seva capacitat aeròbica (Koch i Britton, 2001). Les rates es van classificar provinent d'un *stock* heterogeni (N:NIH stock) en funció de la seva capacitat de córrer fins a l'esgotament, definida com estar més de 2 segons al final del carril rebent el shock elèctric sense ser capaç de recuperar-se. De les 192 rates inicials, es seleccionaren les 13 millors i les 13 pitjors, creuant-les entre elles (les millors amb les millors i les pitjors amb les pitjors). En la sisena generació d'aquesta cria selectiva les diferències en pes corporal i metres recorreguts ja eren significatives; les rates HCR corrien distàncies un 171% llargues que les rates LCR abans d'arribar a l'esgotament. Actualment, s'han usat aquestes rates en nombroses investigacions i han trobat diferències en el genotip en la 28ena generació (Ren, Overmyer, Qi, Treutelaar, Heckenkamp, Kalahar, *et al.*, 2013); en memòria espacial, en neurogènesi i en expressió de Sirt1, essent les rates HCR superiors a les LCR després de 12 set. al *treadmill* (Sarga, Hart, Koch, Britton, Hajas, Boldogh, *et al.*, 2013); i, en estratègies d'afrontament (LDB, EPM i en test d'estrès induït per olor a depredadors com el gat), sent les rates LCR passives i les rates HCR actives (Burghardt, Flagel, Burghardt, Britton, Gerard-Koch, Watson, *et al.*, 2011). Per altra banda, Burghardt *et al.* (2011) van avaluar el funcionament de l'eix HPA i trobaren que les rates HCR presentaven una glàndula suprarenal de mida més gran que les rates LCR i que no hi havia diferències en els nivells de cort. basal entre les dues soques. En canvi, després de ser exposades a la caixa llum-fosc les rates HCR presentaren uns nivells superiors, però no hi havia diferències després de l'exposició a l'olor a

gat. Tot plegat suggereix que la reacció hormonal no és igual a tots els tipus d'estrès.

Al nostre laboratori vam estudiar quines variables conductuals i fisiològiques predisposen als animals a córrer (Annex 3). L'anàlisi preliminar de les dades ens indica que córrer a la cinta ergomètrica està influenciat preferentment per dues variables diferents: la capacitat física ("aerobic endurance capacity") i la motivació per córrer ("motivation to run"). Curiosament, correlaciona la primera amb l'activitat als braços tancats de l'EPM, amb l'exploració al HB, i amb uns nivells més elevats d'hormones de l'eix HPA al matí. La segona correlaciona amb una major activitat exploratòria (o distractibilitat, manca d'habitució) a la *Home Cage Activity*. Així, sembla que més activitat, menys ansietat conductual i un més activitat basal de l'eix HPA estan relacionades amb una bona disposició a córrer. Per altra banda, poca habituació està relacionada amb un pobre rendiment a la cinta ergomètrica. Aquests resultats, més enllà de proporcionar un procediment per detectar animals corredors, suggereixen que la predisposició a practicar exercici podria estar influenciada per trets de personalitat i motivació.

Amb tot l'anterior, sembla que l'exercici moderat al *treadmill*, malgrat que a l'inici de l'entrenament pot incrementar els nivells basals d'ACTH i cort. i augmentar la mida i la resposta de la glàndula suprarenal, a la llarga predisposa a l'organisme a respondre més ràpid i eficientment davant d'estímuls amenaçadors.

L'exercici moderat accelera l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits (SB)

Per altra part, també vam veure que les rates TM assolien el criteri d'aprenentatge (el criteri 8) significativament abans que les CON i les SED, mentre que no trobarem diferències del grup TM respecte al CON, però sí respecte al SED, en evitacions i latències d'escapada al llarg dels assaigs. Aquests resultats es indiquen que l'exercici moderat facilita

l'afrontament actiu en una situació de conflicte com ara l'evitació activa en dos sentits.

Aquesta tasca consisteix en un aprenentatge associatiu, on la rata ha d'aprendre que després d'un estímul inicialment neutre (llum i so) apareixerà un estímul incondicionat aversiu (elèctric). Un cop la rata aprengui aquesta associació tendirà a canviar de compartiment en presència de la llum i el tò i a evitar el shock (Figura 11C). El conflicte emocional que ha de superar la rata implica que no hi ha cap compartiment segur, l'estímul aversiu pot aparèixer en qualsevol dels dos compartiments. Per una banda, el conflicte intern que pateix la rata, li provoca una resposta d'evitació passiva, el "freezing" (o resposta de congelació) per tal d'evitar tornar al compartiment on prèviament ha rebut l'estímul aversiu. En aquest cas, la rata es queda en un racó del compartiment fins que es repensa i respon activament o bé es manté petrificada i suporta tot el temps que duri l'estímul elèctric. Obviament, la resposta més adaptativa i que facilita l'aprenentatge és la resposta activa ("avoidance" o evitació), canviant de compartiment (Flint, 2004). Aquest paradigma s'ha fet servir per fer una cria selectiva de rates que tenen respostes passives i actives, són les Romanes de baixa (Roman Low Avoidance, RLA) i d'alta (Roman High Avoidance, RHA) evitació, respectivament (Sabariego, Gómez, Morón, Torres, Fernández-Teruel, Tobeña, *et al.*, 2011). Aquestes rates van ser seleccionades des de principis dels anys 70 en base a la conducta d'evitació. Les rates RHA destaquen per ser menys ansioses, menys emotives en situacions estressants i més percaçadores de sensacions, mentre que les rates RLA mostren el perfil oposat (Escorihuela, Fernández-Teruel, Gil, Aguilar, Tobeña, Driscoll, 1999). Actualment són un bon model per a estudiar la conducta i els mecanismes de l'ansietat i la por (Díaz-Moran, Palència, Mont-Cardona, Cañete, Blázquez, Martínez-Membrives, *et al.*, 2012) i, molt recentment, també s'han proposat com un bon model animal per a l'estudi de l'esquizofrènia (Del Río, Oliveras, Cañete, Blázquez, Tobeña, Fernández-Teruel, 2014).

Per tant, en funció del número de sessions podem avaluar principalment les estratègies d'afrontament i ansietat, per exemple usant una única sessió de 50 assaigs (Díaz-Morán, *et al.*, 2012); o podem afegir la part d'aprenentatge associatiu si es duen a terme diverses sessions, per exemple usant 9 sessions d'entre 20 i 50 assaigs aproximadament (Escorihuela, *et al.*, 1995). Aquests mateixos autors establiren un criteri d'aprenentatge per a determinar si la rata ha associat correctament els estímuls i la resposta per a evitar-los. S'anomena criteri 10 i consisteix en realitzar 10 evitacions seguides en una mateixa sessió. Nosaltres, degut al número d'assaigs per sessió, l'hem adaptat a 8.

Històricament, Dunlap i col·laboradors (1931) van estudiar els canvis de compartiment en rates entrenades per a obtenir menjar en una tasca sensorial discriminativa. A la dècada dels 50s, Mowrer i Millner van començar a treballar amb un aparell semblant a les actuals gàbies *Shuttle Box* (SB) (Miller, 1948) i posteriorment, altres investigadors la usaren per avaluar l'adquisició de l'evitació activa en gossos (Black i Morse 1961, Maier i Seligman 1976). La SB s'ha utilitzat com a model per a mesurar ansietat (validat farmacològicament per Fernández-Teruel *et al.*, 1991), i s'ha vist que les benzodiazepines augmenten el nombre d'evitacions en una única sessió de 40 assaigs, les estratègies d'afrontament i el conflicte (Maier, 1984), i també augmentaren l'aprenentatge (Stark, Bischof, Wagner, Scheich, 2001). Així mateix s'ha trobat una correlació positiva entre els nivells de dopamina al còrtex prefrontal (relacionat amb la working memory) i el nombre d'evitacions (Stark, *et al.*, 2001), i una correlació negativa entre els nivells de corticosterona i el nombre d'evitacions (Boix, Fernández-Teruel, Escorihuela, Tobeña, 1992) .

La *Shuttle Box* també s'ha utilitzat per induir indefensió apresada (Maier, 1984). Greenwood *et al.* (2013) van aplicar 100 shocks elèctrics incontrolables a les rates i posteriorment van avaluar els efectes de 6 setmanes d'exercici de diferents tipus a la SB. Es va veure que l'exercici forçat o l'exercici voluntari a la roda d'activitat reduïen el *freezing*,

mentre que l'exercici forçat a la cinta ergomètrica no ho feia. En un altre estudi es va trobar un resultat similar de disminució de la conducta de petrificació amb l'exercici voluntari a la roda d'activitat (6-12 set.) en comparació amb al grup sedentari (Greenwood, Foley, Day, Campisi, Hammack, Campeau, *et al.*, 2003; Dishman, Renner, Youngstedt, Reigle, Bunnell, Buerke, *et al.*, 1997). Sembla que una hiperactivació dels nivells de 5-HT als nuclis dorsals de Rafe estaria implicada en aquesta resposta passiva de petrificació i que l'exercici restringiria l'activació de les neurones serotoninèrgiques dels nuclis dorsals de Rafe (Greenwood i Fleshner, 2008), afavorint la resposta activa.

En el nostre estudi (Part 2B) les rates entrenades assoliren el criteri 8 d'aprenentatge abans que les CON i les SED, i també assoliren el nivell asimptòtic d'aprenentatge (a partir de la sessió quarta) en evitacions i latències d'escapada abans que els altres grups. En aquest punt cal tenir en compte el protocol d'intensitat i durada de l'entrenament a la cinta ergomètrica en relació als efectes de l'exercici sobre funcions cognitives. S'ha vist que intensitats de 18-30m/min milloren l'aprenentatge espacial i l'orientació al MWM i disminueixen els errors en el *8-Arm Maze* en comparació al grup control (Ang, Dawe, Wong, Moochhala, Ng, 2006; Marton, Koltai, Nyakas, Bakonyi, Zenteno-Savin, Kumagai, *et al.*, 2010; Pietrelli, López-Costa, Goñi, López, Brusco, Basso, 2011). Però, 25m/min empitjorava l'aprenentatge (distància) en el MWM en comparació a un exercici lleugerament més suau que l'anterior (20-22m/min) (Blustein, McLaughlin, Hoffman, 2006). Amb exercici d'intensitat moderada-baixa (8 a 16.6m/min) també s'han trobat efectes positius en tasques d'orientació espacial (Cetinkaya, Sisman, Kiray, Camsari, Gencoglu, Baykara, *et al.*, 2013; Uysal, Tugyan, Kayatekin, Acikgoz, Bagriyanik, Gonenc, *et al.*, 2005) i efectes positius de reconeixement d'objectes, tan en rates sanes (O'Callaghan, Ohle, Kelly, 2007) com en un model d'infart cerebral (Shimada, Hamakawa, Ishida, Tamakoshi, Nakashima, Ishida, 2013). Igualment, també hi ha un gran nombre d'estudis que demostren l'eficàcia de l'exercici voluntari

en funcions cognitives i en sistemes de memòria (Alomari, Khabour, Azoubi, Alzubi, 2013; Anderson, Rapp, Baek, McCloskey, Coburn-Litvak, Robinson, 2000; Cetinkaya, *et al.*, 2013; Hopkins i Bucci, 2010), i en els mecanismes neurobiològics implicats (per exemple: Dishman, Berthoud, Booth, Cotman, Edgerton, Fleshner, *et al.*, 2006; van Praag, 2009; Voss, *et al.*, 2013).

Sembla que l'exercici aeròbic pot modificar les bases neurals de la cognició, particularment la memòria; més en concret, sembla que té efectes a l'hipocamp, l'àrea cerebral relacionada amb la memòria a llarg termini, i sobre mecanismes subjacents a l'aprenentatge i de plasticitat, com ara la neurogènesi (naixement de noves neurones). Kemperman (2008) proposà que l'increment de la neurogènesi deguda a l'exercici podria respondre a la necessitat de moure's com indicador de nous reptes cognitius. La neurogènesi *per se* podria servir al cervell de reserva neurogènica (*neurogenic reserve*) per a poder afrontar amb èxit nous reptes cognitius complexos, a curt i a llarg termini. De tota manera, la neurogènesi no explica tots els efectes de l'exercici a nivell cognitiu (Leuner, Gould, Shors, 2006; Scharfman i Hen, 2007).

L'entrenament a la cinta ergomètrica augmenta la neurogènesi hipocampal (per a una revisió Hötting i Rödier, 2013). Ding i col·laboradors (2006) entrenaren al *treadmill* (15m/min) durant 3 setmanes a rates femelles envellides (22 mesos d'edat). Resultà que l'exercici augmenta la neurogènesi al còrtex i a l'estriat, en comparació amb les rates control no-manipulades.

Un dels principals mecanismes que pot explicar aquest augment de neurogènesi hipocampal degut a l'exercici és l'increment de factors neurotròfics implicats en el desenvolupament i la supervivència de les neurones (Voss, *et al.*, 2013). Un dels més estudiats en relació als efectes de l'exercici és el *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) (Cotman i Berchtold, 2002; Neeper, Gomez-Pinilla, Choi, 1995). En rates s'ha vist que l'exercici voluntari incrementà l'expressió gènica (mRNA) de BDNF (Vaynman, Ying, Gomez-Pinilla, 2004) i la cinta

ergomètrica augmentà els nivells de BDNF a l'hipocamp (Soya, Nakamura, Deocaris, Kimpara, Iimura, Fujikawa, *et al.*, 2007). En un model de ratolins d'envelliment prematur, el SAMP8 (Takeda, 2009), l'exercici a la roda d'activitat durant 24 setmanes (3 dies per setmana) augmentà l'expressió gènica del BDNF i modificà l'expressió de 34 gens relacionats amb l'envelliment (Alvarez-López, Castro-Freire, Cosín-Tomás, Sanchez-Roige, Lanza, del Valle, *et al.*, 2013). I consistentment, 8 setmanes d'exercici voluntari incrementaren l'expressió gènica del BDNF i d'altres gens relacionats amb el deteriorament cognitiu com la Sirt1 i el Hdac6 en ratolins femelles SAMP8 (Cosín-Tomás, Alvarez-López, Sanchez-Roige, Lanza, Bayod, Sanfeliu, *et al.*, 2014).

Un mecanisme que també s'ha associat als beneficis de l'exercici aeròbic sobre la neurocognició és l'angiogènesi, que es defineix com la creació de nous vasos sanguinis (Prior, Yang, Terjung, 2004), la qual cosa afavoreix l'aportació d'oxigen, glucosa i factors neurotròfics a les neurones que hi ha al cervell (Kerr, Steuer, Pochtarev, Swain, 2010). S'ha demostrat que l'exercici voluntari a la roda d'activitat incrementà l'angiogènesi a l'escorça motora en rates (Kleim, Cooper, VandenBerg, 2002; Swain, Harris, Wiener, Dutka, Morris, Theien, *et al.*, 2003).

Al nostre laboratori vam veure que 36 set. d'exercici regular i moderat a la cinta ergomètrica revertien els dèficits de IGF-1 (un factor neurotròfic) plasmàtics associats a l'edat, i activaren la via de la Sirt1 (Bayod, *et al.*, 2011); a més a més d'incrementar els nivells de VEGF i l'expressió de Sirt1 en teixits perifèrics (Bayod, *et al.*, 2012), activar el procés d'autofàgia relacionat amb l'eliminació selectiva de proteïnes disfuncionals al còrtex cerebral (Bayod, *et al.*, en premsa), i activar la via canònica de la Wnt a l'hipocamp (Bayod, *et al.*, 2014) recentment implicada en processos de neurogènesi, plasticitat sinàptica i neuroprotecció en el SNC (Toledo, Colombres, Inestrosa, 2008).

L'exercici afecta l'índex d'estrès relacionat amb la variabilitat cardíaca

En l'estudi de la Part 1 l'exercici físic durant 9 setmanes reduí la freqüència cardíaca (en batecs per minut, BPM) i augmentà alguns paràmetres de variabilitat de la freqüència cardíaca (HRV) com ara la CF i la bw95 en comparació a la línia base. A més a més, després de 3 set. d'haver aturat les sessions d'entrenament, la freqüència cardíaca en BPM, i la variabilitat de la freqüència cardíaca mesurada en CF i bw95 augmentaren significativament. En canvi, en un altre experiment on vam utilitzar períodes d'entrenament a la cinta ergomètrica més llargs no vam observar canvis (Annex 1), la qual cosa ens diu que el conjunt de resultats obtinguts no és del tot consistent. Una possible explicació és que vam utilitzar un número d'animals petit si és té en compte la gran variabilitat entre subjectes que observem en els paràmetres centrals de l'HRV. En altres estudis d'aquests tipus on s'utilitzen 10-12 animals per grup s'observen augments de la variabilitat cardíaca en paràmetres centrals com l'AVRR, SDRR, la RMSSD o el LH (per exemple: Barbier, Reland, Ville, Rannou-Bekono, Wong, Carré, 2006; DiCarlo, *et al.*, 2002; Trombini, *et al.*, 2012).

Una altra explicació fa referència a les mesures que es deriven de les anàlisis d'HRV, on principalment s'hi fan dos tipus de càlculs. Un, els paràmetres de domini temporal que s'obtenen directament de l'interval RR i són la SDRR, la RMSSD, entre d'altres. I l'altre, el domini aplicant càlculs matemàtics des de la freqüència o anàlisi espectral, fa referència a com la variància dels intervals RR es distribueix en funció d'una determinada freqüència, normalment calculada amb una Transformació de Fourier. Així, s'obtenen valors de baixa (LF) i d'alta (HF) freqüència (per a una revisió: Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996). Nosaltres també hem analitzat altres paràmetres menys habituals com la CF i la bw95. La CF fa referència a l'interval de freqüències que componen la meitat de l'espectre i la bw95 al rang de freqüències que conté el 95% del total de l'espectre (García-González, *et al.*, 2009). En

altres paraules, a menor CF i bw95, major diferència de variàncies (menor igualtat dels intervals RR) i, per tant, major HRV. Precisament, alguns autors defensen la validesa d'aquestes mesures alternatives en base a que la LF no és un marcador directe de l'activitat del SNS. Fins ara, semblava clar que la LF mesurava l'activació del SNS i la HF indicava l'activitat del SNP (per a una revisió: Montano, *et al.*, 2009). El grup de Reyes del Paso i col·laboradors proposen un model (Reyes del Paso, Langewitz, Mulder, Van Roon, Duschek, 2013) segons el qual l'antic "low", equivaldria al "very low" actual (per rang d'Hz). A més a més, hi ha evidència d'una manca de correlació entre les catecolamines (que augmenten amb l'activació del SNS, fent-nos estar alerta) i el paràmetre de LF (indicador de l'activació del SNS), i sembla que la divisió entre l'activació del sistema nerviós simpàtic i parasimpàtic (els dos components dels sistema nerviós autònom) no és simètrica, sinó recíproca i coactivada. En altres paraules, que el sistema simpàtic o el sistema parasimpàtic no estan activats exclusivament, sinó que més aviat estarien activats tots dos alhora en diferent proporció.

La tercera explicació podria ser que el protocol d'exercici moderat i a llarg termini no fos l'adequat que generés canvis robustos en l'HRV, perquè la dosi d'exercici no fos prou alta (per exemple de 60 min en comptes de 30). Calen experiments addicionals amb grups d'animals que facin exercici de més durada per a comprovar-ho. Altres laboratoris també han trobat resultats similars als nostres, per exemple En rates mascles entrenades durant 12 setmanes al *treadmill* no va mostrar increments significatius de la variabilitat en l'interval RR (Barbier, *et al.*, 2006).

L'exercici moderat no redueix el pes

En cap dels experiments hem trobat una disminució del pes deguda a l'exercici, i això és consistent amb altres autors (Albeck, *et al.*, 2006). Se sap que per reduir pes i greix de manera significativa cal fer exercici d'alta intensitat (Strasser, 2013; Thompson, Karpe, Lafontan, Frayn, 2012). Per exemple, rates que van fer exercici a 20m/min reduïren el

pes en comparació a animals sedentaris (Hansalik, *et al.*, 2006). En un estudi fet amb humans es va trobar que només les dones entrenades a alta intensitat reduïren el greix abdominal després de 14 setmanes d'entrenament, (Lee, Park, Kim, Choi, Kim, 2012). Per altra banda, hi ha dades en humans que mostren disminucions de pes significatives quan se segueixen programes d'exercici moderat a dosis de 6h/setmana; de fet, aquesta és la dosi mínima que es recomana per a perdre pes en pacients obesos que estan fent dieta (Wadden, Webb, Moran, Bailer, 2012).

El grup control

La manipulació que requereix l'entrenament en la cinta ergomètrica va augmentar l'activitat conductual del grup CON en comparació al grup SED en quant a les entrades totals i als braços tancats de l'EPM, la distància recorreguda en el primer minut de l'OF i en els cinc minuts del HB (Lalanza, *et al.*, 2012). També va reduir l'exploració al HB, en incrementar el temps de *head dipping* (Part 1). En tots dos casos, el grup control va igualar els resultats del grup TM. L'efecte més sorprenent de la manipulació al *treadmill* fou que 36 setmanes d'exercici (i la seva corresponent manipulació) augmentaren la SDRR en femelles (Annex 1). El grup CON i TM reduïren significativament els BPM en 48 setmanes d'entrenament i augmentaren els valors dels paràmetres que indiquen variabilitat cardíaca (Annex 1). A més a més, durant les següents 4 setmanes, el grup SED va igualar als grups CON i TM, les quals van començar a rebre una major manipulació degut al control durant el procés post-operatori i al fet de que s'havien de manipular els animals més sovint per activar el transmissor implantat.

Aquests resultats, juntament amb els d'altres estudis que ja hem presentats en apartat anteriors (Burghardt, *et al.*, 2004; O'Callaghan, *et al.*, 2009), i que descobriren efectes semblants de l'exercici i la manipulació en variables cognitives i d'ansietat, mostraren la importància de controlar la manipulació en el protocol d'exercici a la cinta ergomètrica. Un darrer exemple seria l'estudi de Hansalik *et al.*

(2006), que van fer servir un grup control d'enriquiment social (en grups de 4 animals en comptes d'aïllats). L'exercici intens a la cinta ergomètrica (20m/min) no va tenir cap efecte respecte al grup d'animals aïllats i al grup d'animals enriquits, ni en latència d'escapada ni en distància recorreguda al MWM.

Dieta de cafeteria

Els resultats indiquen que la dieta CAF administrada en rates mascles i femelles adolescents incrementa el consum de nutrients, el pes corporal, el teixit adipós, i indueix síndrome metabòlica.

A nivell comportamental, en general, els animals alimentats amb dieta CAF van disminuir l'activitat en tots els tests conductuals: i) menys crossings al HB, ii) menys distància als braços tancats de l'EPM, iii) menys distància a l'OF. Els mascles i les femelles alimentades amb dieta CAF: van mostrar menys ansietat i més exploració, en fer un major nombre de *head dippings* al HB, més temps als braços oberts de l'EPM (especialment les femelles) i més conductes de joc social (poucing, grooming i following, en aquest darrere, com els mascles); i més exploració a la zona central de l'OF (especialment els mascles).

També cal fer especial menció dels efectes observats en els mascles abstinents. Un setmana sense dieta CAF va permetre recuperar els nivells normals de triglicèrids, insulina, glucosa i pes hepàtic, de manera que aquest grup no es diferenciava del grup d'animals alimentats amb dieta estàndard en aquests paràmetres. Aquests resultats concorden amb els de l'estudi de South *et al.* (2012), on 9 dies d'abstinència després de 16 setmanes de dieta CAF reduïren el pes de teixit adipós, i els nivells de leptina i glucosa; i amb els d'un altre estudi on 8 setmanes d'abstinència després de 26 setmanes de dieta CAF es reduí el nivell d'insulina (Goularte, *et al.*, 2012). En properes investigacions seria rellevant estudiar els efectes de l'abstinència en femelles, perquè en un altre estudi s'ha comprovat que mascles i

femelles reaccionen diferent a l'abstinència, sent més efectiva en femelles (Ong, Wanasuria, Lin, Hiscock, Muhlhauser, 2013).

Crida l'atenció que les rates amb dieta CAF siguin menys actives que les rates alimentades amb dieta estàndard. Aquest resultat és similar a l'obtingut per altres investigadors (Mul, van Boxtel, Bergen, Brans, Brakkee, Toonen, *et al.*, 2012) amb un nou model de rata del receptor de la melanocortina (Mc4r), que guanya més pes que les *wild type*, i també redueix la distància recorreguda a la *Home Cage Activity*. En un model de dieta rica en llard i sucre no es van trobar efectes a la caixa operant ni a l'OF (distància) (la Fleur, Vanderschuren, Luijendijk, Kloeze, Tiesjema, Adan, 2007; Teegarden i Bale, 2007). Finalment, en humans s'han trobat que els adolescents inactius tenen major risc de patir obesitat (Pietiläinen, Kaprio, Borg, Plasqui, Yki-Järvinen, Kujala, *et al.*, 2008).

Molt breument, volem comentar els efectes addictius que té la dieta. Volkow i Wise (2005) van descriure que les vies neurals que regulen la ingesta de dietes saboroses i riques en greixos i sucres se solapen amb les vies subjacents a les addiccions a les drogues, més concretament el sistema opioide i la via mesolímbica dopaminèrgica. Per exemple, Johnson i Kenny (2010) trobaren que les rates obeses alimentades amb dieta CAF augmentaven el consum compulsiu i el pes, a més a més de disminuir el nombre de receptors D2 de dopamina, la qual cosa provoca un efecte de tolerància i la necessitat d'augmentar cada cop més el consum de CAF per obtenir el mateix nivell de plaer; un patró similar al que s'observa durant l'addició a les drogues. En canvi, les rates alimentades amb dieta CAF que no s'engreixaven no menjaven compulsivament, ni augmentaven de pes, ni disminuïen els nivells de dopamina a l'estriat. Molt recentment, una investigació indica que una exposició crònica de 15 setmanes a la dieta CAF altera l'expressió dels receptors relacionats amb el sistema del reforçament cerebral (m-opioid i CB1) i disminueix la resposta a altres reforços (Martire, Maniam, South, Holmes, Westbrook, Morris, 2014).

Hem demostrat que la dieta CAF és capaç de reduir l'ansietat mesurada en tests conductuals d'activitat espontània com ara l'EPM, la LDB i el test de preferència a l'aigua ensucrada (Maniam i Morris, 2010; Zeeni, Daher, Fromentin, Tome, Darcel, Chaumontet, 2013). Possiblement el resultat més novedós de l'estudi de Lanza *et al.* (2014) hagi estat l'augment de joc al test d'interacció social (*Social Test*, ST), el qual fou validat farmacològicament com a mesura d'ansietat (File, 1980; File i Hyde, 1978) i de sociabilitat en rates. Per exemple, Tonissaar *et al.* (2008) van classificar a les rates en poc i molt sociables, administrant 4 sessions del ST i van trobar que les més sociables foren també les més vulnerables a l'anhèdonia (incapacitat de sentir plaer al test de preferència a l'aigua ensucrada). Els nostres resultats indiquen que la dieta CAF augmenta el *pouncing*, relacionat amb la sol·licitud de joc social (Trezza, *et al.*, 2010), el que suggereix que la dieta CAF augmenta la sociabilitat a més a més de disminuir l'ansietat.

Diferències de sexe

Pel que fa als efectes de l'exercici hem trobat diferències de sexe en nivells d'ansietat i resposta d'estrès, sent els mascles els més beneficiats, mentre que en les femelles la magnitud de l'efecte és en general més petita i en alguns paràmetres no hi vàrem observar canvis. Primerament a nivell neuroendocrí, no hi va haver cap diferència quan comparem els grups TM, CON i SED de femelles que havien seguit el mateix protocol d'exercici que els mascles (Annex 2). En segon lloc, 36 setmanes d'exercici a la cinta ergomètrica tampoc tingueren efectes sobre els paràmetres d'HRV de les rates femelles (Annex 1); únicament observàrem una diferència significativa lleu a la setmana 28^{na} en el paràmetre SDRR. Contràriament i pel que fa a les estratègies d'afrontament, globalment les femelles foren més ràpides en entendre i resoldre el problema de l'adquisició de l'evitació activa en dos sentits i les entrenades assoliren el criteri de 8 respostes correctes seguides a la primera sessió. Per contra, els mascles entrenats assoliren el criteri a la segona. A més, totes les femelles van aconseguir arribar a la cinquena sessió amb un 90% d'evitacions, mentre que els mascles dels grups

CON i SED es quedaren en un nivell d'execució de 70-72%, i els del grup TM en un 85% d'evitacions. Aquestes diferències de sexe també concorden amb els resultats d'altres investigadors, que troben que les femelles aprenen més ràpid en la tasca d'evitació activa (per a una revisió: Dalla i Shors, 2009).

En una revisió recent sobre ansietat i diferències de sexe, s'indica que les femelles mostren menys ansietat que els mascles en proves d'activitat espontània com ara *l'Open Field*, la *Light Dark Box* o el *Elevated Plus Maze* que també hem utilitzat en aquest treball (Donner i Lowry, 2013). Una aportació més novedosa de l'estudi de Lalanza i cols (2014) és que les femelles adultes joves mostraren globalment més conducta de joc social que els mascles, amb o sense dieta CAF. La qual cosa concorda amb els humans pel fet que són les dones i no els homes, qui presenta més habilitats socials (Ingalhalikar, Smith, Parker, Satterthwaite, Elliott, Ruparel, *et al.*, 2013). En rates, hi ha poca recerca feta amb l'objectiu d'estudiar les diferències de sexe en joc social. Normalment, són els mascles qui tendeix a iniciar i sol·licitar el joc (Auger i Olesen, 2009). En el nostre estudi, les femelles fan major conducta social, sobretot de *grooming* social (o *allogrooming*), molt important no només per a la higiene, sinó també per a enfortir els vincles socials i reduir l'ansietat grupal (Machanda, Gilby, Wrangham, 2014); i que cal distingir de l'*auto-grooming* que és una conducta relacionada amb situacions d'estrès i aversives (Estanislau, Díaz-Morán, Cañete, Blázquez, Tobeña, Fernández-Teruel, 2013). Fins i tot els mascles alimentats amb dieta CAF no feien la mateixa quantitat de *grooming* social que feien les femelles alimentades amb dieta estàndard.

I és que, des de les rates fins als bonobos, el *grooming* social és un element clau en l'estructura social de molts mamífers (Dunbar, 2010). I els humans, tenim *grooming* social? Sembla que sí. No ens anem traient els polls els uns als altres, però per alguns autors la mateixa funció social que el *grooming* dels altres mamífers la podríem tenir en

les abraçades, carícies, carentonyes en general, fins i tot sexe; en definitiva, el contacte físic entre dues o més persones que comporti benestar, elements d'empatia, proximitat, etc... De fet, s'ha trobat que tenir una vida sexual satisfactòria, entesa com a relacions coitals estables, ajuda a prevenir trastorns depressius, redueix l'obesitat i millora l'HRV (per a una revisió: Brody, 2010).

Pel que fa a les diferències de gènere en respostes de l'eix HPA, sembla que, en general, les rates femella mostren nivells basals ACTH i corticosterona més alts que els mascles (Fernández-Guasti, Fiedler, Herrera, Handa, 2012). Podria ser que les femelles necessiten un protocol d'exercici de major intensitat per a obtenir efectes beneficiosos. Una de les hipòtesis més acceptades per a explicar aquestes diferències neuroendocrines són els estrògens, que interaccionarien amb l'eix HPA. Per exemple, Figueredo *et al.* (2002) trobaren una cort. basal elevada, però només quan les rates estaven en fase proestre (hi ha un pic d'estrògens); i Barha i col·laboradores (2011) trobaren una hiperactivació de l'eix HPA en femelles, comparades amb mascles, després d'estrès per immobilització. S'ha proposat que els canvis en l'eix HPA puguin ser deguts a la relació amb els estrògens via PVN, la direcció (positiva o negativa) de la qual encara no està clara (Solomon i Herman, 2009) i depèn de la fase del cicle estral (ter Horst, de Kloet, Schächinger, Oitzl, *et al.*, 2012). Amb la presentació d'aquests estudis no volem dir que l'explicació de les diferències de sexe acabi aquí, sinó que, coneixent els possibles mecanismes diferenciadors, s'hauria de dur a terme molta més recerca en femelles controlant o tenint en compte aquests resultats previs. De fet, en un estudi recent es va descobrir que, malgrat que les dones tenen aproximadament el doble de risc de patir psicopatologies relacionades amb trastorns de l'estat d'ànim (Fernández-Guasti, *et al.*, 2012), en l'àmbit de les neurociències per a cada 5,5 estudis fets només amb rates mascle n'hi ha 1 fet només amb femelles (Beery i Zucker, 2011)

En estudis amb humans s'ha vist que les dones físicament actives i les dones sedentàries tenen un major rang de batecs per minut que els homes (en comparació al seu respectiu grup sedentari o actiu del sexe oposat, Genovesi, Zaccaria, Rossi, Valsecchi, Stella, Stramba-Badiale, 2007). Altres estudis també troben una major variabilitat de la freqüència cardíaca (HRV) en homes que en dones (Faust, Yi, Hua, 2013; Salem, Hussain, Majeed, Khan, 2012)

Of Mice and Men: Què podem aplicar de la nostra recerca als humans? De què ens serveix?

L'objectiu últim de la recerca bàsica en animals hauria de ser poder transferir els coneixements obtinguts a la investigació clínica o aplicada i, així, contribuir a la millora de la vida de les persones (Voss, *et al*, 2013). En aquest punt, resumirem les principals troballes d'aquesta tesi en relació amb aspectes més aplicats que provenen d'altres estudis amb persones (per a una síntesi, veure la Figura 16).

Per exemple, igual que hem observat que l'exercici disminueix l'ansietat i les respostes d'estrès en les rates (Part 2 d'aquesta tesi), hi ha estudis en humans que han demostrat que l'exercici redueix l'ansietat i l'estrès (Asmundson, Fetzner, DeBoer, Powers, Otto, Smith, 2013; Conn, 2010). No obstant hi ha controvèrsia. En una recent metanàlisi (Bartley, Hay, Bloch, 2013) no s'hi van trobar efectes significatius de l'exercici aeròbic sobre l'ansietat diagnosticada seguint el DSM, a diferència dels efectes ansiolítics que es conclúen d'un estudi anterior que incloïa simptomatologia general d'ansietat (Conn, 2010).

L'exercici, a més, s'ha proposat com a eina terapèutica per combatre trastorns de l'estat d'ànim com la depressió (aan het Rot, Collins, Fitterling, 2009; Silveira, Moraes, Oliveira, Coutinho, Laks, Deslandes, 2013). Per exemple, Mota-Pereira i col·laboradors (2011) van administrar a pacients depressius resistents al tractament farmacològic una combinació del tractament habitual amb 12 set. d'exercici aeròbic de baixa intensitat (caminar entre 30min i 1h un mínim 5 dies per

setmana). Els pacients tractats amb exercici milloraren la simptomatologia depressiva (mesurada amb el qüestionari BDI) i, fins i tot, l'exercici va contribuir a la remissió dels símptomes en un 26% dels pacients. Malgrat aquests bons resultats, també hi ha evidència en contra (Underwood, Lamb, Eldridge, Sheenan, Slowter, Spencer, *et al.*, 2013), la qual cosa fa més necessari seguir estudiant les bases psicobiològiques que relacionen exercici i depressió.

A nivell neuroendocrí, també s'han descrit beneficis ansiolítics de l'exercici en humans. Per exemple, esportistes d'èlit presentaren menys nivells de cortisol en resposta a un estrès psicosocial en comparació amb esportistes amateurs i persones sedentàries (Rimmele, Seiler, Marti, Wirtz, Ehlert, Heinrichs, 2009); i persones amb una elevat nivell de fitness (corrien més de 75km per setmana), mostraven menys activació de l'eix HPA durant un exercici intens, malgrat presentar nivells de cortisol basals més alts que les persones poc entrenades (Luger, Deuster, Kyle, Gallucci, Montgomery, Gold, *et al.*, 1987).

Respecte als paràmetres cardiovasculars, hi ha força estudis que descriuen que l'exercici aeròbic augmenta l'HRV en població sana (per a una revisió: Sandercock, Bromley, Brodie, 2005), i en persones que han patit infart de miocardi (per a una revisió: Oliveira, Ribeiro, Alves, Teixeira, Miranda, Oliveira, 2013) i hipertensió (per a una revisió: Thayer, *et al.*, 2010). Però també hi ha alguns estudis amb resultats discordants. Per exemple, Rimoldi i col·laboradors (1992) trobaren en humans i gossos que un exercici moderat a la cinta ergomètrica incrementava el paràmetre LF. En un estudi correlacional amb persones joves es va trobar que els joves físicament actius tenien el paràmetre HF més alt que els joves sedentaris, però també el paràmetre LF era superior (Reyes del Paso, *et al.*, 2013).

Limitacions del treball i propostes per al futur

Una de les limitacions de l'estudi dels efectes de la dieta de cafeteria és el fet de mantenir als animals aïllats, degut als efectes negatius que pot

tenir aquesta condició en animals socials (Leasure i Decker, 2009). En aquell estudi els animals es van individualitzar per quantificar els consums de cadascun dels aliments individualment. Podria haver passat que l'aïllament *per se* modifiqués els consums, però en un experiment posterior fet al nostre laboratori on els animals han estat establats per parelles, hem observat que els consums dels diversos aliments són molt semblants als dels animals establats individualment.

Una altra limitació de l'estudi de la dieta CAF és no haver estudiat el teixit adipós marró i el beig. Si bé el teixit adipós blanc es relaciona amb l'homeòstasis energètica, el teixit adipós marró i beige estan relacionats amb la termoregulació (procès pel qual es cremen calories i es redueix el pes). Una nova hormona clau en els efectes de l'exercici és la irisina (Boström, Wu, Jedrychowski, Korde, Ye, Lo, *et al.*, 2012), també relacionada amb la termogènesi (Villarroya, 2012). Ja s'han fet els primers estudis mostrant que l'exercici és capaç d'incrementar els nivells d'irisina (per a una revisió, Cigarroa i Zapata, 2013). Els següents passos serien: establir quin protocol d'exercici pot activar les funcions de la irisina, o bé estudiar si l'exercici, a través de la irisina, pot revertir l'increment de teixit adipós blanc induït per la dieta.

Resultats preliminars d'un estudi fet recentment al nostre laboratori (Cigarroa, *et al.*, dades no publicades) suggereixen que l'exercici al *treadmill* podria revertir les deficiències metabòliques que provoca la dieta CAF, com ara l'augment de triglicèrids o de teixit adipós blanc retroperitoneal. A nivell conductual, es veuen increments de la conducta exploratòria. Aquest resultat seria consistent amb d'altres on el WR i la dieta CAF van contrarestar (combinats o separats) els efectes ansiogènics i neuroendocrins de la separació materna infantil (Maniam i Morris, 2010). A més a més, nedar durant 6 set. igualava els nivells s'insulina en comparació a les rates control després de 26 set. alimentades amb dieta CAF (Goularte, *et al.*, 2012). Com es pot veure, però, encara no s'ha estudiat la intensitat concreta d'exercici necessària per induir aquests beneficis.

En quant a l'exercici i els efectes a nivell cognitiu i neuropsicològic en humans, l'exercici aeròbic (60min, a un 70% del ritme cardíac màxim, durant 3 mesos) incrementà els nivells de BDNF mesurats en el torrent sanguini en humans (Seifert, Brassard, Wissenberg, Rasmussen, Nordby, Stallknecht, *et al.*, 2010), i sembla que el BDNF podria ser un mecanisme pel qual l'exercici podria prevenir i disminuir els síndromes depressius (Martinowich, Manji, Lu, 2007). S'ha trobat que pacients diagnosticats amb depressió major tenen menys BDNF en plasma que subjectes sans (Lee i Kim, 2009). Ha estat demostrat que l'exercici aeròbic (12 set., 4 dies/set., 1h/d) augmenta l'angiogènesi en humans, inferida mitjançant ressonància magnètica, que detectava la quantitat de volum de sang al gir dentat (Pereira, Huddleston, Brickman, Sosunov, Hen, McHann, *et al.*, 2006). S'ha comprovat que l'edat redueix el volum hipocampal i els nivells de BDNF a l'hipocamp, i que l'exercici compensa aquestes pèrdues en persones grans (Erickson, Miller, Roecklein, 2012). De manera que la capacitat aeròbica correlaciona positivament amb el volum hipocampal i amb els nivells de BDNF; la qual cosa explicaria els beneficis de l'exercici a nivell cognitiu i emocional. Per exemple, en humans vells l'exercici incrementà el volum cerebral (substància grisa i blanca, sobretot de les zones frontals) (Colcombe, Erickson, Scaf, Kim, Prakash, McAuley, *et al.*, 2006). I també s'han descrit correlacions positives entre rendiment acadèmic i rendiment físic en nens (Hillman, Erickson, Kramer, 2008). A mode de resum, en la Figura 16 es presenten els principals beneficis de l'exercici que s'han descrit en les persones.

Per últim i a mode integrador, en humans s'han proposat models d'intervenció que combinin activitat física i enriquiment cognitiu. Kraft (2012) va resumir els resultats que s'han obtingut en els últims anys aplicant intervencions multimodals (activitat física i reptes cognitius) en població envellida. Va concloure que malgrat hi hagi poca evidència científica i encara no s'hagin estudiat la freqüència ni el temps d'aplicació, els resultats de les primeres investigacions combinant tots dos tractaments són positius, perquè els subjectes amb el tractament

combinat mostraren un millor estat de forma i una millor memòria que els altres subjectes inclosos a l'estudi.

Finalment, sembla que l'entorn on fem l'activitat física també és important. Estem tots d'acord que no és el mateix anar a córrer pel passeig de les Aigües o pel passeig Marítim que pel carrer Aragó de Barcelona. Bos *et al.* (2011) van trobar que anar en bicicleta a prop d'àrees amb elevada contaminació ambiental no incrementa el BDNF, mentre que si el mateix exercici es fa en una sala amb aire net s'observa un augment significatiu. Nyhan *et al.* (2014) van trobar que els vianants i els ciclistes urbans presentaven majors nivells de pol·lució als pulmons i menor HRV (SDRR) en comparació amb els participants de l'estudi que usaven el bus o el tren per desplaçar-se. A l'exercici en ambients naturals se'l coneix com a "Green Exercise" i s'ha trobat que millora l'autoestima i l'estat d'ànim (Barton i Pretty, 2010). Fins i tot, s'ha suggerit que a banda dels beneficis emocionals (Bowler, Buyung-Ali, Knight, Pullin, 2010), fer exercici en entorns més naturalitzats o a l'aire lliure, podria fer augmentar els nivells de vitamina D per l'efecte de la llum solar (Holick, 2011). En resum, poder combinar exercici físic al aire lliure i fer una bona gimnàstica mental sembla una bona recepta per reduir, no només, el risc de malalties cardíaques, relacionades amb l'obesitat, sinó també malalties neurodegeneratives i relacionades amb els trastorns de l'estat d'ànim.

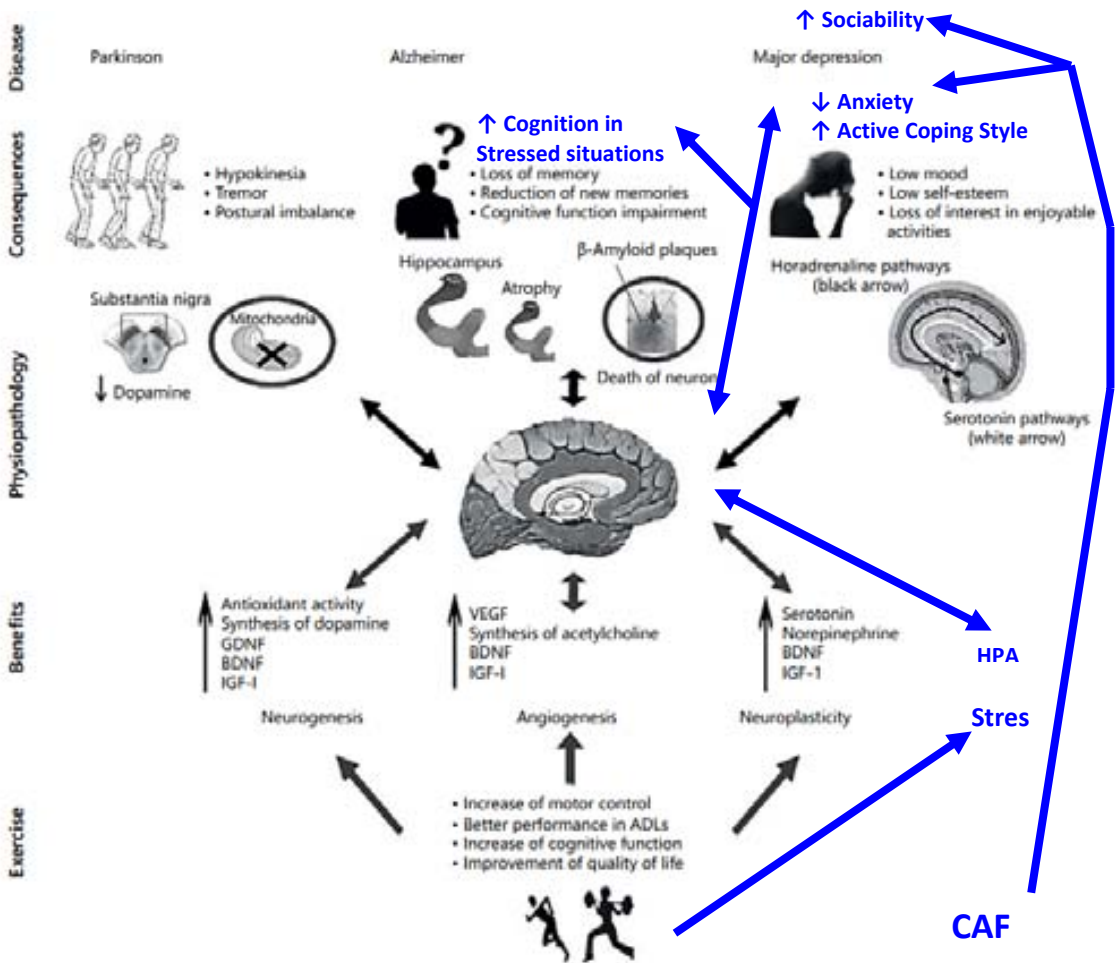


Figura 16: Esquema dels efectes neurobioquímics de l'exercici en el cervell i les seves conseqüències tan a nivell conductual com en les neuropatologies de Parkinson, Alzheimer i depressió major. (extret de: Portugal, Cevada, Monteiro-Junior, Guimaraes, Rubini, Lattari, *et al.*, 2013). En blau es mostra el que aporta aquesta tesi, des de la recerca bàsica, a l'estudi dels beneficis de l'exercici i la dieta.

Conclusions

1. L'exercici moderat a curt termini (9 setmanes) millora la variabilitat cardíaca i disminueix moderadament la conducta ansiosa en rates mascles adultes.
2. Les rates adultes entrenades que deixen de fer exercici disminueixen la variabilitat cardíaca.
3. L'exercici moderat a llarg termini (36 setmanes) redueix la resposta hormonal a l'estrès i facilita l'aprenentatge en situacions de conflicte (*Shuttle Box*).
4. Hi ha diferències de gènere i no s'observen canvis d'aquest tipus d'exercici moderat en les femelles en quant a la variabilitat cardíaca i la resposta hormonal a l'estrès.
5. La dieta de cafeteria indueix obesitat i síndrome metabòlica en rates mascles i femelles adolescents. També disminueix la conducta ansiosa i l'activitat motora en proves d'activitat espontània.
6. La retirada de la dieta de cafeteria després de 8 setmanes reverteix parcialment la síndrome metabòlica en mascles adolescents.
7. Els efectes positius de l'exercici moderat sobre l'ansietat, la resposta d'estrès i l'afrontament en situacions de conflicte suggereixen que aquesta pràctica pot ser un reforç terapèutic en alteracions de l'estat d'ànim i situacions d'estrès per als humans.
8. Tot i que la dieta de cafeteria té efectes nocius a nivell metabòlic, el fet que disminueixi l'ansietat en els animals adolescents suggereix que hi poden haver mecanismes ansiolítics associats al seu consum, a més a més de factors reforçadors associats a la seva saborositat.

Referències (no incloses les concretes de cada publicació o manuscrit)

A

- aan het Rot, M.; Collins, K.A.; Fitterling, H.L. (2009). Physical Exercise and Depression. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 76, 204–214.
- Abbott, R.D.; White, L.R.; Ross, G.W.; Masaki, K.H.; Curb, J.D.; Petrovich, H. (2004). Walking and Dementia in Physically Capable Elderly Men. *JAMA*, 292(12), 1447-1453.
- Acharya, U.R.; Joseph, K.P.; Kannathal, N.; Lim, C.M.; Suri, J.S. (2006). Heart Rate Variability: a review. *Med Bio Eng Comput.*, 44, 1031-1051.
- Ahlskog, J.E.; Geda, Y.E.; Graff-Radford, N.R.; Petersen, R.C. (2011). Physical Exercise as a Preventive or Disease-Modifying Treatment of Dementia and Brain Aging. *Mayo Clin Proc.*, 86(9), 876-884.
- Albeck, D.S.; Sano, K.; Prewitt, G.E.; Dalton, L. (2006). Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behavioural Brain Research*, 168, 345–348.
- Albinet, C. T.; Boucard, G.; Bouquet, C. A.; Audiffren, M. (2010). Increased heart rate variability and executive performance after aerobic training in the elderly. *Eur J Appl Physiol.*, 109, 617-24.
- Aleixandre de Artiñano, A.; Castro, M.M. (2009). Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition*, 102, 1246–1253.
- Allman, J.M. (2003). *El cerebro en evolución*. Barcelona: Ariel Neurociencia.
- Alomari, M.A.; Khabour, O.F.; Azoubi, K.H.; Alzubi, M.A. (2013). Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. *Behavioural Brain Research*, 247, 34–39.
- Alsiö, J.; Roman, E.; Olszewski, P.K.; Jonsson, P.; Fredriksson, R.; Levine, A.S.;...Schiöth, H.B. (2009). Inverse association of high-fat diet preference and anxiety-like behavior: a putative role for urocortin 2. *Genes, Brain and Behavior*, 8, 193–202.
- Alvarez-López, M.J.; Castro-Freire, M.; Cosín-Tomás, M.; Sanchez-Roige, S.; Lanza, J.F.; del Valle, J.;...Kaliman, P. (2013). Long-Term Exercise Modulates Hippocampal Gene Expression in Senescent Female Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33, 1177–1190.

- Anderson, B.J.; Rapp, D.N.; Baek, D.H.; McCloskey, D.P.; Coburn-Litvak, P.S.; Robinson, J.K. (2000). Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiology & Behavior*, *70*, 425-429.
- Ang, E-T.; Dawe, G.S.; Wong, P.T.H.; Moochhala, S.; Ng, Y-K. (2006). Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Research*, *1113*, 186-193.
- Archer, E.; Blair S.N. (2011). Physical Activity and the Prevention of Cardiovascular Disease: From Evolution to Epidemiology. *Progress in Cardiovascular Diseases*, *53*, 387–396.
- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.*, *21*, 205-235.
- Archer, T. (2011). Physical exercise alleviates debilities of normal aging and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* *2011*, *123*, 221–238
- Armario, A. (2006). The hypothalamic—pituitary—adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, *5*, 485-501.
- Armario, A.; Daviu, N.; Muñoz-Abellán, C.; Rabasa, C.; Fuentes, S.; Belda, X.;...Nadal, R. (2012). What can We Know from Pituitary–Adrenal Hormones About the Nature and Consequences of Exposure to Emotional Stressors? *Cell Mol Neurobiol*, *32*, 749-758.
- Armario, A.; Escorihuela, R.M.; Nadal, R. (2008). Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *32*, 1121–1135.
- Arsuaga, J.L. (1999). *El collar del Neandertal*. Barcelona: Temas de hoy.
- Asl, N.A.; Sheikhzade, F.; Torchi, M.; Roshangar, L.; Khamnei, S. (2008). Long-term regular exercise promotes memory and learning in young but not in older rats. *Pathophysiology*, *15*, 9-12.
- Asmundson, G.J.G.; Fetzner, M.G.; DeBoer, L.B.; Powers, M.B.; Otto, M.W.; Smith, J.A.J. (2013). Let's get physical: a contemporary review of the anxiolytic effects of exercise for anxiety and its disorders. *Depression and Anxiety*, *30*, 362–373.
- Aubert, A.E.; Vandeput, S.; Beckers, F.; Liu, J.; Verheyden, B.; Van Huffel, S. (2009). Complexity of cardiovascular regulation in small animals. *Phil. Trans. R. Soc. A*, *367*, 1239-1250.
- Auger, A.P.; Olesen, K.M. (2009). Brain sex differences and the organization of juvenile social play behavior. *J Neuroendocrinol.*, *21*(6), 519-525.

B

- Barbier, J.; Reland, S.; Ville, N.; Rannou-Bekono, F.; Wong, S.; Carré, F. (2006). The effects of exercise training on myocardial adrenergic and muscarinic receptors. *Clin Auton Res.*, 16, 61–65.
- Barha, C.K.; Brummelte, S.; Lieblich, S.E., Galea, L.A.M. (2011). Chronic Restraint Stress in Adolescence Differentially Influences Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function and Adult Hippocampal Neurogenesis in Male and Female Rats. *Hippocampus*, 21, 1216–1227.
- Bartal, I.B-A.; Decety, J.; Mason, P. (2011). Empathy and Pro-Social Behavior in Rats. *Science*, 334, 1427-1430.
- Bartley, C.A.; Hay, M.; Bloch, M.H. (2013). Meta-analysis: Aerobic exercise for the treatment of anxiety disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 45, 34-39.
- Barton, J.; Pretty, J. (2010). What is the Best Dose of Nature and Green Exercise for Improving Mental Health? A Multi-Study Analysis. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 3947–3955.
- Bayod, S., del Valle, J., Canudas, A.M., Lalanza, J.F., Sanchez-Roige, S., Camins, A., Escorihuela, R.M., Pallàs, M. (2011) Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *Journal of Applied Physiology*, 111(5), 1380-1390.
- Bayod, S., del Valle, J., Lalanza, J.F., Sanchez-Roige, S., de Luxan-Delgado, B., Coto-Montes, A., Canudas, A. M., Camins, A., Escorihuela, R.M., Pallas, M. (2012). Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues. *Experimental Gerontology*, 47(12), 925-935.
- Bayod, S., Menella, I., Sanchez-Roige, S., Lalanza, J.F., Escorihuela, R.M., Camins A., Pallàs, M., Canudas, A.M. (2014). Wnt pathway regulation by long-term moderate exercise in rat hippocampus. *Brain Research*, 1543, 38-48.
- Bayod, S.; del Valle, J.; Pelegri, C.; Vilaplana, J.; Canudas, A.M.; Camins, A.; Jiménez, A.; Sanchez-Roige, S.; Lalanza, J.F.; Escorihuela, R.M.; Pallàs, M. Macroautophagic process was differentially modulated by long-term moderate exercise in rat brain and peripheral tissues. *Journal of Physiology and Pharmacology* (en premsa).
- Beery, A.K.; Zucker, I. (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35, 565–572.

- Bennett, J.; Greeme, G.; Schwartz-Barcott, D. (2013). Perceptions of emotional eating behavior. A qualitative study of collage students. *Appetite*, 60, 187-192.
- Bermejo-Pareja, F.; Benito-León, J.; Vega, S.; Medrano, M.J.; Román, G.C. (2008). Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *Journal of the Neurological Sciences*, 264, 63-72.
- Berridge, K.C. i Robinson, T.E. (2003). Parsing reward. *Trends in Neurosciences*, 26(9), 507-513.
- Bianchi M.; Fone K.F.C.; Azmi N.; Heidbreder C.A.; Hagan J.J.; Marsden C.A. (2006). Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 24, 2894-2902.
- Black A.H.; Morse P. (1961). Avoidance-learning in dogs without a warning stimulus. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 4(1), 17-23.
- Blustein, J.E.; McLaughlin, M.; Hoffman, J.R. (2006). Exercise effects stress-induced analgesia and spatial learning in rats. *Physiology & Behavior*, 89, 582-586.
- Boissier, J.R.; Simon, P.; Lwoff, J.M. (1964). L'utilisation D'une Reaction Particuliere De La Souris (Methode De La Planche A Trous. *Thérapie*, 19, 571-589.
- Boix, F.; Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Tobeña, A. (1992). Two-way active avoidance as an animal model of anxiety: Negative correlation between plasma-corticosterone levels and avoidance performance. *Pharmacol. Res.*, 25(suppl. 2), 5-6.
- Bos, I.; Jacobs, L.; Nawrot, T.S.; de Geus B.; Torfs, R.; Panis, L.I.;...Meeusen, R. (2011). No exercise-induced increase in serum BDNF after cycling near a major traffic road. *Neuroscience Letters*, 500, 129-132.
- Boström, P.; Wu, J.; Jedrychowski, M.P.; Korde, A.; Ye, L.; Lo, J.C.;...Spiegelman, B.M. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481, 463-469.
- Boukouvalas, G.; Antoniou, K.; Papalex, E.; Kitraki, E. (2009). Post Weaning High Fat Feeding Affects Rats' Behavior and Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis at the Onset of Puberty in a Sexually Dimorphic Manner. *Neuroscience*, 153, 373-382.
- Bowler, D.E.; Buyung-Ali, L.M.; Knight, T.M.; Pullin, A.S. (2010). A systematic review of evidence for the added benefits to health of exposure to natural environments. *BMC Public Health*, 10, 456-466.

- Boyd, R.; Silk, J.B. (2004). *Cómo evolucionarion los humanos*. Barcelona: Ariel Ciencia.
- Bramble, D.M.; Lieberman, D.E. (2004). Endurance running and the evolution of Homo. *Nature*, 423, 345-352.
- Brody, S. (2010). The Relative Health Benefits of Different Sexual Activities. *J Sex Med.*, 7, 1336-1361.
- Brown, D.A.; Johnson, M.S.; Armstrong, C.J.; Lynch, J.M.; Caruso, N.M.; Ehlers, L.B.;...Moore, R.L. (2007). Short-term treadmill running in the rat: what kind of stressor is it? *J Appl Physiol*, 103, 1979-1985.
- Brown, P.; Sutikna, T.; Morwood, M.J.; Soejono, R.P.; Jatmiko, Saptomo, E.W.;...Due, R.A. (2004). A new small-bodied hominin from the late Pleistocene of Flores, Indonesia. *Nature*, 431, 1055-1061.
- Burghardt, P.R.; Flagel, S.B.; Burghardt, K.J.; Britton, S.L.; Gerard-Koch, L.; Watson, S.J.;...Akil, H. (2011). Risk-assessment and Coping Strategies Segregate with Divergent Intrinsic Aerobic Capacity in Rats. *Neuropsychopharmacology*, 36, 390-401.
- Burghardt, P.R.; Fulk, L.J.; Hand, G.A.; Wilson, M.A. (2004). The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Research*, 1019, 84-96.
- Burghardt, P.R.; Pasumarthi, R.K.; Wilson, M.A.; Fadel, J. (2006). Alterations in fear conditioning and amygdalar activation following chronic wheel running in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 84, 306-312.

C

- Caimari, A.; Oliver, P.; Rodenburg, W.; Keijer, J.; Palou, A. (2010). Slc27a2 expression in peripheral blood mononuclear cells as a molecular marker for overweight development. *International Journal of Obesity*, 34(5), 831-839.
- Call, J.; Tomasello, M. (2008). Does the chimpanzee have a theory of mind? 30 years later. *Trends in Cognitive Sciences*, 12(5), 187-192.
- Campbell, J.E.; Rakhshani, N.; Fediuc, S.; Bruni, S.; Riddell, M.C. (2009). Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training. *J Appl Physiol.*, 106, 66-72.
- Campeau, S.; Nyhuis, T.J.; Sasse, S.K.; Kryskow, E.M.; Herlihy, L.; Masini, C.V.; et al. (2010). Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis Responses to Low-Intensity Stressors are Reduced After Voluntary Wheel Running in Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 22, 872-888.

- Carbonell, E.; Bermúdez de Castro, J.M.; Parés, J.M.; Pérez-González, A.; Cuenca-Bescós, G.; Ollé, A.;...Arsuaga, J.L. (2008). The first hominin of Europe. *Nature*, 452, 465-469.
- Carrasco, G.A.; van den Kar, L.D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*, 463, 235-272.
- Castell-Auví, A.; Cedó, L.; Pallarès, V.; Blay, M.; Ardévol, A.; Pinet, M. (2012). The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats. *British Journal of Nutrition*, 108(7), 1155-1162.
- Cervantes, J.C.; Rodas, G.; Capdevila, Ll. (2009). Heart-rate variability and precompetitive anxiety in swimmers. *Psicothema*, 21(4), 531-536.
- Cetinkaya, C.; Sisman, A.R.; Kiray, M.; Camsari, U.M.; Gencoglu, C.; Baykara, B.;...Uysal, N. (2013). Positive effects of aerobic exercise on learning and memory functioning, which correlate with hippocampal IGF-1 increase in adolescent rats. *Neuroscience Letters*, 549, 177-181.
- Chennaoui, M.; Merino, D.G.; Lesage, J.; Drogou, C.; Guezennec, C.Y. (2002). Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats. *Acta Physiol Scand.*, 175, 113-121
- Chodzko-Zajko, W.J.; Proctor, D.N.; Singh, M.A.F.; Minson, C.T.; Nigg, C.R.; Salem, G.J.;...Skinner, J.S. (2009). Exercise and Physical Activity for Older Adults. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 41(7), 1510-1530.
- Cigarroa, I.; Zapata, R.E. (2013). Irisina, La hormona que ayuda a quemar grasa. *Kinesiología*, 32(3), 60-63.
- Colcombe, S.; Kramer, A.F. (2003). Fitness effects on the cognitive function of older adults: A Meta-Analytic Study. *Psychological Science*, 14(2), 125-130.
- Colcombe, S.J.; Erisckson, K.I.; Scalf, P.E.; Kim, J.S.; Prakash, R.; McAuley, E.;...Kramer, A.F. (2006). Aerobic Exercise Training Increases Brain Volume in Aging Humans. *Journal of Gerontology: Medical Sciences*, 61A(11), 1166-1170.
- Conn, V.S. (2010). Anxiety Outcomes after Physical Activity Interventions Meta-Analysis Findings. *Nursing Research*, 59(3), 224-231.
- Cosín-Tomás, M.; Alvarez-López, M.J.; Sanchez-Roige, S.; Lanza, J.F.; Bayod, S.; Sanfeliu, C.;...Kaliman, P. (2014). Epigenetic alterations in hippocampus of SAMP8 senescent mice and modulation by voluntary physical exercise. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 1-10.

- Cotman, C.W.; Berchtold, N.C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neuroscience*, 25(6), 295-301.

D

- Daffner, K.R. (2010). Promoting Successful Cognitive Aging: A Comprehensive Review. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19, 1101-1122.
- Dalla, C.; Shors, T.J. (2009). Sex differences in learning processes of classical and operant conditioning. *Physiology & Behavior*, 97, 229-238.
- Dal-Zotto, S.; Martí, O.; Armario, A. (2000). Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behavioural Brain Research*, 114, 175-181.
- Darwin, Ch. (1859/1998). *The Origin of Species*. New York: The Modern Library.
- de Waal, F.B.M. (2011). What is an animal emotion? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1224, 191-206.
- Del Río, C.; Oliveras, I.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Tobeña, A.; Fernández-Teruel, A. (2014). *Roman High-Avoidance rats as a putative schizophrenia-relevant model: impairments in sensorimotor gating and working memory*. Pòster presentat en el IV Scientific Conference: Integrate Neurobiology de l'INC de la UAB. Bellaterra, Barcelona, Catalunya.
- Diaz, L.R.; Siontas, D.; Mendoza, J.; Arvanitogiannis, A. (2013). High levels of wheel running protect against behavioral sensitization to cocaine. *Behavioural Brain Research*, 237, 82-85.
- Diaz-Moran, S.; Palència, M.; Mont-Cardona, C.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Martínez-Membrives, E.;...Fernandez-Teruel, A. (2012). Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats: Comparison with the Roman rat strains. *Behavioural Brain Research*, 228, 203-210.
- DiCarlo, S.E.; Collins, H.L.; Rodenbaugh, D.W.; Smitha, M.R.; Berger, R.D.; Yeragani, V.K. (2002). Daily Exercise Reduces Measures of Heart Rate and Blood Pressure Variability in Hypertensive Rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, 24, 3, 221-234.
- Dinas, P.C.; Koutedakis, Y.; Flouris, A.D. (2013). Effects of active and passive tobacco cigarette smoking on heart rate variability. *International Journal of Cardiology*, 163, 109-115.

- Ding, Y-H., Li, J.; Zhou, Y.; Rafols, J.A.; Clark, J.C.; Ding, Y. (2006). Cerebral Angiogenesis and Expression of Angiogenic Factors in Aging Rats after Exercise. *Current Neurovascular Research*, 3, 15-23.
- Dishman, R.K.; Berthoud, H-R.; Booth, F.W.; Cotman, C.W.; Edgerton, V.R.; Fleshner, M.R.;...Zigmond, M.J. (2006). Neurobiology of Exercise. *Obesity*, 14(3), 345-356.
- Dishman, R.K.; Renner, K.J.; Youngstedt, S.D.; Reigle, T.G., Bunnell, B.N.; Buerke, K.A.;...Meyerhoff, J.L. (1997). Activity Wheel Running Reduces Escape Latency and Alters Brain Monoamine Levels After Footshock. *Brain Research Bulletin*, 42(5), 399-406.
- Dixon, J.B. (2010). The effect of obesity on health outcomes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316, 104-108.
- Donner, N.C.; Lowry, C.A. (2013). Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.*, 465, 601-626.
- Droste, S.K.; Chandramohan, Y.; Hill, L.E.; Linthorst, A.C.E.; Reul, J.M.H.M. (2007). Voluntary Exercise Impacts on the Rat Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis Mainly at the Adrenal Level. *Neuroendocrinology*, 86, 26-37.
- Droste, S.K.; Schweizer, M.C.; Ulbricht, S.; Reul, J.M.H.M. (2006). Long-Term Voluntary Exercise and the Mouse Hypothalamic-Pituitary- Adrenocortical Axis: Impact of Concurrent Treatment with the Antidepressant Drug Tianeptine. *Journal of Neuroendocrinology*, 18, 915-925.
- Dunbar, R.I.M. (2010). The social role of touch in humans and primates: Behavioural function and neurobiological mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34, 260-268.
- Dunlap, K.; Gentry, E.; Zeigler, T. (1931). The behavior of white rats under food and electric shock stimulation. *Journal of Comparative Psychology*, 12(4), 371-378.

E

- Elwood, P.; Galante, J.; Pickering, J.; Palmer, S.; Bayer, A.; Ben-Shlomo, Y.;...Gallacher, J. (2013). Healthy Lifestyles Reduce the Incidence of Chronic Diseases and Dementia: Evidence from the Caerphilly. *PLoS ONE*, 8(12), e81877.
- Erickson, K.I.; Miller, D.L.; Roecklein, K.A. (2012). The Aging Hippocampus: Interactions between Exercise, Depression, and BDNF. *The Neuroscientist*, 18(1), 82-97.

- Escorihuela, R.M.; Fernández-Teruel, A.; Gil, L.; Aguilar, R.; Tobeña, A.; Driscoll, P. (1999). Inbred Roman High- and Low-Avoidance Rats: Differences in Anxiety, Novelty-Seeking, and Shuttlebox Behaviors. *Physiology & Behavior*, 67(1),19-26.
- Escorihuela, R.M.; Tobeña, A.; Driscoll, P.; Fernández-Teruel, A. (1995). Effects of Training, Early Handling, and Perinatal Flumazenil on Shuttle Box Acquisition in Roman Low-Avoidance Rats: Toward Overcoming a Genetic Deficit. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19(3), 353-367.
- Estanislau, C.; Díaz-Morán, S.; Cañete, T.; Blázquez, G.; Tobeña, A.; Fernández-Teruel, A. (2013). Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. *Neuroscience Research*, 77, 187-201.
- Etnier, J.L.; Nowell, P.M.; Landers, D.M.; Sibley, B.A. (2006). A meta-regression to examine the relationship between aerobic fitness and cognitive performance. *Brain Research Reviews*, 52, 119-130.

F

- Faust, O.; Yi, L.M.; Hua, L.M. (2013). Heart Rate Variability Analysis for Different Age and Gender. *Journal of medical imaging and health informatics*, 3(3), 395-400.
- Fediuc, S.; Campbell, J.E.; Riddell, M.C. (2006). Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol.*, 100, 1867-1875.
- Fernández-Guasti, A.; Fiedler, J.L.; Herrera, L.; Handa, R.J. (2012). Sex, Stress, and Mood Disorders: At the Intersection of Adrenal and Gonadal Hormones. *Horm Metab Res.*, 44, 607-618.
- Fernández-Teruel, A.; Escorihuela, R.M.; Núñez, J.F.; Zapata, A.; Boix, F.; Salazar, W.; et al. (1991). The early acquisition of two-way (Shuttle Box) avoidance as an anxiety-mediated behaviour: Psychopharmacological Validation. *Brain Research Bulletin*, 26, 173-176.
- Figuereido, H.F.; Dolgas, C.M.; Herman, J.P. (2002). Stress Activation of Cortex and Hippocampus Is Modulated by Sex and Stage of Estrus. *Endocrinology*, 143(7), 2534-2540.
- File, S.E. (1980). The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *Journal of Neuroscience Methods*, 2(3), 219-238.
- File, S.E.; Hyde, J.R.G. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? *Br. J. Pharmac.*, 62, 19-24.

- File, S.E.; Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *European Journal of Pharmacology*, 463, 35–53.
- Finlayson, C. (2005). Biogeography and evolution of the genus *Homo*. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(8), 457–463.
- Flint, J. (2004). The genetic basis of neuroticism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28, 307–316.
- Fone, K.C.F.; Porkess, M.V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32, 1087–1102.
- Forristall, J.R.; Hookey, B.L.; Grant, V.L. (2007). Conditioned taste avoidance induced by forced and voluntary wheel running in rats. *Behavioural Processes*, 74, 326–333.
- Fulk, L.J.; Stock, H.S.; Lynn, A.; Marshall, J.; Wilson, M.A.; Hand, G.A. (2004). Chronic Physical Exercise Reduces Anxiety-Like Behavior in Rat. *Int J Sports Med.*, 25, 78–82.
- Fuss, J.; Abdallah, N.M-B.; Vogt, M.A.; Touma, C. Pacifici, P.G.; Palme, R.;...Gass, P. (2010). Voluntary Exercise Induces Anxiety-Like Behavior in Adult C57BL/6J Mice Correlating With Hippocampal Neurogenesis. *Hippocampus*, 20, 364–376.

G

- García, A.; Martí, O.; Vallès, A.; Dal-Zotto, S.; Armario, A. (2000). Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress: effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology*, 72, 114–125.
- García-Capdevila, S.; Portell-Cortés, I.; Torras-Garcia, M.; Coll-Andreu, M.; Costa-Miserachs, D. (2009). Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behavioural Brain Research*, 202, 162–170.
- Garcia-Gonzalez, M.A.; Fernandez-Chimeno, M.; Ferrer, J.; Escorihuela, R.M.; Parrado, E.; Capdevila, L.;...Ramos-Castro, J. (2011). New indices for quantification of the power spectrum of heart rate variability time series without the need of any frequency band definition. *Physiological Measurement*, 32, 995–1009.
- Genovesi, S.; Zaccaria, D.; Rossi, E.; Valsecchi, M.G.; Stella, A.; Stramba-Badiale, M. (2007). Effects of exercise training on heart rate and QT interval in healthy young individuals: are there gender differences? *Europace*, 9, 55–60.

- Gibbons, A. (2007). Paleoanthropology: Food for thought. *Science*, 316, 1558-1560.
- Goma, M.; Tobeña, A. (1978). Reliability of various measures obtained in open-field test. *Psychological Reports*, 43, 1123-1128.
- Gosling, S.D. (2001). From mice to men: What can we learn about personality from animal research? *Psychological Bulletin*, 127(1), 45-86.
- Goularte, J.F.; Ferreira, M.B.C.; Sanvitto, G.L. (2012). Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *British Journal of Nutrition*, 108(8), 1511-1518.
- Greenwood, B.N.; Fleshner, M. (2008). Exercise, Learned Helplessness, and the Stress-Resistant Brain. *Neuromol Med.*, 10, 81-98.
- Greenwood, B.N.; Foley, T.E.; Day, H.E.W.; Campisi, J.; Hammack, S.H.; Campeau, S.;...Fleshner, M. (2003). Freewheel Running Prevents Learned Helplessness/ Behavioral Depression: Role of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(7), 2889-2898.
- Greenwood, B.N.; Loughridge, A.B.; Sadaoui, N.; Christianson, J.P.; Fleshner, M. (2012). The protective effects of voluntary exercise against the behavioral consequences of uncontrollable stress persist despite an increase in anxiety following forced cessation of exercise. *Behavioural Brain Research*, 233, 314-321.
- Greenwood, B.N.; Spence, K.G.; Crevling, D.M.; Clark, P.J.; Craig, W.C.; Fleshner, M. (2013). Exercise-induced stress resistance is independent of exercise controllability and the medial prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience*, 37, 469-478.
- Gremeaux, V.; Gayda, M.; Lepers, R.; Sosner, P.; Jeneau, M.; Nigam, A. (2012). Exercise and longevity. *Maturitas*, 73, 312-317.
- Grippo, A.J.; Lamb, D.G.; Carter, C.S.; Porges, S.W. (2007). Social Isolation Disrupts Autonomic Regulation of the Heart and Influences Negative Affective Behaviors. *Biol. Psychiatry*, 62, 1162-1170.
- Guerre-Millo, M. (2013). *Animal Models of Obesity*. En Bastard, J.P.; Fève, B. (eds.). *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue*. Springer-Verlag; France.
- Guillet, R.; Genéty, J. (1978). *Manual de medicina del deporte*. Barcelona: Toray-Masson
- Guyton, A.C. (1977). *Tratado de Fisiología Médica*. Madrid: Interamericana.

H

- Hall, C.S. (1934). Emotional Behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. comp. Psychol.*, *18*, 385-403.
- Handley, S.L.; Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, *327*, 1-5.
- Hansalik, M.; Skalicky, M.; Viidik, A. (2006). Impairment of water maze behaviour with ageing is counteracted by maze learning earlier in life but not by physical exercise, food restriction or housing conditions. *Experimental Gerontology*, *41*, 169-174.
- Haskell, W.L.; Lee, I-M.; Pate, R.R.; Powell, K.E.; Blair, S.N.; Franklin, B.A.;...Bauman, A. (2007). Physical Activity and Public Health. Updated Recommendation for Adults From the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*, *116*, 1-13.
- Hautala, A.J.; Kiviniemi, A.M.; Tulppo, M.P. (2009). Individual responses to aerobic exercise: The role of the autonomic nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *33*, 107-115.
- Hayes, K.; Sprague, S.; Guo, M.; Davis, W.; Friedman, A.; Kumar, A.;...Ding, Y. (2008). Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol.*, *115*, 289-296.
- Herman, J.P., Figuereido, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C.;...Cullinan, W.E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *24*, 151-180.
- Hermes, G.; Li, N.; Duman, C.; Duman, R. (2011). Post-weaning chronic social isolation produces profound behavioral dysregulation with decreases in prefrontal cortex synaptic-associated protein expression in female rats. *Physiology & Behavior*, *104*, 354-359.
- Hillman, C.H.; Erickson, K.I.; Kramer, A.F. (2008). Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*, 58-64.
- Hillman, C.H.; Pontifex, M.B.; Raine, L.B.; Castelli, D.M.; Hall, E.E.; Kramer, A.F. (2009). The effect of acute treadmill walking on cognitive control and academic achievement in preadolescent children. *Neuroscience*, *159*, 1044-1054.
- Holick, M.F. (2011). Vitamin D: Evolutionary, Physiological and Health Perspectives. *Current Drug Targets*, *12*, 4-18.

- Homberg, J.R. (2013). Measuring behaviour in rodents: Towards translational neuropsychiatric research. *Behavioural Brain Research*, 236, 295-306.
- Hon, E.H.; Lee, S.T. (1965). Electronic evaluation of the fetal heart rate. Viii. Patterns preceding fetal death, further observations. *Am J Obstet Gynecol.*, 15(87), 814-26.
- Hopkins, M.E.; Bucci, D.J. (2010). BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94, 278-284.
- Hopkins, M.E.; Davis, F.C.; Vantighem, M.R.; Whalen, P.J.; Bucci, J. (2012). Differential effects of acute and regular physical exercise on cognition and affect. *Neuroscience*, 215, 59-68.
- Hötting, K.; Rödiér, B. (2013). Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37, 2243-2257.
- Hoydal, M.A.; Wisloff, U.; Kemi, O.J.; Ellingsen, O. (2007). Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*, 14(6), 753-760.
- Hyman, S.E. (2009). How adversity gets under the skin. *Nature Neuroscience*, 12(3), 241-244.

I

- Ingalhalikar, M.; Smith, A.; Parker, D.; Satterthwaite, T.D.; Elliott, M.A.; Ruparel, K.;...Verma, R. (2013). Sex differences in the structural connectome of the human brain. *PNAS*, 111(2), 823-828.
- Intlekofer, K.A.; Cotman, C.W. (2013). Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 57, 47-55.

J

- James, D. V. B.; Reynolds, L. J.; Maldonado-Martin, S. (2010). Influence of the duration of a treadmill walking bout on heart rate variability at rest in physically active women. *J Phys Act Health.*, 7, 95-101.
- James, W.P.T. (2008). The epidemiology of obesity: the size of the problem. *Journal of Internal Medicine*, 263, 336-352.
- Johnson, P.M.; Kenny, P.J. (2010). Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nature Neuroscience*, 13(5), 635-643.

K

- Kaliman, P.; Párrizas, M.; Lalanza, J.F.; Camins, A.; Escorihuela, R.M.; Pallàs, M. (2011). Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process. *Ageing Research Reviews*, 10, 475–486.
- Karason, K.; Molgaard, H.; Wikstrand, J.; Sjöström, L. (1999). Heart Rate Variability in Obesity and the Effect of Weight Loss. *American Journal of Cardiology*, 83(8), 1242–1247.
- Kawashima, H.; Saito, T.; Yoshizato, H.; Fujikawa, T.; Sato, Y.; McEwen, B.S.;...Soya, H. (2004). Endurance treadmill training in rats alters CRH activity in the hypothalamic paraventricular nucleus at rest and during acute running according to its period. *Life Sciences*, 76, 763–774.
- Kemp, A.H.; Quintana, D.S.; Gray, M.A.; Felmingham, K.L.; Brown, K.; Gatt, J.M. (2010). Impact of Depression and Antidepressant Treatment on Heart Rate Variability: A Review and Meta-Analysis. *Biol psychiatry*, 67, 1067–1074.
- Kempermann, G. (2008). The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends in Neurosciences*, 31(4), 163–169.
- Kerr, A.L.; Steuer, E.L.; Pochtarev, V.; Swain, R.A. (2010). Angiogenesis but not neurogenesis is critical for normal learning and memory acquisition. *Neuroscience*, 171, 214–226.
- Kleim, J.A.; Cooper, N.R.; VandenBerg, P.M. (2002). Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Research*, 934, 1–6.
- Koch, L.G.; Britton, S.L. (2001). Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol Genomics*, 5, 45–52.
- Kraft, E. (2012). Cognitive function, physical activity, and aging: Possible biological links and implications for multimodal interventions. *Aging, Neuropsychology, and Cognition*, 19(1–2), 248–263.
- Krolow, R.; Noschang, C.; Arcego, D.M.; Adreazza, A.C.; Peres, W.; Gonçalves, C.A.;...Dalmaz, C. (2010). Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner. *Appetite*, 55(1), 108–116.
- Krolow, R.; Noschang, C.; Arcego, D.M.; Huffell, A.P.; Marcolin, M.L.; Benitz, A.N.;...Dalmaz, C. (2013). Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism Clinical and Experimental*, 62, 1268–1278.

- Kvetnansky, R., Sabban, E.L., Palkovits, M. (2009). Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol Rev*, 89, 535–606.

L

- la Fleur, S.E.; Akana, S.F.; Manalo, S.L., Dallman, M.F. (2004). Interaction between Corticosterone and Insulin in Obesity: Regulation of Lard Intake and Fat Stores. *Endocrinology*, 145(5), 2174–2185.
- la Fleur, S.E.; Vanderschuren, L.J.M.J.; Luijendijk, M.C.; Kloeze, B.M.; Tiesjema, B.; Adan, R.A.H. (2007). A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. *International Journal of Obesity*, 31, 1286–1294.
- Laborde, S.; Brüll, A.; Weber, J.; Anders, L.S. (2011). Trait emotional intelligence in sports: A protective role against stress through heart rate variability? *Personality and Individual Differences*, 51, 23–27.
- Lachance, D.; Plante, E.; Bouchard-Thomassin, A-A.; Champetier, S.; Roussel, E.; Drolet, M-C.;...Couet, J. (2009). Moderate Exercise Training Improves Survival and Ventricular Remodeling in an Animal Model of Left Ventricular Volume Overload. *Circ Heart Fail.*, 2, 437-445.
- Lalanza, J.F., Caimari, A., del Bas, J.M., Torregrossa, D., Cigarroa, I., Pallàs M., Capdevila, Ll., Arola, L., Escorihuela, R.M. Effects of post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and less anxiety-like behaviour. *Plos One*, 9(1), e85049.
- Lalanza, J.F., Sanchez-Roige, S., Gagliano, H., Fuentes, S., Bayod, S., Camins, A., Pallàs, M., Armario, A., Escorihuela, R.M. (2012). Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 1745-1754.
- Lambourne, K.; Tomporowski, P. (2010). The effect of exercise-induced arousal on cognitive task performance: A meta-regression analysis. *Brain Research*, 1341, 12-24.
- Lane, R.D.; McRae, K.; Reiman, E.M.; Chen, K.; Ahern, G.L.; Thayer, J.F. (2009). Neural correlates of heart rate variability during emotion. *NeuroImage*, 44, 213–222.
- Langford, D.J.; Bailey, A.L.; Chanda, M.L.; Clarke, S.E.; Drummond, T.E.; Echols, S.;...Mogil, J.S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6), 447-452.

- Lapmanee, S.; Charoenphandhu, J.; Charoenphandhu, N. (2013). Beneficial effects of fluoxetine, reboxetine, venlafaxine, and voluntary running exercise in stressed male rats with anxiety - and depression-like behaviors. *Behavioural Brain Research*, 250, 316–325.
- Lavie, C.J.; Thomas, R.J.; Squires, R.W.; Allison, T.G.; Milani, R.V. (2009). Exercise Training and Cardiac Rehabilitation in Primary and Secondary Prevention of Coronary Heart Disease. *Mayo Clin Proc.*, 84(4), 373-383.
- Leasure, J.L.; Decker, L. (2009). Social Isolation Prevents Exercise-Induced Proliferation of Hippocampal Progenitor Cells in Female Rats. *Hippocampus*, 19, 907–912.
- Leasure, J.L.; Jones, M. (2008). Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience*, 156, 456-465.
- LeDoux, J. (2012). Rethinking the Emotional Brain. *Neuron*, 73, 653-676.
- Lee, B-H.; Kim, Y-K. (2009). Reduced platelet BDNF level in patients with major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 33, 849–853.
- Lee, M-G.; Park, K-S.; Kim, D-U.; Choi, S-M.; Kim, H.J. (2012). Effects of high-intensity exercise training on body composition, abdominal fat loss, and cardiorespiratory fitness in middle-aged Korean females. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 37, 1019–1027.
- Leuner, B.; Gould, E.; Shors, T.J. (2006). Is There A Link Between Adult Neurogenesis and Learning? *Hippocampus*, 16, 216–224.
- Lewis, M.J.; Short, A.L. (2010). Exercise and cardiac regulation: what can
- Li, J.S.; Barnett, T.A.; Goodman, E.; Wasserman, R.C.; Kemper, A.R. (2013). Approaches to the Prevention and Management of Childhood Obesity: The Role of Social Networks and the Use of Social Media and Related Electronic Technologies: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 127, 260-267.
- Li, J-Y.; Kuo, T.B.J.; Hsieh, S.S.Y.; Yang, C.C.H. (2008). Changes in electroencephalogram and heart rate during treadmill exercise in the rat. *Neuroscience Letters*, 434, 175–178.
- Liu, Y-F.; Chen, H-I.; Wu, C-L.; Kuo, Y-M.; Lu, L.; ...Jen, C.J. (2009). Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol.*, 587, 13, 3221–3231.

- Luger, A.; Deuster, P.A.; Kyle, S.N.; Gallucci, W.T.; Montgomery, L.C.; Gold, P.W.;...Chrousos, G.P. (1987). Acute Hypothalamic-Pituitary-Adrenal responses to the stress of treadmill exercise. *The New England Journal of Medicine*, 316(21), 1309-1315.

M

- Machanda, Z.P.; Gilby, I.C.; Wrangham, R.W. (2014). Mutual grooming among adult male chimpanzees: the immediate investment hypothesis. *Animal Behaviour*, 87, 165-174.
- Maier, S.F. (1984). Learned helplessness and animal models of depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.*, 8, 435-446.
- Maier, S.F.; Seligman, M.E.P. (1976). Learned Helplessness - Theory and Evidence. *Journal of Experimental Psychology: General*, 105(1), 3-46.
- Malina, R.M.; Little, B.B. (2008). Physical Activity: The Present in the Context of the Past. *American Journal of Human Biology*, 20, 373-391.
- Maniam, J.; Morris, M.J. (2010). Voluntary exercise and palatable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: Role of hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, 35, 1553-1564.
- Marino, L., Connor, R.C., Fordyce, R.E, Herman L.M., Hof, P.R., Lefebvre, L. et al. (2007). Cetaceans Have Complex Brains for Complex Cognition. *Plos Biology*, 5(5), e139.
- Márquez, C.; Nadal, R.; Armario, A. (2004). The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience*, 123, 601-612.
- Martí, O.; Armario, A. (1998). Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int. J. Dev. Neuroscience*, 16, 130-159.
- Martinowich, K.; Manji, H.; Lu, B. (2007). New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nature Neuroscience*, 10(9), 1089-1093.
- Martire, S.I.; Holmes, N.; Westbrook, R.F.; Morris, M.J. (2013). Altered Feeding Patterns in Rats Exposed to a Palatable Cafeteria Diet: Increased Snacking and Its Implications for Development of Obesity. *PLoS ONE*, 8(4), e60407.

- Martire, S.I.; Maniam, J.; South, T.; Holmes, N.; Westbrook, R.F.; Morris, M.J. (2014). Extended exposure to a palatable cafeteria diet alters gene expression in brain regions implicated in reward, and withdrawal from this diet alters gene expression in brain regions associated with stress. *Behavioural Brain Research*, 265, 132–141.
- Marton, O.; Koltai, E.; Nyakas, C.; Bakonyi, T.; Zenteno-Savin, T.; Kumagai, S.;...Radak, Z. (2010). Aging and exercise affect the level of protein acetylation and SIRT1 activity in cerebellum of male rats. *Biogerontology*, 11, 679–686.
- Mattson, M.P. (2012). Evolutionary aspects of human exercise—Born to run purposefully. *Ageing Res Rev.*, 11(3), 347-352.
- McEwen, B.S. (2003). Mood disorders and allostatic load. *Biol. Psychiatry*, 54, 200–207.
- McGowan, E.; Eriksen, J.; Hutton, M. (2006). A decade of modeling Alzheimer’s disease in transgenic mice. *Trends in Genetics*, 22(5), 281-289.
- McIlwain, K.L., Merriweather, M.Y., Yuva-Paylor, L.A., Paylor, R. (2001). The use of behavioral test batteries: Effects of training history. *Physiology & Behavior*, 73, 705-717.
- Mello, P.B.; Benetti, F.; Cammarota, M.; Izquierdo, I. (2008). Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 80(2), 301-309.
- Michels, N.; Sioen, I.; Clays, E.; De Buyzere, M.; Ahrens, W.; Huybrechts, I.;...Henauw, S.D. (2013). Children’s heart rate variability as stress indicator: Association with reported stress and cortisol. *Biological Psychology*, 94, 433–440.
- Miller N.E. (1948). Studies of fear as an acquirable drive: i. Fear as motivation and fear-reduction as reinforcement in the learning of new responses. *Journal of experimental psychology*, 38(1), 89-101.
- Montano, N.; Porta, A.; Cogliati, C.; Costantino, G.; Tobaldini, E.; Casali, K.R.;...Iellamo, F. (2009). Heart rate variability explored in the frequency domain: A tool to investigate the link between heart and behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33, 71–80.
- Moraes-Silva, I.C.; De La Fuente, R.N.; Mostarda, C.; Rosa, K.; Flues, K.; Damaceno-Rodrigues, N.R.;...Irigoyen, M.C. (2010). Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37, e114–e120.

- Moraska, A.; Deak, T.; Spencer, R.L.; Roth, D.; Fleshner, M. (2000). Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.*, 279, 1321-1329.
- Mota-Pereira, J.; Silveiro, J.; Carvalho, S.; Ribeiro, J.C.; Fonte, D.; Ramos, J. (2011). Moderate exercise improves depression parameters in treatment-resistant patients with major depressive disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 45, 1005-1011.
- Mul, J.D.; van Boxtel, R.; Bergen, D.J.M.; Brans, M.A.D.; Brakkee, J.H.; Toonen, P.W.;...Cuppen, E. (2012). Melanocortin Receptor 4 Deficiency Affects Body Weight Regulation, Grooming Behavior, and Substrate Preference in the Rat. *Obesity*, 20, 612-621.

N

- Narath, E.; Skalicky, M.; Viidik, A. (2001). Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Experimental Gerontology*, 36, 1699-1711.
- Neeper, S.A.; Gomez-Pinilla, F.; Choi, J.; Cotman, C. (1995). Exercise and brain neurotrophins. *Nature*, 373, 109.
- Nelson, M.E.; Rejeski, W.J.; Blair, S.N.; Duncan, P.W.; Judge, J.O.; King, A.C.;...Castaneda-Sceppa, C. (2007). Physical Activity and Public Health in Older Adults Recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*, 116, 1-12.
- Nestler, E.J.; Hyman, S.E. (2012). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13(10), 1161-1169.
- Nguyen, J.C.D.; Killcross, A.S.; Jenkins, T.A. (2013). Effect of low-intensity treadmill exercise on behavioural measures and hippocampal parvalbumin immunoreactivity in the rat. *Behavioural Brain Research*, 256, 598- 601.
- Nielsen, S.J.; Siega-Riz, A.M.; Popkin, B.M. (2002). Trends in Food Locations and Sources among Adolescents and Young Adults. *Preventive Medicine*, 35, 107-113.
- Novak, C.M.; Burghardt, P.R.; Levine, J.A. (2012). The use of a running wheel to measure activity in rodents: Relationship to energy balance, general activity, and reward. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 1001-1014.
- Nyhan, M.; McNabola, A.; Misstear, B. (2014). Comparison of particulate matter dose and acute heart rate variability response in cyclists, pedestrians, bus and train passengers. *Science of the Total Environment*, 468-469, 821-831.

O

- O'Callaghan, R.M.; Griffin, E.G.; Kelley, A.M. (2009). Long-Term Treadmill Exposure Protects Against Age-Related Neurodegenerative Change in the Rat Hippocampus. *Hippocampus*, 19, 1019–1029.
- O'Callaghan, R.M.; Ohle, R.; Kelly, A.M. (2007). The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 176, 362–366.
- Oddo, S.; Caccamo, A.; Kitazawa, M.; Tseng, B.P.; LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24, 1063–1070.
- Odgen, C.L.; Carroll, M.D.; Curtin, L.R.; McDowell, M.A.; Tabak, C.J.; Flegal, K.M. (2006). Prevalence of Overweight and Obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*, 295, 1549-1555.
- O'Keefe, J.H.; Vogel, R.; Lavie, C.J.; Cordain, L. (2011). Exercise Like a Hunter-Gatherer: A Prescription for Organic Physical Fitness. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 53, 471–479.
- Oliveira, N.L.; Ribeiro, F.; Alves, A.J.; Teixeira, M.; Miranda, F.; Oliveira, J. (2013). Heart rate variability in myocardial infarction patients: Effects of exercise training. *Rev Port Cardiol.*, 32(9), 687-700.
- Ong, Z.Y.; Wanasuria, A.F.; Lin, M.Z.P.; Hiscock, J.; Muhlhauser, B.S. (2013). Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system. *Appetite*, 65, 189–199.

P

- Pan, J.; Tompkins, W.J. (1985). A Real-Time QRS Detection Algorithm. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 32, 230-236.
- Panksepp, J. (2011). Cross-Species Affective Neuroscience Decoding of the Primal Affective Experiences of Humans and Related Animals. *PLoS ONE*, 6(9), e21236.
- Parrado, E. (2010). *Indicadors psicofisiològics i conductuals de la condució física saludable, i de l'adaptació a la competició esportiva*. (Tesi doctoral). Departament de Psicologia Bàsica, Evolutiva i de l'Educació. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Parylak, S.L.; Koob, G.F.; Zorrilla, E.P. (2011). The dark side of food addiction. *Physiology & Behavior*, 104, 149–156.

- Pate, R.R.; Pratt, M.; Blair, S.N.; Haskell, W.L.; Macera, C.A.; Bouchard, C.;...Wilmore, J.H. (1995). Physical Activity and Public Health - A Recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA*, 273, 402-407.
- Paton, J.F.R.; Boscan, P.; Pickering, A.E.; Nalivaiko, E. (2005). The yin and yang of cardiac autonomic control: Vago-sympathetic interactions revisited. *Brain Research Reviews*, 49, 555-565.
- Paul, E.S.; Harding, E.J.; Mendl, M. (2005). Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 469-491.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. (1985). Validation of "open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14, 149-167.
- Pereira, A.C.; Huddlestone, D.E.; Brickman, A.M.; Sosunov, A.A.; Hen, R.; McHann, G.M.;...Small, S.A. (2006). An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *PNAS*, 104(13), 5638-5643.
- Perini, R.; Fisher, N.; Veicsteinas, A.; Pendergast, D.R. (2002). Aerobic training and cardiovascular responses at rest and during exercise in older men and women. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 34(4), 700-708.
- Perry, C.L.; Creamer, M.R. (2014). The Childhood Obesity Epidemic: Lessons Learned from Tobacco. *The Journal of Pediatrics*, 164(1), 178-185.
- Pickering, T.R. i Bunn, H.T. (2007). The endurance running hypothesis and hunting and scavenging in savanna-woodlands. *Journal of Human Evolution*, 53, 434-438.
- Pietiläinen, K.H.; Kaprio, J.; Borg, P.; Plasqui, G.; Yki-Järvinen, H.; Kujala, U.M.;... Rissanen, A. (2008). Physical Inactivity and Obesity: A Vicious Circle. *Obesity*, 16, 409-414.
- Pietrelli, A.; López-Costa, J.J.; Goñi, R.; López, E.M.; Brusco, A.; Basso, N. (2011). Effects of moderate and chronic exercise on the nitric system and behavioral parameters in rats. *Brain Research*, 1389, 71-82.
- Porsolt, R.D.; Le Pichon, M.; Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730-732.
- Portugal, E.M.M.; Cevada, T.; Monteiro-Junior, R.S.; Guimaraes, T.T.; Rubini, E.d.C.; Lattari, E.;...Deslandes, A.C. (2013). Neuroscience of Exercise: From Neurobiology Mechanisms to Mental Health. *Neuropsychobiology*, 68, 1-14.

- Premack, D. (2007). Human and animal cognition: Continuity and discontinuity. *PNAS*, 104(35), 13861–13867.
- Prior, B.M.; Yang, H.T.; Terjung, R.L. (2004). What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol.*, 97, 1119–1128.

R

- Raichlen, D.A.; Gordon, A.D. (2011). Relationship between Exercise Capacity and Brain Size in Mammals. *Plos One*, 6(6), e20601.
- Rao, A.K.; Chou, A.; Bursley, B.; Smulofsky, J.; Jezequel, J. (2014). Systematic Review of the Effects of Exercise on Activities of Daily Living in People with Alzheimer’s Disease. *The American Journal of Occupational Therapy*, 68(1), 50-56.
- Rasmussen, M.; Laumann, K. (2013). The academic and psychological benefits of exercise in healthy children and adolescents. *Eur J Psychol Educ.*, 28, 945–962.
- Ren, Y-Y.; Overmyer, K.A.; Qi, N.R.; Treutelaar, M.K.; Heckenkamp, L.; Kalahar, M.;...Li.J.Z. (2013). Genetic Analysis of a Rat Model of Aerobic Capacity and Metabolic Fitness. *PLoS ONE*, 8(10), e77588.
- Rennie, K.L.; Hemingway, H.; Kumari, M.; Brunner, E.; Malik, M.; Marmot, M. (2003). Effects of Moderate and Vigorous Physical Activity on Heart Rate Variability in a British Study of Civil Servants. *American Journal of Epidemiology*, 158(2), 135-143.
- Reyes del Paso, G.A.; Langewitz, W.; Mulder, L.J.M.; Van Roon, A.; Duschek, S. (2013). The utility of low frequency heart rate variability as an index of sympathetic cardiac tone: A review with emphasis on a reanalysis of previous Studies. *Psychophysiology*, 50, 477–487.
- Rimmele, U.; Seiler, R.; Martí, B.; Wirtz, P.H.; Ehlert, U.; Heinrichs, M. (2009). The level of physical activity affects adrenal and cardiovascular reactivity to psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 190-198.
- Rimoldi, O.; Furlan, R.; Pagani, M.R.; Piazza, S.; Guazzi, M.; Pagani, M.; Malliani, A. (1992). Analysis of neural mechanisms accompanying different intensities of dynamic exercise. *Chest*, 101(5), s226-s230.
- Rodas, G.; Pedret, C.; Ramos, J.; Capdevila, Ll. (2008). Variabilidad de la frecuencia cardiaca: concepto, medidas y relación con aspectos clínicos (I). *Archivos de medicina del deporte*, 123, 41-47.

- Rojo, J.M. (1997). *Medicina del deporte*. Sevilla: Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones.
- Routledge, F.S.; Campbell, T.S.; McFetridge-Durdle, J.A.; Bacon, S.L. (2010). Improvements in heart rate variability with exercise therapy. *Canadian Journal of Cardiology*, 26(6), 303-312.
- Russo-Neustadt, A.; Ha, T.; Ramirez, R.; Kessler, J.P. (2001). Physical activity-antidepressant treatment combination: impact on brain-derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. *Behavioural Brain Research*, 120, 87-95.

S

- Sabariego, M.; Gómez, M.J.; Morón, I.; Torres, C.; Fernández-Teruel, A.; Tobeña, A.;...Esteban, F.J. (2011). Differential gene expression between inbred Roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats. *Neuroscience Letters*, 504, 265-270.
- Saha, S. (2005). Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32, 450-456.
- Salem, S.; Hussain, M.M.; Majeed, S.M.I.; Khan, M.A. (2012). Gender differences of heart rate variability in healthy volunteers. *J Pak Med Assoc*, 62(5), 422-425.
- Salim, S.; Sarraj, N.; Taneja, M.; Saha, K.; Tejeda-Simon, M.V.; Chugh, G. (2010). Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behavioural Brain Research*, 208, 545-552.
- Sampey, B.P.; Vanhoose, A.M.; Winfield, H.M.; Freerman, A.J.; Muehlbauer, M.J.; Fueger, P.T.;... Makowski, L. (2011). Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity*, 19(6), 1109-1117.
- Sanches, I.C.; Sartori, M., Jorge, L.; Irigoyen, M.C.; De Angelis, K. (2009). Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. *Braz J Med Biol Res.*, 42(10), 942-948.
- Sandercock, G.R.H.; Bromley, P.D.; Brodie, D.A. (2005). Effects of Exercise on Heart Rate Variability: Inferences from Meta-Analysis. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 37(3), 433-439.
- Sarga, L.; Hart, N.; Koch, L.G.; Britton, S.L.; Hajas, G.; Boldogh, I.;...Radak, Z. (2013). Aerobic endurance capacity affects spatial memory and sirt1 is a potent modulator of 8-oxoguanine repair. *Neuroscience*, 252, 326-336.

- Sasse, S.K.; Greenwood, B.N.; Masini, C.; Nyhuis, T.; Fleshner, M.; Day, H.E.D.; *et al.* (2008). Chronic voluntary wheel running facilitates corticosterone response habituation to repeated audiogenic stress exposure in male rats. *Stress*, *11*(6), 425-437.
- Scarpace, E.T.; Matheny, M.; Strehler, K.Y.E.; Shapiro, A.; Cheng, K.Y.; Tümer, N.;...Scarpace, P.J. (2012). Simultaneous introduction of a novel high fat diet and wheel running induces anorexia. *Physiology & Behavior*, *105*, 909-914.
- Scharfman, H.E.; Hen, R. (2007). Is More Neurogenesis Always Better? *Science*, *315*, 336-338.
- Schroeder, E.B.; Liao, D.; Chambless, L.E.; Prineas, R.J.; Evans, G.W.; Heiss, G. (2003). Hypertension, Blood Pressure, and Heart Rate Variability: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Hypertension*, *42*, 1106-1111.
- Seifert, T.; Brassard, P.; Wissenberg, M.; Rasmussen, P.; Nordby, P.; Stallknecht, B.;...Secher, N.H. (2010). Endurance training enhances BDNF release from the human brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, *298*, R372-R377.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, *138*, 32.
- Shimada, H.; Hamakawa, M.; Ishida, A.; Tamakoshi, K.; Nakashima, H.; Ishida, K. (2013). Low-speed treadmill running exercise improves memory function after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Behavioural Brain Research*, *243*, 21-27.
- Silva, G.J.J.; Ushizima, M.R.; Lessa, P.S.; Cardoso, L.; Drager, L.F.; Atala, M.M.;...Krieger, E.M. (2009). Critical analysis of autoregressive and fast Fourier transform markers of cardiovascular variability in rats and humans. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *42*, 386-396.
- Silveira, H.; Moraes, H.; Oliveira, N.; Coutinho, E.S.F.; Laks, J.; Deslandes, A. (2013). Physical Exercise and Clinically Depressed Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuropsychobiology*, *67*, 61-68.
- Sjoberg, N.; Brinkworth, G.D.; Wycherley, T.P.; Noakes, M.; Saint, D.A. (2011). Moderate weight loss improves heart rate variability in overweight and obese adults with type 2 diabetes. *J Appl Physiol.*, *110*, 1060-1064.
- Slining, M.M.; Mathias, K.C.; Popkin, B.M. (2013). Trends in Food and Beverage Sources among US Children and Adolescents: 1989-2010. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, *113*(12), 1683-1694.

- Sloan, R.P.; Shapiro, P.A.; DeMeersman, R.E.; Bagiella, E.; Brondolo, E.N.; McKinley, P.S.;...Myers, M.M. (2009). The Effect of Aerobic Training and Cardiac Autonomic Regulation in Young Adults. *American Journal of Public Health*, 99(5), 921-928.
- Solomon, M.B.; Herman, J.P. (2009). Sex differences in psychopathology: Of gonads, adrenals and mental illness. *Physiology & Behavior*, 97, 250–258.
- South, T.; Westbrook, F, Morris, M.J. (2012). Neurological and stress related effects of shifting obese rats from a palatable diet to chow and lean rats from chow to a palatable diet. *Physiology & Behavior*, 105, 1052–1057.
- Soya, H.; Nakamura, T.; Deocaris, C.C.; Kimpara, A.; Iimura, M.; Fujikawa, T.;...Saito, T. (2007). BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, 961–967.
- Stark, H.; Bischof, A.; Wagner, T.; Scheich, H. (2001). Activation of the dopaminergic system of medial prefrontal cortex of gerbils during formation of relevant associations for the avoidance strategy in the shuttle-box. *Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol. Psychiat.*, 25, 409-425.
- Stranahan, A.M.; Khalil, D.; Gould, E. (2006). Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 9(4), 526-533.
- Stranahan, A.M.; Lee, K.; Mattson, M.P. (2008). Central Mechanisms of HPA Axis Regulation by Voluntary Exercise. *Neuromol Med.*, 10, 118–127.
- Strasser, B. (2013). Physical activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1281, 141–159.
- Swain, R.A.; Harris, A.B.; Wiener, E.C.; Dutka, M.V.; Morris, H.D.; Theien, B.E.;... Greenough, W.T. (2003). Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience*, 117, 1037–1046.
- Sztajzel, J. (2004). Heart rate variability: a noninvasive electrocardiographic method to measure the autonomic nervous system. *Swiss Med Wkly*, 134, 514-522.

T

- Takeda, T. (2009). Senescence-Accelerated Mouse (SAM) with Special References to Neurodegeneration Models, SAMP8 and SAMP10 Mice. *Neurochem Res.*, 34, 639–659.

- Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996). Heart Rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *European Heart Journal*, 17, 354–381.
- Teegarden, S.L.; Bale, T.L. (2007). Decreases in Dietary Preference Produce Increased Emotionality and Risk for Dietary Relapse. *Biol Psychiatry*, 61, 1021–1029.
- ter Horst, J.P.; de Kloet, E.R.; Schächinger, H.; Oitzl, M.S. (2012). Relevance of Stress and Female Sex Hormones for Emotion and Cognition. *Cell Mol Neurobiol.*, 32, 725–735.
- Tharp, G.D.; Buuck, R.J. (1974). Adrenal adaptation to chronic exercise. *Journal of Applied Physiology*, 37(5), 720-722.
- Thayer, J.F.; Ahs, F.; Fredrikson, M.; Sollers III, J.J.; Wager, T.D. (2012). A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: Implications for heart rate variability as a marker of stress and health. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 747–756.
- Thayer, J.F.; Fischer, J.E. (2013). Heart rate variability, overnight urinary norepinephrine, and plasma cholesterol in apparently healthy human adults. *International Journal of Cardiology*, 162, 240–244.
- Thayer, J.F.; Lane, R.D. (2009). Claude Bernard and the heart-brain connection: Further elaboration of a model of neurovisceral integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33, 81–88.
- Thayer, J.F.; Yamamoto, S.S.; Brosschot, J.F. (2010). The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *International Journal of Cardiology*, 141, 122–131.
- Thompson, D.; Karpe, F.; Lafontan, M.; Frayn, K. (2012). Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiol Rev.*, 92, 157–191.
- Toledo, E.M.; Colombres, M.; Inestrosa, N.C. (2008). Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. *Progress in Neurobiology*, 86, 281–296.
- Tonissaar, M.; Herm, L.; Eller, M.; Koiv, K.; Rinken, A.; Harro, J. (2008). Rats with high or low sociability are differently affected by chronic variable stress. *Neuroscience*, 152, 867–876.
- Trezza, V.; Baarendse, P.J.J.; Vanderschuren, L.J.M.J. (2010). The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(10), 463-469.

- Trombini, M.; Hulshof, H.J.; Graiani, G.; Carnevali, L.; Meerlo, P.; Quaini, F.;...Sgoifo, A. (2012). Early maternal separation has mild effects on cardiac autonomic balance and heart structure in adult male rats. *Stress*, 15(4), 457-470.

U

- Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 397-409.
- Underwood, M.; Lamb, S.E.; Eldridge, S.; Sheenan, B.; Slowter, A-M; Spencer, A.;...Taylor, S.J.C. (2013). Exercise for depression in elderly residents of care homes: a cluster-randomised controlled trial. *The Lancet*, 382, 41-49.
- Unger, R.H. (1998). How Obesity Causes Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Trends Endocrinol Metab.*, 7, 276-282.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2013). *World Population Ageing 2013*. ST/ESA/SER.A/348.
- Uysal, N.; Tugyan, K.; Kayatekin, B.M.; Acikgoz, O.; Bagriyanik, H.A.; Gonenc, S.;...Semin, I. (2005). The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neuroscience Letters*, 383, 241-245.

V

- Valzelli, L. (1973). The "Isolation Syndrome" in mice. *Psychopharmacologia*, 31, 305-320.
- van Praag, H. (2009). Exercise and the brain: something to chew on. *Trends in Neurosciences*, 32(5), 283-290.
- van Vliet, M.; Heymans, M.W.; von Rosenstiel, I.A.; Brandjes, D.P.M.; Beijnen, J.H.; Diamant, M. (2011). Cardiometabolic risk variables in overweight and obese children: a worldwide comparison. *Cardiovasc Diabetol.*, 10, 106-114.
- Vanderlei, L.C.M.; Pastre, C.M.; Hoshi, R.A.; Carvalho, T.D.; Godoy, M.F. (2009). Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 24(2), 205-217.
- Vaynman, S.; Ying, Z.; Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*, 20, 2580-2590.
- Villarroya, F. (2012). Irisin, Turning Up the Heat. *Cell Metabolism*, 15, 277-278.

- Voelcker-Rehage, C.; Godde, B.; Staudinger, U.M. (2012). Physical and motor fitness are both related to cognition in old age. *European Journal of Neuroscience*, 31, 167–176.
- Volkow, N.D.; Wise, R.A. (2005). How can drug addiction help us understand obesity? *Nature Neuroscience*, 8(5), 555-560.
- von Borell, E.; Langbein, J.; Després, G.; Hansen, S.; Leterrier, C.; Marchant-Forde, J.;...Veissier, I. (2007). Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals — A review. *Physiology & Behavior*, 92, 293–316.
- Voss, M.W.; Vivar, C.; Kramer, A.F.; van Praag, H. (2013). Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends in Cognitive Sciences*, 17(10), 525-544.

W

- Wadden, T.A.; Webb, V.L.; Moran, C.H.; Bailer, B.A. (2012). Lifestyle Modification for Obesity. New Developments in Diet, Physical Activity, and Behavior Therapy. *Circulation*, 125, 1157-1170.
- Watanabe, T.; Morimoto, A.; Sakata, Y.; Tan, N.; Morimoto, K.; Murakami, N. (1992). Running training attenuates the ACTH responses in rats to swimming and cage-switch stress. *Journal of Applied Physiology*, 73(6), 2452-2456.
- Watanabe, T.; Morimoto, A.; Sakata, Y.; Wada, M.; Murakami, N. (1991). The effect of chronic exercise on the pituitary-adrenocortical response in conscious rats. *Journal of Physiology*, 439, 691-699.
- Weisdorf, J.L. (2005). *From Foraging to Farming: Explaining the Neolithic Revolution*. Discussion Papers: Institute of Economics, University of Copenhagen.
- Weiss, I.C.; Pryce, C.R.; Jongen-Rêlo, A.L.; Nanz-Bahr, N.I.; Feldon, J. (2004). Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research*, 152, 279–295.
- Weuve, J.; Kang, J.H.; Manson, J.E.; Breteler, M.M.B.; Ware, J.H.; Grodstein, F. (2004). Physical Activity, Including Walking, and Cognitive Function in Older Women. *JAMA*, 292(12), 1454-1461.
- Willner, P. (1991). Part I: Introduction. Behavioural models in psychopharmacology. En P.Willner (Eds.). *Behavioural Models in Psychopharmacology* (pp 3-18). Cambridge: University Press.
- Woolf-May, K. (2008). *Prescripción de ejercicio: fundamentos fisiológicos*. Barcelona: Elsevier-Masson.

Y

- Yanagita, S.; Amemiya, S.; Suzuki, S.; Kita, I. (2007). Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. *Life Sciences*, 80, 356–363.

Z

- Zeeni, N.; Daher, C.; Fromentin, G.; Tome, D.; Darcel, N.; Chaumontet, C. (2013). A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress*, 16(2), 211–219.
- Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425–432.

Annex 1

Dades cardiovasculars a llarg termini en mascles i femelles

Es van mesurar les variables cardiovasculars a rates femelles entrenades (TM, n=6) i control-manipulades (CON, n=6) durant 36 setmanes d'exercici moderat (12m/min, 30min) quan tenien 12 mesos d'edat. El registres es realitzaren cada quatre setmanes i en cap de setmana per evitar interferir amb el règim d'entrenament. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 17. Es van seleccionar les mesures diürnes, que generen menys variables estranyes, atès que els animals estan dormint. A més, en tots dos casos (mascles i femelles) es van eliminar tots els registres (els intervals RR) que presentaven algun percentatge d'artefactes, a diferència de en el Lalanza *et al.* (en revisió a *Spots*) que es varen acceptar fins a un 5%. En la Figura 17A es mostren els batecs per minut. No hi ha diferències significatives entre grups, ni comparats amb la línia base. En la Figura 17B es mostra la variabilitat de la freqüència cardíaca mesurada amb la desviació típica dels pics RR (SDRR). Aplicant un GLM s'han trobat diferències significatives en el factor intrasubjecte (sessió) [$F(8, 80)=3,768, p=0.001$] i intersubjecte (grup) [$F(1, 10)=6,150, p=0.033$], però no en la seva interacció [$F(8, 0)=1.647, p=0.125$]. L'anàlisi sessió a sessió ens mostra una diferència significativa entre el grup CON i el TM a les setmanes 20, 24, 28 i 36 d'entrenament [$F(1, 11)>6.173, p<0.032$], sent el grup CON el que mostra una major variabilitat. Finalment, la prova T de mostres relacionades respecte a la línia base ens indica un efecte significatiu de la manipulació (CON) a les setmanes 16, 24 i 28 ($p<0.044$), incrementant la variabilitat; i un efecte de l'exercici a la setmana 28 ($p=0.05$), també d'increment de la variabilitat. Per acabar, en la Figura 17C, es mostra la proporció d'activació del sistema nerviós simpàtic i el parasimpàtic. Trobem una diferència marginal entre els dos grups en la setmana 28 (TM>CON, $p=0.039$) i un efecte de la manipulació a les setmanes 20 i 36 (vs. línia base, $p<0.042$).

Pel que fa als mascles (n=3-7), es van implantar els transmissors a rates de 17 mesos d'edat aprox., quan ja portaven 48 setmanes

d'entrenament. Es van servir rates tan grans perquè ja havíem estudiat els efectes de l'exercici en mascles joves i, d'aquesta manera, també l'estudiem en població envellida. Es va fer una mesura basal a la setmana de l'operació, a les 4 setmanes de tornar a iniciar l'exercici (6 setmanes des de l'operació) i a les 8 setmanes de tornar a iniciar l'exercici (10 setmanes des de l'operació). Igual que abans, es presenten només les dades de fase de llum de les tres variables principals: BPM (Figura 18A), SDRR (Figura 18B) i LH/HF (Figura 18C). L'única diferència és que els registres es feien durant la setmana, no els caps de setmana, per evitar el solapament amb les recuperacions quirúrgiques. Respecte als BPM, aplicant un GLM, hi ha una tendència a la significació del factor intrasubjecte (sessió) [$F(2, 18)=2.942, p=0.078$]. Si els analitzem els resultats sessió a sessió, tornem a trobar una altra tendència en la línia base [$F(2, 19)=2.993, p=0.077$]. L'anàlisi *post hoc* (Duncan) indica que significativament ($p<0.05$) el grup SED fa més batecs que el CON i el TM. Respecte a la SDRR, trobem una interacció significativa en el GLM entre la sessió i el grup [$F(4, 16)=3.327, p=0.037$] i un efecte significatiu de la sessió [$F(2, 16)=4.240, p=0.033$]. Al descompondre la interacció, trobem una diferència significativa en el grup SED. T-Test ($p<0.05$): BSL < 4set.; BSL < 8set.; 4set. > 8set. Finalment, no es van trobar diferències significatives entre la proporció de LF i HF.

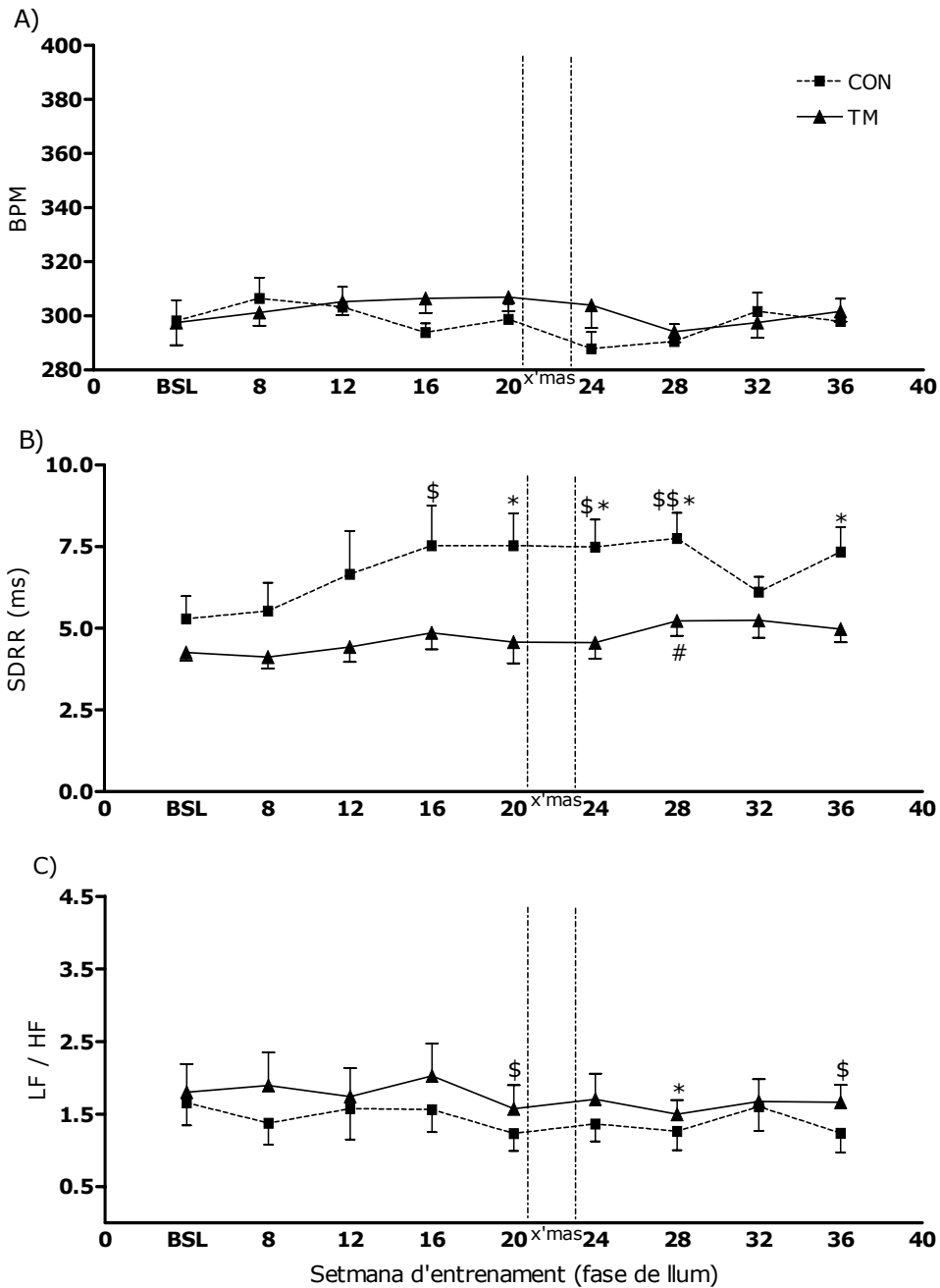


Figura 17. Mitjana \pm Error Estàndard dels batecs per minut (BPM) (A), la desviació estàndard dels pics RR (SDRR) (B), i la proporció de baixa i alta freqüència de l'espectre (LF/HF) (C); per 36 setmanes d'entrenament en fase de llum (10 a 18h). TM: grup de rates femelles entrenades al treadmill (n=6), CON: grup de rates femelles manipulades com les TM (n=6). * $p < 0.05$ vs. TM (Oneway); \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ vs. Basal (BSL) (T-Test, CON); # $p < 0.05$ vs. Basal (BSL) (T-Test, TM).

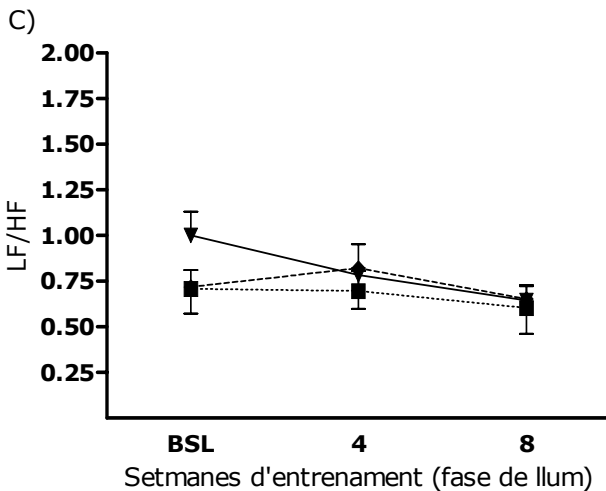
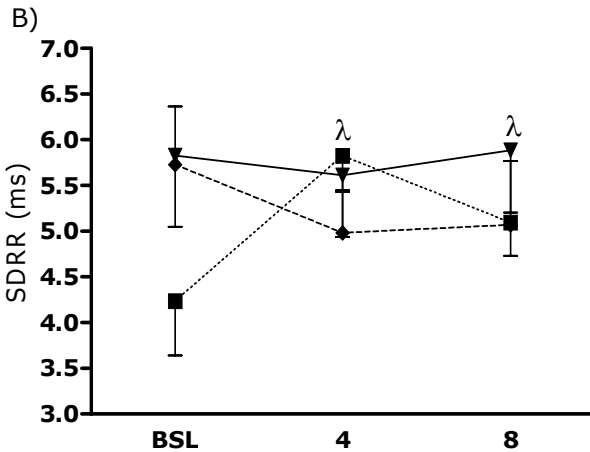
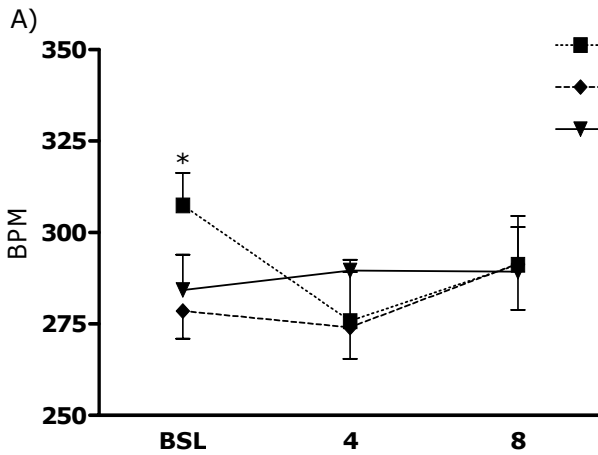


Figura 18. Mitjana \pm Error Estàndard dels batecs per minut (BPM) (A), la desviació estàndard dels pics RR (SDRR) (B), i la proporció de baixa i alta freqüència de l'espectre (LF/HF) (C); per 48 setmanes d'entrenament en fase de llum (10 a 18h) (Línia Base, BSL) i al cap de 4 i 8 setmanes d'entrenament. TM: grup de rates mascles entrenades al treadmill (n=3-7), CON: grup de rates mascles manipulades com les TM (n=3-7), SED: grup de rates mascles que sempre romanien a la seva gàbia (n=3-7). * $p < 0.05$ vs. SED (Duncan, *post hoc*); $\lambda p < 0.05$ vs. BSL (T-Test, SED).

Annex 2

Dades Neuroendocrines en femelles

Rates femelles (n=29, les mateixes que a Lanza et al., sotmés a Physiology & Behavior) van ser entrenades durant 32 setmanes a 12m/min. Es va analitzar l'activació de l'eix HPA immediatament després de l'exposició a la novetat (situació d'estrès intermedi), com ho és el *Hole Board* i, immediatament després d'una situació molt aversiva, com és la gàbia *Shuttle Box* (en ACTH). Com es pot veure a la Figura 19, no hi ha diferències entre els tres grups (SED, CON i TM), ni en ACTH, ni corticosterona post *Hole Board* i *Shuttle Box*. Tampoc en els registres basals (resultats no mostrats). Dades presentades al congrés: "4th Scientific Conference of the Institut de Neurociències, Integrative Neurobiology", Barcelona.

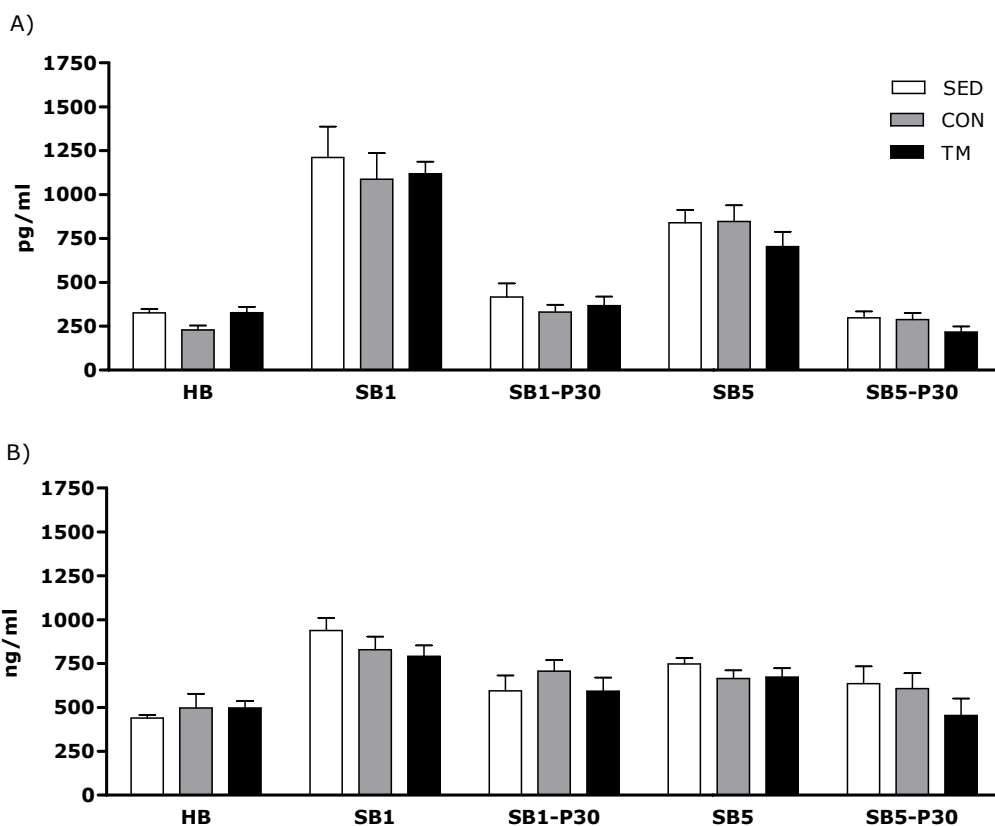


Fig. 19. Mitjana \pm Error Estàndard del nivell d'ACTH (A) i corticosterona (B) segregat per rates femelles, sedentàries (SED), controls (CON) i exercitades durant 32 setmanes (TM) immediatament després del *Hole Board* (HB), la primera sessió de *Shuttle Box* (SB1) i la cinquena i última (SB5), i després de 30min (P30) de la SB1 i SB5. No es varen trobar efectes significatius.

Annex 3

Abstract acceptat per presentar un pòster al congrés de la FENS (Federation of European Neuroscience Societies) 2014 (Milano, Italia) sobre Diferències Individuals que predisposen a córrer.

FENS-3526

F3. Motivation and emotion

INDIVIDUAL DIFFERENCES PREDISPOSING TO RUN

Nowadays aerobic exercise is one of the most recommended activities to prevent cardiovascular diseases, obesity and cognitive decline. However, not everybody enjoy, or even tolerate, to practice exercise. Few studies have been addressed to undercover the individual differences that predispose to practice exercise. Herein, we tested adult male rats in a battery of test including the Hole-Board (HB), Elevated Plus Maze (EPM), Circular Corridor (CC), Forced Swimming Test (FST), Home Cage Activity (HCA) and Shuttle Box (SB); and assessed HPA activity at baseline and after HB and SB as stressful environments. After that testing, rats run in a treadmill during four sessions of 15min at different intensities spaced 24h. The performance in the treadmill was analyzed over different behaviors. Our results indicated that running in the treadmill is influenced by two different variables: physical training and the motivation to run. The former is related with the activity in the closed arms of the EPM and increased levels of HPA hormones in the morning. The latter is related with increased exploration in the HB, and higher activity of HPA in the morning. Therefore, it seems that increased exploration, decreased anxiety-like behavior and increased HPA-axis basal activity is related with good predisposition to run. On the other hand, high impulsivity and low habituation is related to poor performance in the treadmill. These results besides supporting a procedure to detect runner animals and avoiding to apply motivational footshock, suggest that the predisposition to practice exercise is influenced by personality traits and motivation.

Acknowledges: This works was supported by Dirección General de Investigación (PSI2011-29807-C02-01). J.F.L. was supported by a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2011).

Keywords: treadmill, exercise, anxiety, stress, behavior, personality, individual differences, rats.

Notes:

