

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
Programa de Doctorado en Fisiología



El papel del ejercicio físico en la inducción de BDNF y sus vías de señalización en el sistema nervioso central. Aplicación neurobiológica en modelos sanos y terapéutica en la enfermedad de Alzheimer.

TESIS DOCTORAL presentada por
HELIOS PAREJA GALEANO

Dirigida por:

Dr. José Viña Ribes

Dra. Mari Carmen Gómez Cabrera

Dra. Gloria Olaso González

Valencia, 2014

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
SCHOOL OF MEDICINE AND ODONTOLOGY
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY
Doctorate Program in Physiology



**Effects of physical exercise on BDNF and its signaling in the
central nervous system. Neurobiological applications in
healthy and Alzheimer´s models**

DOCTORAL THESIS presented by
HELIOS PAREJA GALEANO

Supervised by:

Dr. José Viña Ribes

Dr. Mari Carmen Gómez Cabrera

Dr. Gloria Olaso González

Valencia, 2014

Prof. D. José Viña Ribes, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. Dña. Mari Carmen Gómez Cabrera, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Dra. Dña. Gloria Olaso González, Doctora en Química por la Universidad de Valencia y Técnico Superior de Investigación en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que D. **Helios Pareja Galeano**, Licenciado en Ciencias de la Actividad Física y del Deporte por la Universidad Autónoma de Madrid y Máster en Fisiología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección para la obtención del título de Doctor la presente Tesis Doctoral titulada:

“El papel del ejercicio físico en la inducción de BDNF y sus vías de señalización en el sistema nervioso central. Aplicación neurobiológica en modelos sanos y terapéutica en la enfermedad de Alzheimer”

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, 2014

Fdo. Don José Viña Ribes

Fdo. Dña. Mari Carmen
Gómez Cabrera

Fdo. Dña. Gloria
Olaso González

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido llevada a cabo gracias a la financiación obtenida de la Beca de Formación de Profesorado Universitario (AP2009-4755) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (2010-2014).

A MIS PADRES

A MI HERMANA

A SARA

AGRADECIMIENTOS

Estos agradecimientos no sólo hacen referencia al apoyo recibido para la realización de esta Tesis Doctoral, sino también a aquellas personas que han participado, en lo profesional y en lo personal, en mi exordio en el mundo de la investigación y al sustancial pedazo de vida que he dejado en Valencia. Por ello, agradecer...

A José Viña, director de la presente Tesis Doctoral y del equipo de investigación. Agradecer su receptividad a mi incorporación sin apenas conocerme, su confianza en mis ideas, su inestimable tutoría en estos años y todo lo que he aprendido de él sobre investigación, ciencia, música y otras muchas otras esferas.

A Mari Carmen, tutora y consejera. Por ayudarme a convertir las ideas en ciencia y la ciencia en algo comprensible; por soportar conmigo momentos de altibajos y por enseñarme a valorar nuestro background, enseñándome que se pueden alcanzar muchas metas que en principio no parecían diseñadas para uno mismo.

A Gloria Olaso, tutora y seguidora. Por estos años de receptividad y ayuda. Por recibirme siempre con una sonrisa y por tu incondicional ayuda en estos años.

A Fabián, que pasó de compañero a consejero, a mentor y a amigo. Me has enseñado que los límites los pone uno mismo y con mucho empeño y esfuerzo pueden incluso desaparecer. Gracias a ti y a Carme por tantos momentos.

A Thomas, compañero de tantas experiencias y alegrías y sobre todo amigo. Gracias por tu amistad en estos años que sólo espero se perpetúe pese a la distancia.

A Mar, consejera y amiga. Por tantos momentos de café, sinceridad y apoyo personal. No te haces una idea de cuánto me han ayudado.

A Juan Gambini, por tus inestimables enseñanzas de bancada. Por tantos momentos de catarsis y de apoyo.

A Esther, por tantas y tantas conversaciones profundas y también tontas. Por tu apoyo, tu cercanía y tu amistad.

A Chelo y Ana, por vuestra siempre disponible ayuda y por tantos momentos. A Bea y Rebeca, compañeras de fatigas, de éxitos y de iniciación al mundo de la investigación. A Vladimir, por su disposición siempre docente a ayudar. A Helena y Andrea, por vuestra ayuda en el desarrollo de esta tesis siempre. Siempre receptivas y desinteresadas. A Mariya, por hacer del ambiente un lugar mejor. Por las risas y los momentos, por tu inapreciable ayuda. A Vicent, por tantas experiencias fuera y dentro del laboratorio. Por tantas enseñanzas. A Marta, compañera de escritorio y desfallecimiento mientras este trabajo cogía forma. Ha sido un placer. A Kheira, por los buenos momentos, serenos al principio y duros al final. A Consuelo. A Tanja, Lucía, Cristina, Paloma y Frederic, nuevos y prometedores fichajes.

A las veterinarias que tanto me han ayudado, Ana Díaz y Inma Noguera. Al CIBERER, encabezado por Federico Pallardó quien me abrió las puertas al que ha sido mi lugar de formación y trabajo durante estos años. A José Luis, por tu siempre receptiva ayuda. A Isabel, Ana, Santi y Marta. A Eva, Mari, Elena y Marilyn por vuestra nunca suficientemente agradecida ayuda en estos años. A los que pasaron y se fueron, Analissa, Mika y Nuno.

A Coral Sanfeliu y su grupo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB), CSIC, IDIBAPS. A Lydia Giménez Llort, Rosa Cristófol y Yoelvis García. Gracias por vuestra diligencia y saber hacer.

Thanks to Fernando Gomez-Pinilla and his Research group, “NeuroLife”, at the University of California Los Angeles (UCLA). Thanks to Lily Ying, Rahul Agrawal, Ethika Tyagi, Yumei Zhuang and Iguo Wu for your help. Anybody would be able to learn about BDNF just staying close to you through *osmosis*.

Al grupo de Alejandro Lucía de la Universidad Europea de Madrid y sus extensas colaboraciones. A Carmen, Alfredo, Javier, Elena, Jorge, Nuria y Álex. Gracias por recibirme y apoyarme desde el minuto uno. Por vuestra camaradería, hospitalidad, esfuerzo e ilusión ¡Haremos grandes cosas!

A Cecilia Martínez Costa y Mari Ángeles Montal del Hospital Clínico de Valencia, a Carmen Jovaní del Hospital de la Plana y a José Cortell del Hospital la Fe, por vuestra ayuda en el desarrollo de esta Tesis siempre con disposición y diligencia. A Rafa Alís.

A personas ajenas a esta universidad que sin embargo han colaborado a través de su apoyo, consejo y entendimiento, Juanjo Parra y Pedro García. Por vuestra cercanía. A Vicente Martínez de Haro de la Universidad Autónoma de Madrid, por iniciarme en el mundo de la investigación. Por tantas enseñanzas y consejos. Por tu buen hacer e ilusión por el potencial del ejercicio físico en la salud.

A mi abuela, por tu apoyo, interés y cariño. Por tu comprensión y cercanía en tantos momentos de lejanía.

A mis padres y a mi hermana, por apoyarme incondicionalmente desde la distancia en todas las esferas posibles y en alguna más que han inventado. Por comprender y compartir mi aventura fuera de Madrid, de casa. A mi padre, por enseñarme y ayudarme a creer en mi potencial y tirar hacia adelante en las situaciones difíciles. A mi madre, por todo lo que me has enseñado sobre ser buena persona, por cuidarme tanto y por ser incondicional. A mi hermana, de la que sigo aprendiendo día a día, por tu comprensión, apoyo y conexión. Vuelvo. Os quiero.

A Sara, mi burbuja de oxígeno en los momentos difíciles e inmejorable compañera en los buenos momentos. Gracias por absolutamente todo: por mantenerme a flote, apoyarme, entenderme, criticarme y fundamentalmente por estar.

INDEX / ÍNDICES

GENERAL INDEX / ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT / RESUMEN 2

I. INTRODUCCIÓN 13

1. FACTORES NEUOTRÓFICOS 15

 1.1. Teoría neurotrófica 15

 1.2. Tipos de factores neurotróficos 17

 1.2.1. IGF-1 19

 1.2.2. BDNF 22

 1.2.2.1. 7,8-dihidroxi flavona como mimético de BDNF 25

 1.2.3. Otros factores neurotróficos 27

 1.3. Vías de señalización de las neurotrofinas 30

2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER 35

 2.1. Prevalencia de la enfermedad de Alzheimer 36

 2.2. Sintomatología de la enfermedad de Alzheimer 37

 2.3. Factores de riesgo e hipótesis etiológica de la enfermedad de Alzheimer 38

 2.4. Climaterio femenino y enfermedad de Alzheimer 40

 2.5. Mecanismos moleculares involucrados en la enfermedad de Alzheimer
 41

 2.5.1. Placas seniles 41

 2.5.2. Ovillos neurofibrilares 45

 2.5.3. Estrés oxidativo 46

 2.5.3.1. Radicales libres 47

 2.5.3.2. Daño oxidativo 50

 2.5.3.3. Defensa antioxidante 52

 2.5.4. Disfunción mitocondrial 53

 2.5.5. Factores neurotróficos en la enfermedad de Alzheimer 54

2.5.6.	Otras alteraciones anatomofisiológicas propias de la enfermedad de Alzheimer	57
2.6.	Modelos murinos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer	57
2.6.1.	Ratón doble transgénico para la enfermedad de Alzheimer	58
2.6.2.	Ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer.....	59
2.7.	Estrategias terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer.....	60
3.	NEUROBIOLOGÍA DEL EJERCICIO FÍSICO	61
3.1.	Ejercicio físico como modulador de factores neurotróficos	65
3.2.	Ejercicio físico en la enfermedad de Alzheimer.....	70
3.3.	Medición de BDNF circulante en estudios que implementan ejercicio físico	73
II.	OBJECTIVES / OBJETIVOS.....	77
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	81
1.	MATERIALES.....	83
1.1.	Comités éticos.....	83
1.2.	Muestra humana.	83
1.2.1.	Objetivo 1.....	83
1.2.2.	Objetivo 2.....	84
1.3.	Muestra animal.....	84
1.3.1.	Objetivo 3.....	84
1.3.2.	Objetivo 4.....	86
1.3.3.	Objetivo 5.....	87
1.4.	Aparatos.....	88
1.5.	Reactivos.	90
2.	MÉTODOS.....	93
2.1.	Diseños experimentales.....	93
2.1.1.	Objetivo 1.....	93
2.1.2.	Objetivo 2.....	95
2.1.3.	Objetivo 3.....	97

2.1.4.	Objetivo 4.	99
2.1.5.	Objetivo 5.	101
2.2.	Tratamientos y condiciones.	102
2.2.1.	Protocolo de ejercicio físico implementado en humanos (Objetivo 2). 102	
2.2.2.	Protocolo de entrenamiento físico implementado en roedores.	102
2.2.2.1.	Entrenamiento físico implementado en el Objetivo 3.	102
2.2.2.2.	Entrenamiento físico implementado en el Objetivo 4.	103
2.2.2.3.	Entrenamiento físico implementado en el Objetivo 5.	103
2.2.3.	Ovariectomía y cirugía simulada.	104
2.2.3.1.	Anestesia.	104
2.2.3.2.	Cirugía.	104
2.2.4.	Tratamiento con 7,8-dihidroxiavona.	105
2.3.	Evaluaciones no invasivas en humanos.	105
2.3.1.	Calorimetría / Acelerometría en humanos.	105
2.3.1.1.	Procedimiento.	106
2.3.1.2.	Cálculos.	106
2.3.2.	Cuestionario internacional de actividad física (IPAQ-S).	106
2.3.2.1.	Procedimiento.	107
2.3.2.2.	Cálculos.	107
2.3.3.	Antropometría en humanos.	108
2.3.3.1.	Procedimiento.	108
2.3.3.2.	Cálculos.	109
2.4.	Evaluaciones <i>in vivo</i> de los roedores.	109
2.4.1.	Test de fuerza de agarre.	109
2.4.1.1.	Procedimiento.	110
2.4.1.2.	Cálculos.	110
2.4.2.	Test de velocidad aeróbica máxima.	111
2.4.2.1.	Procedimiento.	111

2.4.2.2. Cálculos.....	112
2.4.3. Test de campo abierto.....	113
2.4.3.1. Procedimiento.....	114
2.4.3.2. Cálculos.....	115
2.4.4. Test de las esquinas.....	115
2.4.4.1. Procedimiento.....	115
2.4.4.2. Cálculos.....	115
2.4.5. Test de reconocimiento de objetos.....	116
2.4.5.1. Procedimiento.....	117
2.4.5.2. Cálculos.....	117
2.4.6. Tomografía por emisión de positrones (PET).....	117
2.4.6.1. Reactivos.....	120
2.4.6.2. Procedimiento.....	120
2.4.6.3. Cálculos.....	121
2.5. Obtención de muestras biológicas.....	122
2.5.1. Extracción de sangre en humanos.....	122
2.5.2. Sacrificio de los animales.....	123
2.5.2.1. Técnicas eutanásicas.....	123
2.5.2.2. Obtención de sangre y órganos.....	123
2.6. Procesamiento de la sangre y los tejidos.....	126
2.6.1. Procesamiento de la sangre humana.....	126
2.6.2. Procesamiento de la sangre murina.....	128
2.6.3. Extracción de proteínas a partir del tejido cerebral.....	129
2.6.3.1. Procedimiento.....	129
2.6.3.2. Cálculos.....	133
2.6.4. Cuantificación de la concentración de proteínas por el método Lowry.	133
2.6.4.1. Fundamento.....	133
2.6.4.2. Reactivos.....	134

2.6.4.3.	Procedimiento.....	135
2.6.4.4.	Cálculos.....	135
2.6.5.	Cuantificación de la concentración de proteínas por el método Bradford. 136	
2.6.5.1.	Fundamento.....	136
2.6.5.2.	Reactivos.....	137
2.6.5.3.	Procedimiento.....	137
2.6.5.4.	Cálculos.....	137
2.6.6.	Aislamiento del ARN a partir del tejido cerebral.....	137
2.6.6.1.	Fundamento.....	137
2.6.6.2.	Reactivos.....	138
2.6.6.3.	Procedimiento.....	138
2.6.6.4.	Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN. 140	
2.7.	Determinaciones bioquímicas en sangre y tejidos humanos y murinos. 140	
2.7.1.	Determinaciones hematológicas automatizadas.....	140
2.7.2.	Cálculo de la hemoconcentración.....	141
2.7.2.1.	Procedimiento.....	141
2.7.2.2.	Cálculos.....	142
2.7.3.	Determinación de lactato en humanos.....	142
2.7.3.1.	Procedimiento.....	143
2.7.4.	Estudio de la glucemia y la colesterolemia en ratones.....	144
2.7.4.1.	Procedimiento.....	144
2.7.5.	Determinación de IGF-1 por ensayo inmunométrico quimioluminiscente marcado con enzima.....	144
2.7.5.1.	Fundamento.....	144
2.7.5.2.	Procedimiento.....	145
2.7.5.3.	Cálculos.....	145
2.7.6.	Determinación de BDNF por ELISA.....	146

2.7.6.1.	Fundamento.	146
2.7.6.2.	Reactivos.	147
2.7.6.3.	Procedimiento.	148
2.7.6.4.	Cálculos.	150
2.7.7.	Determinación de β -amiloide (1-40) y (1-42) por ELISA.	150
2.7.7.1.	Fundamento.	150
2.7.7.2.	Procedimiento.	151
2.7.7.3.	Cálculos.	153
2.7.8.	Determinación de los niveles de malondialdehído por HPLC.	153
2.7.8.1.	Fundamento.	153
2.7.8.2.	Preparación de los reactivos.	154
2.7.8.3.	Procedimiento de derivatización.	155
2.7.8.4.	Preparación de las fases móviles para HPLC.	155
2.7.8.5.	Condiciones y método cromatográfico.	156
2.7.8.6.	Cálculos.	156
2.7.9.	Determinación de los niveles de glutatión total por HPLC.	157
2.7.9.1.	Fundamento.	157
2.7.9.2.	Derivatización de la muestra.	158
2.7.9.3.	Técnica cromatográfica.	158
2.7.9.4.	Cálculos.	159
2.7.10.	Determinación del GSSG por HPLC.	160
2.7.10.1.	Fundamento.	160
2.7.10.2.	Derivatización.	160
2.7.10.3.	Técnica cromatográfica.	161
2.7.10.4.	Cálculos.	161
2.7.11.	Determinación de distintas proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y posterior Western blotting.	161
2.7.11.1.	Fundamento.	161
2.7.11.2.	Condiciones del gel y la transferencia.	162

2.7.11.3.	Visualización, cuantificación y cálculos por densitometría.	163
2.7.11.4.	Cálculos.	164
2.7.12.	Determinación de los niveles de proteínas carboniladas en geles de poliacrilamida-SDS y posterior Western blotting.	165
2.7.12.1.	Fundamento.	165
2.7.12.2.	Reactivos.	165
2.7.12.3.	Procedimiento.	166
2.7.12.4.	Revelado	167
2.7.13.	Retrotranscripción de una copia del ADN (cADN).	167
2.7.13.1.	Fundamento.	167
2.7.13.2.	Reactivos.	168
2.7.13.3.	Procedimiento.	168
2.7.14.	Amplificación cuantitativa del ARN (RT-PCR en tiempo real).	169
2.7.14.1.	Fundamento.	169
2.7.14.2.	Procedimiento.	170
2.7.14.3.	Cálculos.	171
IV.	RESULTS AND DISCUSSION	173
1.	STUDY OF THE BASAL LEVELS OF NEUROTROPHIC FACTORS (BDNF AND IGF-1) IN HEALTHY ADOLESCENT CYCLIST AND THEIR RESPECTIVE CONTROLS (OBJECTIVE 1).	175
1.1.	Results.	175
1.1.1.	Anthropometric, metabolic and hematological data of the sedentary and trained adolescents.	175
1.1.2.	Daily energy expenditure of the sedentary and trained adolescents.	176
1.1.3.	IGF-1 levels of sedentary and trained adolescents analyzed in two different moments of the season.	177
1.1.4.	BDNF levels of sedentary and trained adolescents analyzed in two different moments of the season.	178
1.1.5.	CREB activation levels in PBMCs of sedentary and trained adolescents analyzed in two different moments of the season.	179

1.2. Discussion..... 181

2. STUDY OF BDNF LEVELS MEASURED IN PERIPHERAL BLOOD, UNDER DIFFERENT PROCESSING CONDITIONS, AFTER ITS INDUCTION BY ACUTE PHYSICAL EXERCISE IN HEALTHY YOUNG ADULTS (OBJECTIVE 2)..... 186

2.1. Results. 186

2.1.1. Daily physical activity performed by the healthy young adults. 186

2.1.2. Performance reached on the acute exercise protocol by the healthy young adults..... 187

2.1.3. Hematological changes induced by exercise in the healthy young adults. 187

2.1.4. Time course of the BDNF levels found after an acute bout of exercise, in different processing blood conditions, in healthy young adults. 188

2.2. Discussion..... 193

3. STUDY OF THE EFFECTS OF EXERCISE TRAINING (12 WEEKS) ON COGNITIVE, PERFORMANCE AND NEUROBIOLOGICAL VARIABLES RELATED TO OXIDATIVE STRESS, MITOCHONDRIOGENESIS, NEUROTROPHIC AND PATHOPHYSIOLOGICAL PATHWAYS IN A 2xTG MODEL OF ALZHEIMER’S DISEASE, AND THEIR RESPECTIVE CONTROLS (OBJECTIVE 3). 196

3.1. Results. 196

3.1.1. Performance of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease allowed to run freely in the running-wheel..... 196

3.1.2. Physical testing in the NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training..... 198

3.1.3. Behavioral and cognitive testing in the NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training. 199

3.1.4. Metabolic profile over time of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training. 204

3.1.5. Hippocampal A β (1-42) levels in the 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training..... 206

3.1.6. Brain cortex and blood oxidative damage of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training..... 207

3.1.7. Brain cortex antioxidant defense of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training. 211

3.1.8. Brain BDNF levels and its signaling-related proteins in the NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training.... 215

3.1.9. Brain cortex mitochondrial content and biogenesis of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training.... 219

3.1.10. Brain cortex LRP1 levels of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training. 220

3.1.11. Brain glucose uptake of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training. 222

3.2. Discussion..... 223

4. STUDY OF THE EFFECTS OF VOLUNTARY PHYSICAL EXERCISE (12 WEEKS) ON NEUROBIOLOGICAL VARIABLES RELATED TO OXIDATIVE STRESS, MITOCHONDRIOGENESIS, NEUROTROPHIC AND PATHOPHYSIOLOGICAL PATHWAYS IN A 3xTg MODEL OF ALZHEIMER’S DISEASE SUBJECTED TO OVARIECTOMY, AND THEIR RESPECTIVE CONTROLS (OBJECTIVE 4). 233

4.1. Results. 234

4.1.1. Brain cortex A β (1-40 and 1-42) and C99/APP levels in the NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training..... 234

4.1.2. Brain cortex hiperphosphorylated tau levels of the NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training. 238

4.1.3. Hippocampal BDNF levels and its signaling-related proteins in the NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training. 239

4.1.4. Hippocampal mitochondrial biogenesis of the NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training. 243

4.1.5. Hippocampal mRNA expression of antioxidant enzymes in NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training..... 245

4.2. Discussion..... 249

5. STUDY OF THE POTENTIAL SYNERGIC EFFECT OF CHRONIC PHYSICAL EXERCISE AND THE TRKB AGONIST (7,8-DIHYDROXYFLAVONE)

ADMINISTRATION (6 WEEKS) ON COGNITIVE AND PSYCHOLOGICAL VARIABLES IN HEALTHY RATS (OBJECTIVE 5).	258
5.1. Results.	258
5.1.1. Weight over time in rats treated with 7,8-dihydroxyflavone and/or exercise training.....	258
5.1.2. Behavioral and cognitive testing in rats treated with 7,8-dihydroxyflavone and/or exercise training.	259
5.2. Discussion.....	262
V. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES.....	265
VI. BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFÍA	271
VII. ANNEX / ANEXOS	323
1. ACRÓNIMOS (ACRONYMS).....	325
2. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL DOCTORANDO RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	331

FIGURES INDEX / ÍNDICE DE FIGURAS

ABSTRACT / RESUMEN

Figure 1. Experimental designs used in this Doctoral Thesis..... 3

I. INTRODUCCIÓN

Figura I.1. La hipótesis neurotrófica para la plasticidad de la transmisión sináptica.
..... 16

Figura I.2. Estructura química del BDNF..... 23

Figura I.3. Estructura química de la 7,8-dihidroxi-flavona..... 26

Figura I.4. Estructura química de las neurotrofinas y sus receptores 29

Figura I.5. Representación esquemática de las isoformas de las neurotrofinas y sus pro-isoformas..... 30

Figura I.6. Vías de señalización de las neurotrofinas a través de sus receptores Trk y p75..... 32

Figura I.7. Vías de señalización celulares implicadas en la regulación de CREB.. 34

Figura I.8. Dibujos originales del Dr. Alzheimer. Ovillos neurofibrilares y placas amiloideas..... 36

Figura I.9. Procesamiento de la proteína precursora de β A..... 43

Figura I.10. β A, estrés oxidativo y alteración mitocondrial. 49

Figura I.11. Rol dual del IGF-1 en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.. 56

Figura I.12. Diagrama holístico de la neurobiología del ejercicio..... 63

Figura I.13. Estrategias para modular la actividad de BDNF..... 65

Figura I.14. Interacción entre diferentes factores neurotróficos modulados por ejercicio 67

Figura I.15. Diagrama sobre la prevención mediante el ejercicio físico de las consecuencias deletéreas producidas en la enfermedad de Alzheimer 73

II. OBJECTIVES / OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura III.1. Diagrama del diseño experimental del <i>Objetivo 1</i>	94
Figura III.2. Diagrama del diseño experimental del <i>Objetivo 2</i>	96
Figura III.3. Diagrama del diseño experimental del <i>Objetivo 3</i>	98
Figura III.4. Diagrama del diseño experimental del <i>Objetivo 4</i>	100
Figura III. 5. Diagrama del diseño experimental del <i>Objetivo 5</i>	101
Figura III.6. Test de fuerza de agarre en ratones.	110
Figura III.7. Test de velocidad aeróbica máxima.	113
Figura III.8. Test de campo abierto.	114
Figura III.9. Test de reconocimiento de objetos.	116
Figura III.10. Molécula de ¹⁸ F-FDG y esquema de su consumo en la célula.....	118
Figura III.11. Ratón dispuesto en la camilla para ser sometido a PET.....	120
Figura III.12. Esquema del encéfalo murino.	125
Figura III.13. Distribución del anillo de PBMCs en el tubo con <i>Ficoll</i>	128
Figura III.14. Lactatómetro LactatePro.	143
Figura III.15. Immulite 1000 IGF-1 de Siemens.	145
Figura III.16. Fases del ELISA para BDNF.	147
Figura III.17. Fases del ELISA para β A.	151
Figura III.18. Cromatograma tipo en la medición de MDA por HPLC.....	157

IV. RESULTS AND DISCUSSION

Figure IV.1. IGF-1 levels by chemiluminescent assay in peripheral blood of sedentary and trained adolescents.....	178
Figure IV.2. Plasma BDNF levels by ELISA in peripheral blood of sedentary and trained adolescents.....	179

Figure IV.3. CREB activation levels by Western blotting in PBMCs of sedentary and trained adolescents..... 180

Figure IV.4. BDNF concentration changes before and over time after acute exercise in different blood conditions. 190

Figure IV.5. Percentage of BDNF concentration in relation to whole blood before and over time after acute exercise in different blood conditions..... 191

Figure IV.6. Correlations between BDNF values in the different blood conditions. 192

Figure IV.7. Distance covered and time spent daily on the running wheel of NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training..... 197

Figure IV.8. Forelimb grip strength of NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training or rest. 198

Figure IV.9. Maximal aerobic velocity of NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training or rest..... 199

Figure IV.10. Corner test in NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training or rest. 201

Figure IV.11. Open field test in NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training or rest. 203

Figure IV.12. Body weight over time in NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training..... 204

Figure IV.13. Glycemia levels over time in NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training..... 205

Figure IV.14. Cholesterolemia levels over time in NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training. 206

Figure IV.15. Hippocampal A β (1-42) levels in NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training or rest. 207

Figure IV.16. Blood and brain cortex MDA levels in NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training or rest. 208

Figure IV.17. Brain cortex protein carbonylation levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training or rest..... 209

Figure IV.18. Blood GSSG, GSH and GSSG/GSH ratio in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	210
Figure IV.19. Brain cortex catalase levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	212
Figure IV.20. Brain cortex Cu/Zn-SOD levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	213
Figure IV.21. Brain cortex Mn-SOD levels by Western blotting in 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	214
Figure IV.22. Brain cortex GPx levels by Western blotting in 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	215
Figure IV.23. Brain cortex BDNF levels by ELISA in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	216
Figure IV.24. Hippocampal BDNF levels by ELISA in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	217
Figure IV.25. Hippocampal CREB activation by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	218
Figure IV.26. Brain cortex Cyt-C levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	219
Figure IV.27. Brain cortex PGC-1 α levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	220
Figure IV.28. Brain cortex LRP1 levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	221
Figure IV.29. Brain glucose uptake by PET in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.	222
Figure IV.30. Holistic representation of the results found in the <i>Objective 3</i>	232
Figure IV.31. Brain cortex A β (1-40) levels by ELISA in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.	235
Figure IV.32. Brain cortex A β (1-42) levels by ELISA in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.	236

Figure IV.33. Brain cortex C99/APP levels by Western blotting in NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training.237

Figure IV.34. Brain cortex p-tau levels by Western blotting in NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training. 238

Figure IV.35. Hippocampal BDNF levels by ELISA in NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training. 240

Figure IV.36. Hippocampal TrkB levels by Western blotting in NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training.241

Figure IV.37. Hippocampal CREB activation by Western blotting in NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training.242

Figure IV.38. Hippocampal PGC-1 α levels by Western blotting in NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training.244

Figure IV.39. Hippocampal CAT mRNA levels by RT-PCR in NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training. 246

Figure IV.40. Hippocampal GPx mRNA levels by RT-PCR in NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training. 247

Figure IV.41. Hippocampal Mn-SOD mRNA levels by RT-PCR in NTg and 3xTg mice for Alzheimer’s disease ovariectomized and subjected to exercise training.248

Figure IV.42. Body weight over time in the rats treated with 7,8-DHF and/or exercise training..... 259

Figure IV.43. Object recognition test in the rats treated with 7,8-DHF and/or exercise training..... 260

Figure IV.44. Open field test in the rats treated with 7,8-DHF and/or exercise training..... 261

V. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

TABLES INDEX / ÍNDICE DE TABLAS

ABSTRACT / RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

Tabla I.1. Factores neurotróficos..... 17

Tabla I.2. Factores de riesgo biológicos, psicosociales y de personalidad en la enfermedad de Alzheimer..... 40

Tabla I.3. Condiciones metodológicas en el procesado de la muestra susceptibles de alterar los niveles de BDNF..... 75

II. OBJECTIVES / OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla III.1. Protocolo del test de velocidad aeróbica máxima..... 112

Tabla III.2. Parámetros hematológicos analizados de forma automatizada en humanos..... 140

Tabla III.3. Diluciones del patrón de BDNF para el ELISA. 148

Tabla III.4. Diluciones del patrón de β A (1-42 y 1-40) para el ELISA..... 152

Tabla III.5. Programación del cromatograma de MDA..... 156

Tabla III.6. Relación de anticuerpos primarios utilizados y condiciones..... 164

Tabla III.7. Relación de anticuerpos secundarios utilizados y condiciones. 164

IV. RESULTS AND DISCUSSION

Table IV.1. Characteristics of the sedentary and trained adolescents. 176

Table IV.2. Weekly energy expenditure obtained by the IPAQ-S. 187

Table IV.3. Hematological changes induced by an acute bout of exercise in healthy young adults..... 188

V. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

ABSTRACT / RESUMEN

ABSTRACT

Physical activity prevents numerous disorders and improves many pathophysiological disease features. Exercise has been classically associated to muscular and metabolic benefits. However, the effects of exercise training on brain function, specialty known as “Neurobiology of exercise”, have recently received much attention.

The beneficial effects of exercise have been clearly established in several pathologies such as Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, amyotrophic lateral sclerosis, schizophrenia, bipolar disorder and depressive disorder, among others. These findings have lead to use exercise training as a therapeutic coadjuvant strategy not only in research but also in the clinical practice. According to a large amount of evidence, physical exercise not only restores the altered physiology of several neuropsychiatric diseases but also improves the brain function, cognition and psychological condition in healthy people.

Exercise exerts its action on the brain through many molecular pathways and physiological mechanisms. Some of them include the prevention of oxidative damage, release of endorphins, restoration of dopamine signaling and those actions mediated by the neurotrophic factors. Neurotrophic factors are growth factors with different sources and pathways of action. Although there are several factors included in this family of proteins, we would like to highlight the insulin-like growth factor 1 (IGF-1), the vascular endothelial growth factor (VEGF), the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), the nerve growth factor (NGF), and the neurotrophins 3 and 4/5 (NT-3 and NT-4/5 respectively). The main actions mediated by these factors include the hippocampal neurogenesis, neuron repair, axogenesis, dendrogenesis, synaptic transmission modulation, synaptogenesis, and thereby brain plasticity. The functional consequences of their modulation include

long term potentiation, improvement of learning and memory, anxiolytic and antidepressant effects.

BDNF is one of the most important neurotrophic factors since it mediates pleiotropic trophic effects in the brain. In addition, it is also one of the main neurotrophic factors induced by both chronic and acute exercise. High levels of BDNF have been found in brains of exercised persons, through *post mortem* studies and jugular blood *in vivo* analysis, as well as in trained animals. The brain modulation is produced mainly in the hippocampus and limbic system and thereby it has been associated with several cognitive and psychological improvements.

There is yet no consensus about the adequate blood processing conditions to standardize peripheral BDNF assessment in exercise studies. Serum, plasma, whole blood, and platelets-rich plasma with several methodological processing conditions have been indistinctly used in the literature. This leads to inconsistencies in the studies.

This Doctoral Thesis aims to clarify the effects of acute exercise and training in human blood levels of neurotrophic factors as well as the appropriate methodological protocol for the BDNF analysis. We also aim to determine the molecular pathways involved in the beneficial effects of exercise training in two mice models of Alzheimer's disease. Finally, we aim to test the possible synergistic beneficial effect of exercise training and a BDNF pharmacologic mimetic on brain function in rats (**Figure 1** summarizes the major aims and experimental models of this Doctoral Thesis).

Figure 1. Experimental designs used in this Doctoral Thesis

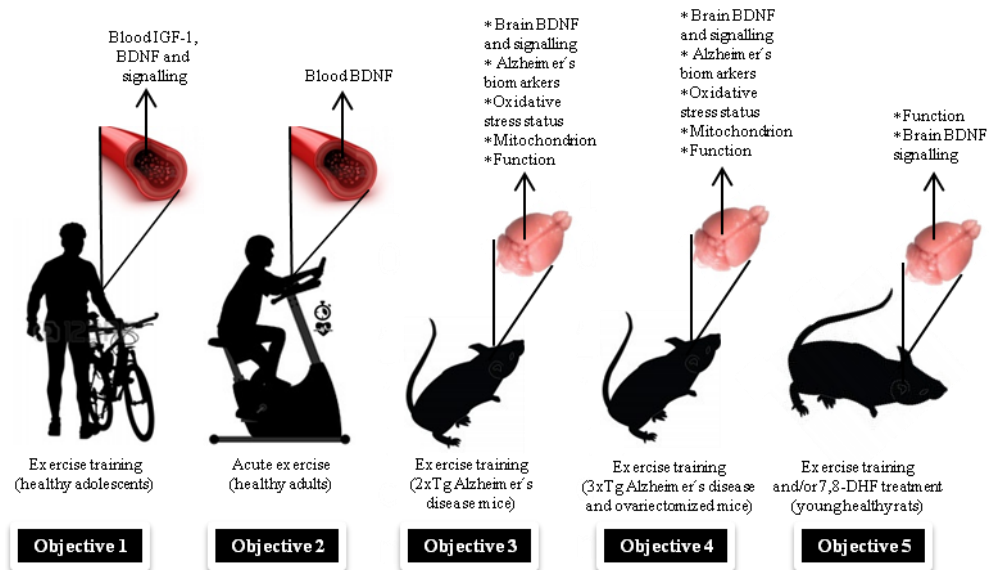


Figure 1. Abbreviations: 2xTg (double transgenic), 3xTg (triple transgenic), 7,8-DHF (7,8-dihydroxyflavone).

In our first experimental model, healthy adolescents were divided into two groups according to their exercise habits. The trained group included members of an elite cyclist team, and thereby highly trained. The control group included sedentary matched controls. We compared the IGF-1 and BDNF blood levels of both groups in the pre-season and post-competition period. We evaluated the possible effect of the circulating BDNF on the cAMP response element-binding (CREB) activation in peripheral blood mononuclear cells. All participants were also evaluated through anthropometric, hematological and accelerometer analysis.

We found that the BDNF and IGF-1 blood levels were increased in the trained adolescents compared with the sedentary controls when we analyzed it during the pre-season, characterized by a moderate physical demand. This increment did not

affect to the CREB. Moreover, the differences between both groups disappeared when we compared the neurotrophic factor levels in the post-competition period, characterized by a maximum physical performance requirement.

In our second experimental model we determined the effect of an acute bout of exercise on BDNF blood levels in healthy adults under different blood processing conditions in a time-course analysis (at baseline, immediately after exercise, at 30 and 60 minutes of recovery). The blood samples that we analyzed included serum coagulated 10 minutes and 24 hours; plasma with EDTA, with and without platelets; and whole blood.

We found an increment in BDNF levels after the acute exercise in the serum coagulated during 24 hours and in whole blood samples. These changes were not evident when analyzed in the serum coagulated during 10 minutes, total plasma and platelet-free plasma samples. The interference of the anticoagulants used for the plasma and the irregular platelet activation in the serum coagulated during 10 minutes led to a high variability in the BDNF levels. We have also found that the processing temperature of the samples and the hemoconcentration are relevant factors to take into account in these studies.

In our third experimental model we used non transgenic and double transgenic mice (2xTg) for Alzheimer's disease. We divided the animals into two groups: sedentary and exercised. At 10 months of age, trained groups were subjected to 12 weeks of a training combination of forced and voluntary exercise. Different psychological and physical tests were performed to the animals. We also evaluated brain glucose uptake by positron emission tomography and biochemical markers related to amyloid- β (A β) (1-42) levels and its modulation through the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), BDNF pathway (tyrosine kinase type B (TrkB) levels and CREB levels and activation), oxidative damage (malondialdehyde, glutathione, protein carbonylation), antioxidant defense levels

(superoxide dismutase dependent of copper/zinc and manganese (Cu/Zn-SOD and Mn-SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT)), and mitochondrial content (cytochrome-C) and biogenesis (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α , PGC-1 α).

The exercise training improved the behavior of the 2xTg mice as well as their physical performance. These improvements were accompanied by a hippocampal A β (1-42) reduction in the 2xTg mice. The cerebral and systemic oxidative damage, LRP1 and hippocampal BDNF levels were reduced in the 2xTg mice and the exercise did not affect it. Nevertheless, the brain glucose uptake was higher in the transgenic mice and the antioxidant defense, determined by the CAT, increased in the 2xTg mice after exercise.

Our forth experimental model included a triple transgenic mouse model (3xTg) of Alzheimer's disease and non transgenic mice as control. We studied the protective effect of exercise in ovariectomized mice. The exercise protocol included 12 weeks of spontaneous wheel-running. The animals were divided into eight experimental groups which included an Alzheimer's disease model and/or artificial climacteric and/or exercise treatment. We sacrificed animals and analyzed several brain biomarkers which included the A β and hiperphosphorylated tau levels, the amyloidogenic pathway (C99/APP), BDNF levels and its pathway through TrkB and CREB, PGC-1 α , and the expression the antioxidant enzymes GPx, Mn-SOD and CAT.

The exercise training performed by the 3xTg mice and the ovariectomy did not affect to the brain A β and the tau hyperphosphorylated levels. Nevertheless, the exercise partially prevented activation of the amyloidogenic pathway in all cases. In addition, training incremented the hippocampal BDNF levels of the 3xTg, ovariectomized and sham. We obtained a CREB activation increment in the non transgenic and 3xTg non ovariectomized mice subjected to exercise. Moreover, the

hippocampal expression of CAT increased in the 3xTg mice, trained and sedentary, whereas the ovariectomy reduced it. This was reverted through physical exercise.

Finally, in the fifth experimental model we aimed to evaluate the possible synergic effects of 6 weeks of exercise training and a pharmacological BDNF mimetic, 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF), in healthy young rats. Thus, we used four experimental groups which included the trained group, the group with 7,8-DHF, the group subjected to a combination of exercise and 7,8-DHF and a control group. We evaluated the cognition of the animals through the object recognition test and their behavioral condition by the open field test.

The treatment with 7,8-DHF and/or forced exercise training did not show a synergic effect on the psychological parameters analyzed. The learning and memory did not improve, whereas the exploratory behavior incremented with all treatments but especially with the exercise training.

Taking together our findings we can conclude that acute and chronic exercise increases BDNF peripheral levels in humans whereas exercise training improves the pathophysiological and functional features of Alzheimer's disease in two different transgenic models. Exercise seems to contribute to brain benefits by a wide range of physiological mechanisms including the BDNF pathway.

RESUMEN

La actividad física previene numerosas patologías y mejora muchos rasgos fisiopatológicos en muchas enfermedades. El ejercicio ha sido asociado clásicamente con beneficios en desórdenes musculares y metabólicos. Sin embargo, los efectos del ejercicio en la función cerebral, especialidad conocida como “Neurobiología del ejercicio”, han cobrado gran importancia en los últimos años.

Los efectos beneficiosos del ejercicio físico han sido establecidos en muchas enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la esquizofrenia, el trastorno bipolar y los trastornos depresivos, entre otros. Estos hallazgos han llevado a utilizar el ejercicio físico como una estrategia terapéutica coadyuvante, no sólo en el campo de la investigación sino también en la práctica clínica. De acuerdo con una gran cantidad de evidencias, el ejercicio no sólo restaura las alteraciones fisiológicas de numerosas enfermedades neuropsiquiátricas sino que también mejora la función cerebral, la cognición y el estado psicológico de personas sanas a lo largo de la vida.

El ejercicio físico ejerce su acción en el cerebro a través de diferentes vías moleculares y mecanismos fisiológicos. Algunas de ellas incluyen la prevención del estrés oxidativo, la liberación de endorfinas, el restablecimiento de la señalización dopaminérgica así como aquellas acciones mediadas por los factores neurotróficos, entre otros. Los factores neurotróficos son factores de crecimiento con diferentes fuentes y vías de acción. Aunque esta familia incluye numerosos factores, cabe destacar el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y las neurotrofinas 3 y 4/5 (NT-3 y NT-4/5 respectivamente). Las principales acciones mediadas por

estos factores incluyen la neurogénesis hipocampal, la reparación neuronal, axonogénesis, dendrogénesis y la modulación de la transmisión sináptica, lo que conduce a una mayor plasticidad cerebral. Las consecuencias funcionales de esta modulación incluyen una mejora en la potenciación a largo plazo en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje, así como efectos ansiolíticos y antidepresivos.

De todos los factores neurotróficos estudiados, BDNF es uno de los más importantes ya que media efectos tróficos pleiotrópicos en el cerebro. Además, también es uno de los principales factores neurotróficos inducidos por ejercicio físico crónico y agudo. Se han encontrado altos niveles de BDNF en cerebros de personas entrenadas, a través de análisis *post mortem* y estudios *in vivo* utilizando sangre extraída de la yugular, así como en estudios con animales entrenados. Su inducción cerebral ocurre principalmente en el hipocampo y en el sistema límbico por lo que ha sido asociada con numerosas mejoras cognitivas y psicológicas.

No existe todavía consenso sobre las condiciones adecuadas de procesamiento de la sangre para estandarizar la medida de BDNF periférico en estudios con ejercicio físico. Las muestras de suero, plasma, sangre total y plasma rico en plaquetas con diferentes condiciones de procesamiento son usadas indistintamente en la literatura. Esto lleva a encontrar inconsistencias entre los estudios.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo clarificar, por un lado, los efectos del ejercicio agudo y el entrenamiento en los niveles de factores neurotróficos en sangre humana, así como el protocolo metodológico adecuado para el análisis de BDNF. Otro objetivo ha sido determinar las vías de señalización moleculares implicadas en los efectos beneficiosos del entrenamiento físico en dos modelos murinos para la enfermedad de Alzheimer. Por último, nos planteamos evaluar el posible efecto sinérgico beneficioso del ejercicio físico y un mimético

farmacológico de BDNF en ratas sanas (La **Figure 1** resume los principales objetivos y modelos experimentales de esta Tesis Doctoral).

En nuestro primer modelo experimental dividimos en dos grupos a adolescentes sanos de acuerdo a sus hábitos de ejercicio físico. El grupo entrenado incluía miembros de un equipo ciclista profesional, y por tanto altamente entrenados. El grupo control incluía sedentarios con las mismas características. Comparamos los niveles sanguíneos de IGF-1 y BDNF de ambos grupos en el periodo de pretemporada y post-competitivo. Evaluamos el posible efecto del BDNF circulante en la activación de proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB) en células sanguíneas mononucleares. Todos los participantes fueron también evaluados a través de análisis antropométricos, hematológicos y calorimétricos.

Los niveles sanguíneos de BDNF e IGF-1 se mostraron incrementados en los adolescentes deportistas comparados con los controles sedentarios cuando se analizaron durante el periodo de pretemporada, caracterizado por implicar exigencias físicas moderadas. Este incremento no afectó a la activación de CREB. Las diferencias entre ambos grupos desaparecieron cuando se compararon los niveles de factores neurotróficos en el periodo post-competición, caracterizado por unas exigencias máximas en el rendimiento físico.

En nuestro segundo modelo experimental determinamos el efecto de una sesión de ejercicio agudo en los niveles sanguíneos de BDNF en adultos sanos, bajo diferentes condiciones de procesamiento de las muestras en un análisis longitudinal (basal, inmediatamente al terminar el ejercicio y a los 30 y 60 minutos de recuperación). Las muestras sanguíneas que analizamos incluyeron el suero coagulado durante 10 minutos y 24 horas; plasma con EDTA, con y sin plaquetas; y sangre total.

Encontramos un incremento de los niveles de BDNF tras la sesión de ejercicio agudo en las muestras de suero coagulado durante 24 horas y las de sangre total.

Estos cambios no se evidenciaron cuando analizamos las muestras de suero coagulado durante 10 minutos, plasma total y plasma sin plaquetas. La interferencia de los anticoagulantes utilizados para el plasma y la irregular activación de las plaquetas en el suero coagulado 10 minutos produce una gran variabilidad en los niveles de BDNF. También encontramos que la temperatura de procesamiento de las muestras y la hemoconcentración son factores relevantes a tener en cuenta en estos estudios.

En nuestro tercer modelo experimental utilizamos ratones no transgénicos y doble transgénicos (2xTg) para la enfermedad de Alzheimer. Dividimos los animales en dos grupos: sedentario y ejercicio. A los 10 meses de edad, los grupos entrenados fueron sometidos a 12 semanas de una combinación de entrenamiento forzado y voluntario. Sometimos a todos los animales a diferentes tests psicológicos y físicos. También determinamos el consumo de glucosa cerebral mediante tomografía por emisión de positrones y los marcadores bioquímicos relacionados con los niveles de β -amiloide (β A) (1-42) y su modulación a través de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 (LRP1), la señalización de BDNF (niveles de tirosina quinasa B (TrkB) y la activación de CREB), daño oxidativo (malondialdehído, glutatión y carbonilación proteica), niveles de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa dependiente de cobre/zinc y manganeso (Cu/Zn-SOD y Mn-SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT)), y el contenido (citocromo-C) y biogénesis mitocondrial (coactivador-1 α del receptor activado de proliferación de los peroxisomas gamma, PGC-1 α).

El entrenamiento mejoró el comportamiento de los ratones 2xTg así como su rendimiento físico. Estas mejoras estuvieron acompañadas de una disminución del β A (1-42) hipocámpal en los ratones 2xTg. El daño oxidativo cerebral y sistémico, LRP1 y BDNF hipocámpal se mostraron disminuidos en los 2xTg mientras que el ejercicio no afectó. Sin embargo, el consumo de glucosa cerebral fue superior en

los ratones transgénicos y la defensa antioxidante cerebral, mediada por la CAT, incrementó en los ratones 2xTg tras el entrenamiento.

Nuestro cuarto modelo experimental incluyó un modelo triple transgénico (3xTg) para la enfermedad de Alzheimer y ratones no transgénicos como control. Además, dividimos a los animales en el grupo ovariectomizado y en el grupo con cirugía simulada. Tratamos a los animales con ejercicio voluntario durante 12 semanas cuando tenían 6 meses de edad (grupos ejercicio) y mantuvimos sedentarios a los grupos controles. Finalmente utilizamos ocho grupos experimentales que incluían el modelo de Alzheimer y/o el climaterio artificial y/o el tratamiento con ejercicio. Sacrificamos a los animales y analizamos diversos biomarcadores cerebrales entre los que se incluyeron los niveles de β A y tau hiperfosforilado, la vía amiloidogénica (C99/APP), los niveles de BDNF y su señalización a través de TrkB y CREB, PGC-1 α y la expresión de las enzimas antioxidantes GPx, Mn-SOD and CAT.

El entrenamiento físico implementado a los ratones 3xTg y la ovariectomía no afectaron a los niveles de β A ni a la fosforilación de tau cerebral. El ejercicio, sin embargo, previno parcialmente la vía amiloidogénica en todos los casos. Además, el entrenamiento incrementó los niveles de BDNF hipocampal en los 3xTg, ovariectomizados y sus controles. Encontramos un incremento en la activación de CREB en los ratones no transgénicos y 3xTg no ovariectomizados sometidos a ejercicio. Asimismo, la expresión de CAT hipocampal incrementó en los ratones 3xTg, entrenados y sedentarios, mientras que la ovariectomía los redujo. Esta disminución fue revertida mediante el ejercicio físico.

Finalmente, en el quinto modelo experimental perseguimos evaluar el posible efecto sinérgico de 6 semanas de ejercicio físico y el mimético farmacológico de BDNF, 7,8-dihidroxiavona (7,8-DHF), en ratas jóvenes sanas. Usamos cuatro grupos experimentales que incluyeron el grupo entrenado, el tratado con 7,8-DHF

y el grupo sometido a la combinación de ejercicio y 7,8-DHF. Evaluamos la cognición de los animales a través del test de reconocimiento de objetos y el estado comportamental a través del test de campo abierto.

El tratamiento con 7,8-dihydroxiflavona y/o ejercicio forzado no mostró un efecto sinérgico en los parámetros psicológicos analizados. El aprendizaje y la memoria no mejoraron, mientras que el comportamiento exploratorio incrementó con todos los tratamientos, aunque principalmente con el ejercicio físico.

Teniendo en cuenta todos nuestros hallazgos podemos concluir que tanto el ejercicio agudo como el entrenamiento incrementan los niveles periféricos de BDNF en humanos mientras que el entrenamiento mejora los rasgos fisiopatológicos y funcionales de dos modelos diferentes de enfermedad de Alzheimer. Así, el ejercicio ejerce beneficios cerebrales a través de un amplio abanico de mecanismos fisiológicos que incluyen la modulación de BDNF.

I. INTRODUCCIÓN

1. Factores neurotróficos

1.1. Teoría neurotrófica

La “teoría de la quimioafinidad” estableció en los años 40 una respuesta para explicar la especificidad neuronal y sus conexiones. Esta hipótesis proponía que los elementos pre- y postsinápticos tienen marcapos de superficie que permiten el reconocimiento de la mutua afinidad durante el proceso de crecimiento axonal y la formación sináptica. Esta idea, aunque apoyada y reforzada por los experimentos de Sperry (Sperry 1963), ya había sido previamente sugerida por Santiago Ramón y Cajal (Ramon y Cajal 1928) y John Newport Langley (Langley 1895).

En los años 50, los experimentos de Rita Levi-Montalcini y Viktor Hamburger iniciaron un cambio de óptica respecto a la neurobiología (Levi-Montalcini & Hamburger 1951) cuando descubrieron el importante papel de un factor sinaptogénico que además promovía la supervivencia de ciertas neuronas. Estos descubrimientos dieron lugar a la “teoría neurotrófica” que originalmente postuló que un factor neurotrófico es una señal producida por las células inervadas y que actúa retrógradamente sobre las neuronas que las inervan (Easter *et al.* 1985). Esto explicaba cómo los cambios ontogénicos y filogenéticos que producen modificaciones en el tamaño del animal son correspondidos con cambios en el sistema nervioso con el objetivo de preservar una función eficiente. Durante los estadios iniciales del desarrollo embrionario acontece una hiperproducción de neuronas y en etapas subsiguientes un proceso fisiológico de eliminación o *poda* de las neuronas prescindibles (Oppenheim 1991), mediado en gran medida por el aporte insuficiente de factores tróficos (Purves 1988).

Hoy se sabe que los factores neurotróficos, sintetizados y liberados desde diversos tejidos, actúan a nivel paracrino y endocrino regulando la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de numerosas poblaciones neuronales tanto en el sistema nervioso central como periférico, durante el desarrollo y a lo largo de la

etapa adulta (Agnati *et al.* 1995; Schinder & Poo 2000). Además de las funciones clásicamente atribuidas a los factores neurotróficos mediante la diferenciación y la supervivencia neuronal (Agnati *et al.* 1995), éstos están implicados en la guía axonal (Song & Poo 1999), la transmisión sináptica (Lohof *et al.* 1993; Lessmann *et al.* 1994; Kang & Schuman 1995) y la plasticidad neuronal (Thoenen 1995) estando su expresión cerebral mediada por la actividad neuronal (Gall & Isackson 1989; Zafra *et al.* 1990; Ernfors *et al.* 1991). Por tanto, una versión más actualizada de la “teoría neurotrófica” propone que la actividad neuronal repetida incrementa la expresión, secreción y la acción de diversos factores neurotróficos en las sinapsis para modificar la transmisión sináptica y en consecuencia la conectividad. (Schinder & Poo 2000) (**Figura I.1**).

Figura I.1. La hipótesis neurotrófica para la plasticidad de la transmisión sináptica.

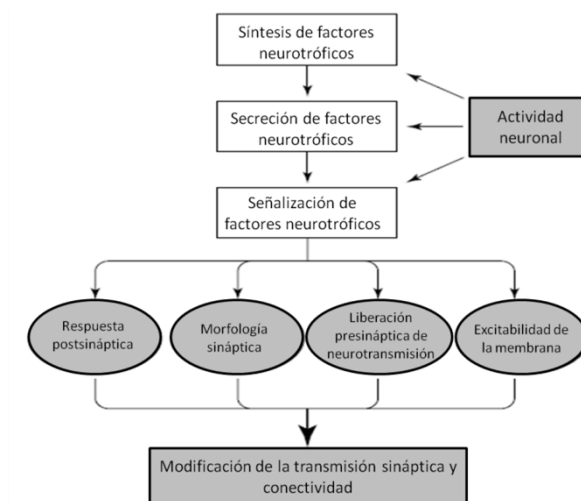


Figura I.1. Extraída y adaptada de Schinder & Poo (Schinder & Poo 2000).

1.2. Tipos de factores neurotróficos

Existen numerosos tipos y familias peptídicas de factores neurotróficos (**Tabla I.1**). Las familias más estudiadas son la familia de las neurotrofinas, que incluye el factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés, *nerve growth factor*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés, *brain-derived neurotrophic factor*) y las neurotrofinas 3 y 4/5 (NT-3 y NT-4/5 respectivamente) (Chao 2003); la familia del factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF por sus siglas en inglés, *glial-derived neurotrophic factor*) que incluye la neurturina (NTN), persefina (PSPN) y la artemina (ARTN) (Bennett *et al.* 2000); y la familia del factor de crecimiento transformador- β (TGF- β por sus siglas en inglés, *transforming growth factor- β*) que incluye algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento de diferenciación 11 (GDF11 por sus siglas en inglés, *growth differentiation factor 11*), muy estudiado en los últimos años (Katsimpardi *et al.* 2014).

Tabla I.1. Factores neurotróficos.

Factor neurotrófico	Acrónimos
Factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve growth factor</i>)	NGF
Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)	BDNF
Neurotrofina 3 (<i>Neurotrophin 3</i>)	NT-3
Neurotrofina 4/5 (<i>Neurotrophin 4/5</i>)	NT-4/5
Neurotrofina 6 (<i>Neurotrophin 6</i>)	NT-6
Factor de crecimiento vascular endotelial (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)	VEGF
Eritropoyetina (<i>Erythropoietin</i>)	EPO
Factor de crecimiento fibroblástico 1, 2 y 5 (<i>Fibroblast growth factor 1, 2 and 5</i>)	FGF-1, -2 y -5

Factor neurotrófico ciliar (<i>Ciliary neurotrophic factor</i>)	CNTF
Factor inhibitorio de la leucemia (<i>Leukemia inhibitory factor</i>)	LIF
Factor de crecimiento similar a la insulina 1 y 2 (<i>Insulin-like growth factor 1 and 2</i>)	IGF-1 y -2
Factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal growth factor</i>)	EGF
Factor de diferenciación de crecimiento 11 (<i>Growth differentiation factor 11</i>)	GDF11
Factor de crecimiento tumoral β (<i>Tumor growth factor β</i>)	TGF- β
Cardiotrofina 1 (<i>Cardiotrophin 1</i>)	CT-1
Factor de crecimiento derivado de la glía (<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>)	GDNF
Neurturina (<i>Neurturin</i>)	NTN
Persefina (<i>Persephin</i>)	PSPN
Artemina (<i>Artemin</i>)	ARTN

Los diferentes factores neurotróficos son secretados desde distintas fuentes, cerebrales o no, y su diferente estructura les confiere múltiples y diversas funciones. No obstante, todos ellos, en menor o mayor medida, son responsables de la neurogénesis, del desarrollo, mantenimiento y diferenciación de las neuronas preexistentes, su mielinización, migración, axonogénesis, dendrogénesis y sinaptogénesis, así como la modulación de procesos apoptóticos (Snider 1994; Roux *et al.* 1999; Chan *et al.* 2001; Lee & Son 2009). A continuación se amplían los procesos de regulación y función de dos de los factores neurotróficos más importantes, BDNF e IGF-1, que han sido estudiados en la presente Tesis Doctoral.

1.2.1. IGF-1

En la década de los 50 se describió una proteína dependiente de la hormona de crecimiento (GH por sus siglas en inglés, *growth hormone*) que estimulaba la incorporación de sulfatos en el cartílago de ratas hipofisectomizadas. Esta proteína, conocida inicialmente como somatomedina-C y actualmente como IGF-1, se propuso como mediadora de las acciones de la GH (Salmon & Daughaday 1957). El IGF-1 es un factor trófico que pertenece a una familia de proteínas relacionadas estructuralmente que incluye a la insulina, la relaxina y el IGF-2. Con él se completó el eje hipotálamo-hipófisis-hígado encargado de regular el crecimiento tisular. Mediante este eje, la hormona liberadora de la GH (GHRH por sus siglas en inglés, *growth hormone releasing hormone*) sintetizada en el hipotálamo llega a la hipófisis donde estimula la liberación de GH en sangre. La GH es captada por el hígado y el músculo donde promueve la síntesis y secreción de IGF-I en sangre. Éste factor es transportado hasta los tejidos diana en los que ejerce su efecto trófico. Existe síntesis de IGF-I independiente de GH en numerosos tejidos, incluido el sistema nervioso donde, en muchos casos ejerce una acción paracrina independiente del sistema endocrino (Hernandez-Sanchez *et al.* 1995).

El IGF-I es un polipéptido de 7.5 KDa de cadena sencilla compuesto por 70 aminoácidos. Se expresa tanto durante el desarrollo embrionario y postnatal como en la vida adulta en gran variedad de tejidos, entre los que se incluyen el músculo, pulmón, hígado, riñones y cerebro (Binoux 1995). En el sistema nervioso embrionario y en desarrollo, los IGFs (IGF-1 y -2) y sus receptores están expresados en gran medida, lo que sugiere un importante papel de estos factores durante los procesos de diferenciación neuronal, sinaptogénesis y mielinización (Sara & Hall 1990; Feldman *et al.* 1997). Aunque neonatalmente existe una reducción del IGF-1, durante el periodo adulto IGF-1 está presente en el sistema nervioso central (Brooker *et al.* 2000).

La deficiencia de IGF-1 en animales de experimentación produce, no sólo alteraciones metabólicas como la diabetes (Dunger *et al.* 2003), sino también un amplio abanico de alteraciones neurobiológicas (Trejo *et al.* 2004). Así, IGF-1 juega un importante papel en la función cerebral (Torres-Aleman 1999) a través de regulaciones pleiotrópicas que incluyen desde la neuroprotección a la plasticidad neuronal (Torres Aleman 2005). IGF-1 está implicado en el control de la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés, *long-term potentiation*), aprendizaje y plasticidad sináptica a través de sus efectos tróficos en las sinapsis glutamatérgicas (Trejo *et al.* 2007). Este factor de crecimiento también regula otro importante proceso de la plasticidad neuronal, el reemplazo neuronal (Trejo *et al.* 2001; Trejo *et al.* 2008). El hecho de que la fuente de IGF-1 sea fundamentalmente ajena al cerebro, hace que este factor sea un candidato ideal para su modulación con el fin de promover efectos tróficos (Llorens-Martin *et al.* 2009). El IGF-1 circulante modula la neurogénesis hipocampal del cerebro adulto (Trejo *et al.* 2001) así como la plasticidad neuronal y la cognición (Llorens-Martin *et al.* 2009).

IGF-1, su receptor y sus numerosas proteínas de transporte (BPs por sus siglas en inglés, *binding proteins*) de alta afinidad están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso. En periodos de desarrollo los niveles de estas proteínas son altos (Bondy *et al.* 1990; Bondy 1991) coincidiendo con picos de diferenciación neuronal y sinaptogénesis (Bach *et al.* 1991) mientras que al nacer disminuyen (Werner *et al.* 1989; Werther *et al.* 1990). Durante la pubertad, debido a su función en el desarrollo de los tejidos, los niveles son variables (Casazza *et al.* 2010) mientras que durante la edad adulta se mantienen mínimos y constantes. En sangre, los niveles de IGF-1 aparecen elevados comparado con otros factores de crecimiento, son muy estables y presentan una gran variabilidad interindividual (Torres-Aleman 2010). Existen numerosos factores ambientales y genéticos que modulan estas diferencias (Breese *et al.* 1991; Thissen *et al.* 1994; Adamo *et al.* 2006; Kappeler *et al.* 2008) incluyendo la práctica de ejercicio físico (Trejo *et al.*

2002; Llorens-Martin *et al.* 2010; Pareja-Galeano *et al.* 2013a). El ARNm de IGF-1 presente en el cerebro es reducido y limitado a algunas áreas del cerebro adulto como el hipocampo, el cerebelo y la médula espinal. Así, es a través de la barrera hematoencefálica que el IGF-1 producido por otros tejidos es introducido en el cerebro (Frank *et al.* 1986; Reinhardt & Bondy 1994; Carro *et al.* 2000).

Los distintos factores neurotróficos están interrelacionados. De esta manera, el IGF-1 cerebral incrementa la actividad de diferentes factores neurotróficos como el BDNF (Carro *et al.* 2000; Ding *et al.* 2006) y el VEGF (Lopez-Lopez *et al.* 2004). Sin embargo, no hay evidencia de que exista estimulación de IGF-1 por otro factor de crecimiento en el tejido cerebral (Torres-Aleman 2010). Su función es amplia y abarca, en términos generales, la normal función cerebral (Torres-Aleman 2000), la modulación del humor y de la cognición (Deijen *et al.* 1996), la excitabilidad neuronal (Nunez *et al.* 2003), la angiogénesis y la neurogenesis (Aleman & Torres-Aleman 2009).

La modulación de los niveles de IGF-1 se ha llevado a cabo por diversos mecanismos. Con la intención de aplicarlo en enfermedades neurodegenerativas se han desarrollado sistemas osmóticos de administración subcutánea de liberación controlada cuyos efectos terapéuticos han sido probados en animales (Fernandez *et al.* 1998). Sin embargo estos sistemas son poco prácticos para su uso en enfermos debido a su excesivo volumen y a que es preciso retirar el dispositivo una vez finalizada su liberación. Este problema viene solucionado a través de la utilización de copolímeros biodegradables (Lam *et al.* 2000; Meinel *et al.* 2001; Singh *et al.* 2012) así como microesferas de liberación lenta de IGF-1 de implantación subcutánea (López López *et al.* 2004).

1.2.2. BDNF

Yves A. Barde y colaboradores identificaron entre 1978 y 1980 un factor, más tarde conocido como BDNF, que promovía la supervivencia y la diferenciación de ciertas neuronas. En sus primeros estudios hipotetizaron que se trataba de un polipéptido diferente del estudiado hasta ese momento, NGF, siguiendo criterios inmunológicos y funcionales (Barde *et al.* 1978; Barde *et al.* 1980). Más tarde, en 1982, purificaron dicho factor por primera vez a partir de tejido cerebral de cerdo (Barde *et al.* 1982). Desde ese momento los estudios que analizaban el papel neurotrófico de BDNF a nivel intracelular incrementaron rápidamente. Sin embargo, no fue hasta 1995 que Rosefeld *et al.* demostraron que BDNF podía detectarse también en sangre periférica (Rosenfeld *et al.* 1995). Además, la importancia de este descubrimiento trascendió cuando se estableció una correlación entre los niveles cerebrales y sanguíneos, concretamente en suero (Karege *et al.* 2002). Esto condujo a un incremento exponencial de estudios científicos que relacionaron los niveles circulantes de esta neurotrofina con ciertas alteraciones, metabólicas y neuropsiquiátricas, e incluso estilos de vida (Binder & Scharfman 2004; Autry & Monteggia 2012).

El gen humano que codifica BDNF está localizado en el cromosoma 11p. Éste posee once exones y nueve promotores funcionales cuya activación es tejido-dependiente (Pruunsild *et al.* 2007). La neurotrofina BDNF es sintetizada inicialmente como una proteína precursora (prepro-BDNF) en el retículo endoplásmico. Ésta es proteolíticamente escindida de dos formas dando lugar a dos proteínas distintas estructural y funcionalmente: la forma truncada (proBDNF), de 28 KDa, y la forma madura (BDNF), de 14 KDa. La forma madura de BDNF es procesada intracelularmente a través de la furina (Mowla *et al.* 2001) (**Figura I.2**) y su modulación y efectos biológicos son los que estudiamos en la presente Tesis Doctoral.

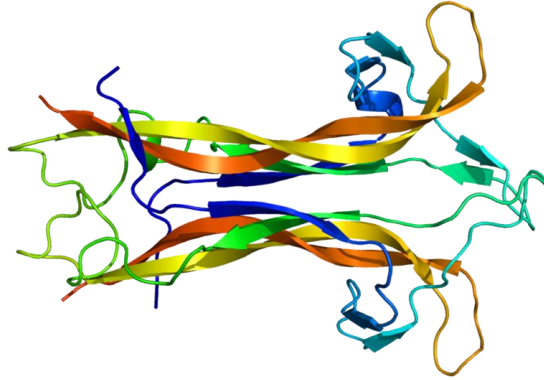
Figura I.2. Estructura química del BDNF.

Figura I.2. Estructura cristalina de BDNF mediante rayos X (PDB 1bnd). A partir de Robinson *et al.* (Robinson *et al.* 1995).

ProBDNF y en general todas las pro-neurotrofinas, tienen efectos biológicos, no sólo distintos, sino opuestos a los de las neurotrofinas maduras (Teng *et al.* 2005; Woo *et al.* 2005). Estas pro-neurotrofinas ejercen sus acciones biológicas a través de su unión al receptor p75 (Chao 2003). ProBDNF y las vías de señalización inducidas por p75 han demostrado inducir rutas proapoptóticas (Lee *et al.* 2001b) y una reducción de la dendrogénesis mientras que el bloqueo de p75 lo previene (Koshimizu *et al.* 2009). Esta vía también promueve la depresión sináptica hipocámpal dependiente de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA por sus siglas en inglés, *N-methyl-D-aspartate*) (Lu & Chang 2004). Así, una alteración en el balance entre ambas isoformas es considerada causa coadyuvante común en muchas alteraciones neuropatológicas (Autry & Monteggia 2012).

Aunque las acciones biológicas y vías de señalización de BDNF se ampliarán en apartados posteriores, cabe destacar que BDNF, al igual que el resto de neurotrofinas, se une a un receptor específico de la familia de los receptores

tirosina quinasa (Trk por sus siglas en inglés, *tyrosine kinase*) (Patapoutian & Reichardt 2001). En concreto, BDNF se une al receptor de tipo B (TrkB) a través del cual desencadena sus acciones neurotróficas (Chao 2003). La dimerización de TrkB inducida por el ligando lleva a una activación de la quinasa que conduce a una autofosforilación del receptor y a la modulación de segundos mensajeros (Chao 2003). Aunque el ARNm de BDNF y de TrkB está distribuido por todo el sistema nervioso central (Merlio *et al.* 1993; Conner *et al.* 1997), BDNF promueve sus efectos neurotróficos principalmente en neuronas del ganglio espinal (Acheson *et al.* 1995), hipocampo y corteza cerebral (Huang & Reichardt 2001).

El origen del BDNF circulante ha sido ampliamente discutido ya que esta neurotrofina puede ser sintetizada desde diversos tejidos como el lecho vascular del músculo liso (Donovan *et al.* 1995), el músculo esquelético (Matthews *et al.* 2009) y el endotelio (Wang *et al.* 2006). La inducción y/o liberación de BDNF puede estar condicionada por causas extrínsecas (dieta, ejercicio físico y psicofármacos entre otros) o intrínsecas (hormonas, daño tisular y activación plaquetaria entre otros), como se verá más adelante. Sus niveles en sangre están regulados, aparte de por su síntesis, por el almacenamiento o secreción que realizan las plaquetas (Fujimura *et al.* 2002; Karege *et al.* 2005), lo cual dificulta su medición. Además, cuando se inyecta BDNF marcado radiactivamente en la yugular o en el ventrículo cerebral de animales de experimentación, se comprueba que éste atraviesa la barrera hematoencefálica en ambos sentidos (Pan *et al.* 1998). En humanos, sin embargo, todos los intentos de administrar BDNF de manera exógena han sido poco efectivos (Group 1999; Chaudhry *et al.* 2000; Ochs *et al.* 2000) lo cual acentúa la importancia de conducir los esfuerzos terapéuticos hacia la modulación del BDNF endógeno.

Hace más de una década se identificó una variante del gen humano de *BDNF*, el polimorfismo Val66Met *BDNF* (Egan *et al.* 2003; Hall *et al.* 2003). Este Val66Met es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés, *single*

nucleotide polymorphism) del nucleótido 196 que lleva a una sustitución del aminoácido valina (Val) por la metionina (Met) (Egan *et al.* 2003; Chen *et al.* 2008). Esta mutación ocurre en el 20-30% de la población (Shimizu *et al.* 2006; Casey *et al.* 2009) y está relacionado con numerosos efectos biológicos como alteraciones moleculares y modificaciones estructurales, a nivel celular y cerebral, asociadas a disfunciones psicológicas y cognitivas (Dincheva *et al.* 2012). Así, este SNP ha sido asociado con distintas enfermedades neuropsiquiátricas cuya relación ha sido recientemente revisada por Baj *et al.* (Baj *et al.* 2013).

1.2.2.1. 7,8-dihidroxiavona como mimético de BDNF

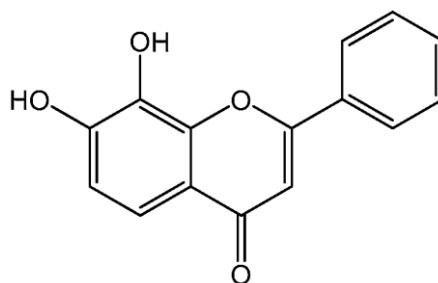
El papel del BDNF como agente terapéutico coadyuvante está ampliamente demostrado (Binder & Scharfman 2004; Nagahara & Tuszynski 2011). Sin embargo, la mayoría de estudios que han estudiado su rol terapéutico de BDNF han sido desarrollados en animales mediante administración exógena (central o periférica) o mediante técnicas de manipulación genética (Autry & Monteggia 2012; Balaratnasingam & Janca 2012). En humanos, la modulación de BDNF se ha llevado a cabo principalmente implementando herramientas indirectas que modulan la señalización endógena de este factor neurotrófico. Algunos de estos moduladores indirectos incluyen fármacos antidepresivos, antipsicóticos, eufímicos, terapia electroconvulsiva, estimulación magnética transcranial (Balaratnasingam & Janca 2012), electroacupuntura (Liang *et al.* 2002), la dieta y el ejercicio físico (Gomez-Pinilla 2008).

La razón por la cual el BDNF no es administrado directamente en humanos es debido a que posee un perfil farmacocinético pobre así como una corta vida media (Jang *et al.* 2010). Además, su mediano tamaño y carga hacen que sólo una mínima cantidad del BDNF administrado periféricamente atraviese la barrera hematoencefálica (Nagahara & Tuszynski 2011). Para superar estos impedimentos

se han ensayado vías alternativas, como la intratecal, que tampoco han resultado eficaces (Beck *et al.* 2005). Desafortunadamente los pocos ensayos clínicos en los que se ha utilizado BDNF recombinante han dado lugar a resultados negativos (Group 1999; Ochs *et al.* 2000).

Asimismo, se han diseñado nuevas moléculas que mimeticen los efectos de BDNF (O'Leary & Hughes 2003; Fletcher & Hughes 2006). A través de un cribado en la librería química y la correspondiente validación, se han obtenido unos pocos agonistas de TrkB que virtualmente mimetizan BDNF y por tanto su vía de señalización (Jang *et al.* 2010). El uso de agonistas específicos de TrkB, en vez de BDNF directamente, evita además la unión de este factor con p75 (Binder & Scharfman 2004). Tras el filtrado de los potenciales agentes miméticos se identificó un derivado flavonoide, la 7,8-dihidroxiavona (7,8-DHF) (**Figura I.3**), cuya unión al receptor TrkB se produce con alta afinidad, provoca su correspondiente dimerización y autofosforilación, y activa la cascada de señalización molecular correspondiente (Jang *et al.* 2010). 7,8-DHF es una flavona cuya obtención se puede realizar mediante síntesis química o desde el procesamiento de la planta *Godmania aesculifolia*. También puede encontrarse en bajas concentraciones en alimentos como las cerezas, te verde o la soja.

Figura I.3. Estructura química de la 7,8-dihidroxiavona



Tanto experimentos *in vitro* como *in vivo* en animales, la 7,8-DHF ha demostrado activar la vía de señalización de BDNF a través de la activación del receptor TrkB (Jang *et al.* 2010). La 7,8-DHF ha conseguido por otro lado mimetizar las consecuencias de BDNF induciendo efectos antidepresivos en modelos de depresión en ratones (Liu *et al.* 2012) y ratas (Blugeot *et al.* 2011); mejorar la extinción del miedo mediante regulación límbica en modelos de síndrome por estrés postraumático (Andero *et al.* 2011; Andero *et al.* 2012); revertir déficits de memoria en un modelo murino de Alzheimer (Devi & Ohno 2012); mejorar el fenotipo y la supervivencia así como la morfología de la zona hipocampal CA1 en ratones transgénicos para el síndrome de Rett (Johnson *et al.* 2012); y revertir las alteraciones en la memoria de ratas viejas a través de la modulación de la plasticidad sináptica (Zeng *et al.* 2012a).

1.2.3. Otros factores neurotróficos

Como se ha descrito anteriormente, existen un gran número y variedad de factores neurotróficos. En este apartado se pretende introducir algunos de ellos cuya función y estructura son similares a BDNF.

NGF, NT-3 y NT-4/5 comparten alrededor del 50% de la identidad de los aminoácidos con BDNF (Binder & Scharfman 2004). NGF, considerado el primer miembro de la familia de las neurotrofinas, fue descubierto y aislado en los años 50 por Rita Levy-Montalcini y Viktor Hamburger (Levi-Montalcini & Hamburger 1951). Inicialmente lo describieron como un agente difusible y soluble liberado por células neoplásicas y responsable de la inducción de la diferenciación y el crecimiento de numerosos tipos neuronales (Levi-Montalcini & Hamburger 1951; Cohen *et al.* 1954). Hoy sabemos que el NGF maduro es un polipéptido de 118 aminoácidos que actúa tanto sobre las neuronas del sistema nervioso central como periférico (Holtzman & Mobley 1994). Su acción está mediada por su unión al

receptor específico TrkA (Chao 1992b) (**Figura I.4**) cuyas acciones biológicas serán descritas en apartados posteriores. NGF es sintetizado en los tejidos diana de las fibras sensoriales y simpáticas, captado por los terminales de las fibras, y retrógradamente transportado al cuerpo neuronal donde promueve la reparación y supervivencia celular (Allen *et al.* 2013).

Por otro lado, las neurotrofinas NT-3 (Maisonpierre *et al.* 1990) y NT-4/5 (Hallbook *et al.* 1991; Ip *et al.* 1992) también han sido estudiadas en profundidad. Cada miembro tiene una afinidad particular por su receptor Trk. Así, NT-3 se une a TrkC y NT-4/5 a TrkB, al igual que BDNF (Barbacid 1994; Chao 2003). Mediante esta unión ejercerán sus efectos tróficos. NGF, NT-3 y NT-4/5 son también sintetizados inicialmente como pro-neurotrofinas las cuales desencadenan efectos biológicos adversos (Lee *et al.* 2001a; Lee *et al.* 2001b) al unirse con el receptor de baja afinidad p75 (Balaratnasingam & Janca 2012). A continuación se muestran las estructuras por cristales de rayos X de todas las neurotrofinas y sus receptores (**Figura I.4**).

Figura I.4. Estructura química de las neurotrofinas y sus receptores

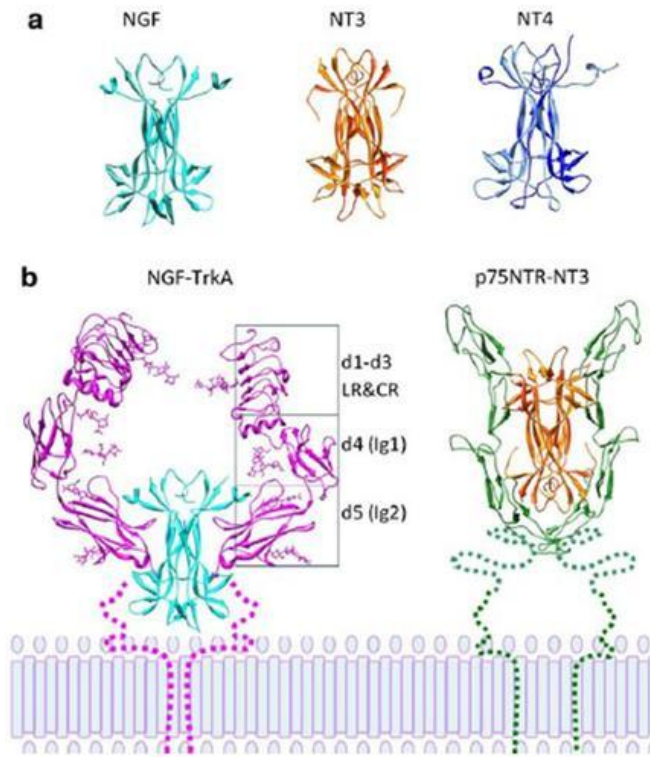


Figura I.4. Extraída y adaptada de Allen *et al.* (Allen *et al.* 2013). (a) Estructura cristalina por rayos X de las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT4 (o NT-4/5). (b) Estructura cristalina por rayos X de los receptores y ejemplos de unión con neurotrofinas: NGF-TrkA y NT-3-p75.

Otros factores neurotróficos importantes e independientes de la familia de las neurotrofinas incluyen el VEGF, asociado con la plasticidad neuronal inducida por reemplazamiento neuronal (Llorens-Martin *et al.* 2009) y la neurogénesis hipocámpal adulta (Jin *et al.* 2002); la EPO que estimula la angiogénesis y la neurogénesis probablemente mediante la modulación de BDNF y VEGF (Wang *et al.* 2004); y el GDNF que induce efectos tróficos en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Lin *et al.* 1993), en las no adrenérgicas del *locus coeruleus* y de

las neuronas motoras periféricas (Zurn *et al.* 1994; Arenas *et al.* 1995; Zurn *et al.* 1996).

1.3. Vías de señalización de las neurotrofinas

Las neurotrofinas mantienen la neuroplasticidad de manera actividad-dependiente a través de vías de señalización que inducen supervivencia, diferenciación y crecimiento (Neeper *et al.* 1995; Neeper *et al.* 1996; Vaynman & Gomez-Pinilla 2005; Hennigan *et al.* 2007). No obstante, su función no se limita sólo a la mediación neurobiológica sino que también juegan importantes papeles en el metabolismo energético periférico (Pedersen *et al.* 2009) y neuronal (Cheng *et al.* 2012; Gomez-Pinilla & Tyagi 2013; Agrawal *et al.* 2014).

Como se ha explicado anteriormente las neurotrofinas se unen a dos tipos de receptores: los receptores específicos, de la familia de Trk; y el inespecífico, p75 (Chao 2003). Su unión a cada receptor dependerá fundamentalmente de si las neurotrofinas han sido correctamente convertidas en factores maduros o si median sus efectos como pro-neurotrofinas (**Figura I.5**).

Figura I.5. Representación esquemática de las isoformas de las neurotrofinas y sus pro-isoformas.

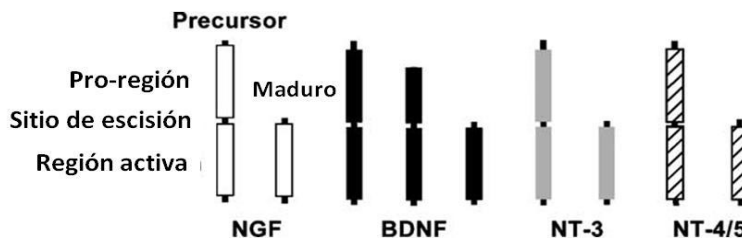


Figura I.5. Extraída y modificada de Roux & Barker (Roux & Barker 2002).

La vía de señalización molecular mediada por cada tipo de receptor, Trk o p75, es completamente distinta (Chao & Hempstead 1995) como muestra la **Figura I.6**. Así, cuando las neurotrofinas se unen al receptor p75 median rutas apoptóticas (Dechant & Barde 1997; Chao 2003). Las vías de señalización por las cuales actúan incluyen el NRIF (por sus siglas en inglés, *neurotrophin-receptor interacting factor*), el NADE (por sus siglas en inglés, *neurotrophin associated cell death executor*), el NRAGE (por sus siglas en inglés, *neurotrophin-receptor-interacting MAGE homologue*), SC1 (por sus siglas en inglés, *Schwann cell 1*) y RIP2 (por sus siglas en inglés, *receptor-interacting protein 2*) (Hempstead 2002; Roux & Barker 2002). Esta señalización lleva a la activación de las caspasas y consecuentemente a ejecutar señales apoptóticas que conducen a la muerte neuronal (Salehi *et al.* 2002; Chao 2003; Allen *et al.* 2013).

Por el contrario, la unión de las neurotrofinas con su receptor Trk específico conduce a la dimerización del mismo y a su autofosforilación (Chao 2003). Esto activa fundamentalmente 3 vías de señalización que implican a las protein quinasas activadas por mitógenos (MAPKs por sus siglas en inglés, *mitogen-activated protein kinases*), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K por sus siglas en inglés, *phosphoinositide 3-kinase*) y fosfolipasa C- γ (PLC γ por sus siglas en inglés, *phosphoinositide phospholipase C γ*) (Jang *et al.* 2010). Esta regulación activa el factor de transcripción CREB (por sus siglas en inglés, *cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element-binding protein*), considerado como el regulador más importante de los genes tróficos en el cerebro (Carlezon *et al.* 2005) (**Figura I.6**).

Figura I.6. Vías de señalización de las neurotrofinas a través de sus receptores Trk y p75.

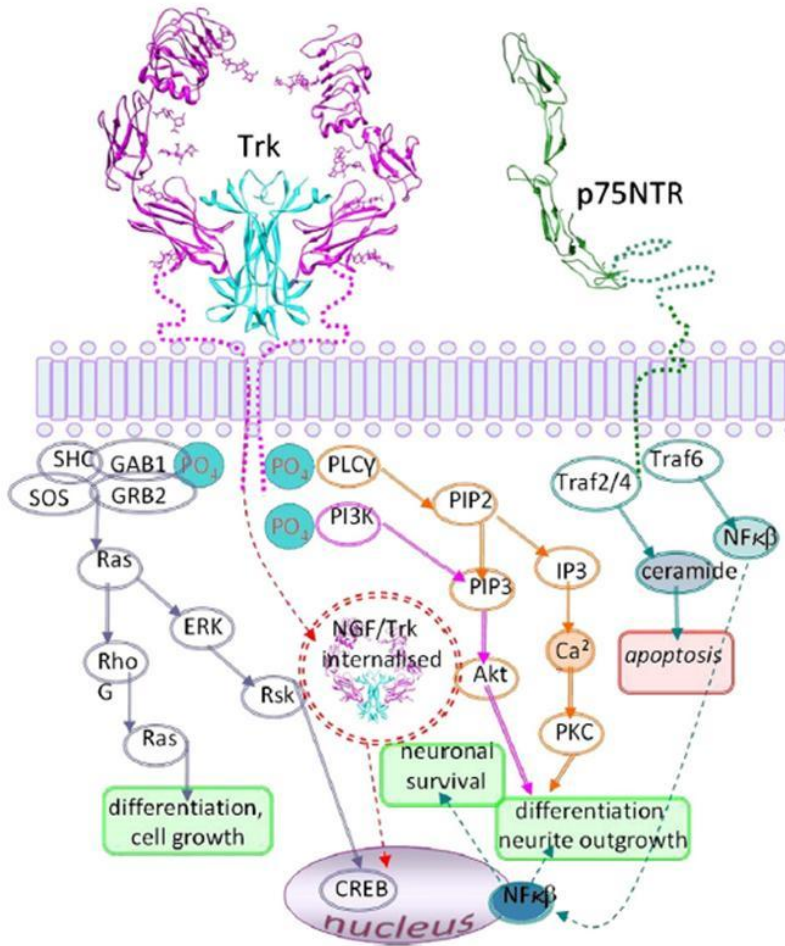


Figura I.6. Extraída de Allen et al. (Allen et al. 2013). Esquema simplificado sobre algunas de las vías de señalización mediadas por Trk y p75. Abreviaturas importantes no definidas en el texto: Akt (proteína quinasa B), PKC (proteína quinasa dependiente del calcio), NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas).

A través de la regulación génica mediada por CREB se producen los efectos neurotróficos que incluyen la modulación de las ramificaciones dendríticas y la

morfología de las espinas dendríticas (Horch & Katz 2002; Tanaka *et al.* 2008) así como la plasticidad sináptica y la LTP (Kang & Schuman 1995; Figurov *et al.* 1996), entendida como una intensificación duradera en la transmisión de señales entre neuronas y considerada el mecanismo celular que subyace al aprendizaje y la memoria (Bliss & Collingridge 1993). Las neurotrofinas, y fundamentalmente BDNF, modulan la función metabólica hipotalámica (Xu *et al.* 2003; Cao *et al.* 2009; Nagahara & Tuszynski 2011) y la neurogénesis adulta (Rossi *et al.* 2006; Bath *et al.* 2012). Además, recientemente se ha descubierto cómo BDNF vía CREB activa PGC-1 α (por sus siglas en inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha*) y con ello la biogénesis mitocondrial. PGC-1 α ha demostrado a su vez un importante papel en la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas neuronales (Cheng *et al.* 2012)

Tanto las vías mediadas por los receptores de las neurotrofinas como los genes inducidos mediante la activación del factor de transcripción CREB son vías de señalización comunes con otros contextos y moduladas por otros factores. Es por ello que se desconocen los mecanismos específicos inducidos por una respuesta particular (Chao 1992a). Como se puede apreciar en la **Figura I.7**, la activación de CREB viene mediada también por GluR1Rs (por sus siglas en inglés, *glutamate receptor subunit Glu1 homomeric AMPA receptors*), receptores de NMDA, canales de calcio y proteína G acoplada a receptores (Carlezon *et al.* 2005). Finalmente la activación de CREB, a través de su fosforilación, lleva a la inducción de diversos genes como el de la tiroxina hidroxilasa (TH), dinorfina, CREM (por sus siglas en inglés, *cAMP response element modulator*), GluR1, Fos, el factor liberador de corticotropina (CRF por sus siglas en inglés, *corticotropin releasing factor*) y el mismo BDNF (Carlezon *et al.* 2005) cerrándose con él un bucle positivo.

Figura I.7. Vías de señalización celular implicadas en la regulación de CREB.

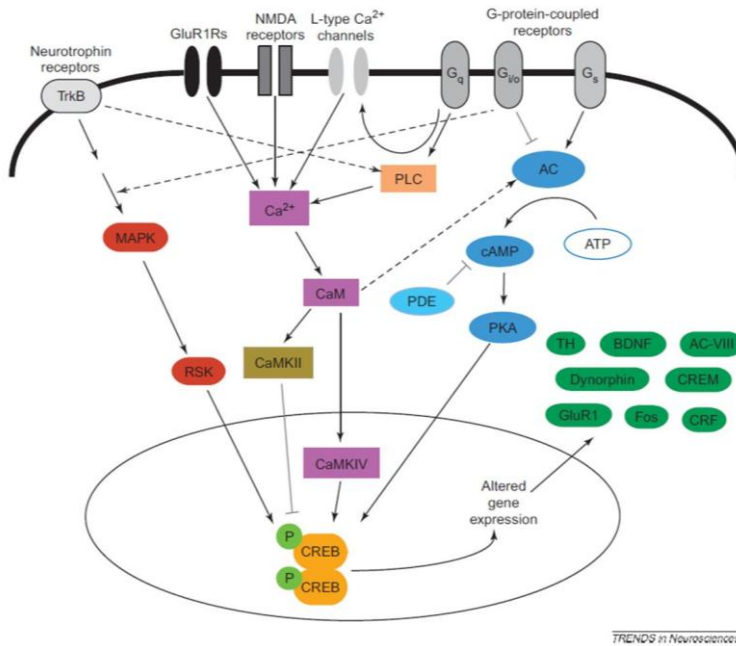


Figura I.7. Extraída de Carlezon et al. (Carlezon et al. 2005).

La señalización molecular mediada por las neurotrofinas, y especialmente por BDNF, median la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje (Vaynman & Gomez-Pinilla 2006). Además, la utilización de métodos basados en la inyección de micropartículas para bloquear farmacológicamente vías moleculares concretas ha ayudado a elucidar la contribución de las distintas vías en la mediación de la plasticidad sináptica regulada por BDNF (Vaynman *et al.* 2003). El BDNF regula la sinapsina 1, una fosfoproteína localizada en la membrana presináptica; y la sinaptofisina, una importante proteína de las vesículas sinápticas (Vaynman *et al.* 2006). Sinapsina 1 modula la liberación de vesículas uniéndolas a la actina del citoesqueleto neuronal (Greengard *et al.* 1993). Así, inhibiendo sinapsina 1 se

reduce la reserva de vesículas sinápticas y la liberación de neurotransmisores (Hilfiker *et al.* 1999). La delección de *BDNF* reduce las proteínas sinápticas, empeora la liberación de neurotransmisores y finalmente conduce a fatiga sináptica y a reducir los niveles de sinapsina 1 (Pozzo-Miller *et al.* 1999). Por su parte, la sinaptofisina media la biogénesis de vesículas sinápticas y la funcionalidad de las membranas (Thiele *et al.* 2000).

2. Enfermedad de Alzheimer

En 1901 ingresó una mujer de 51 años, Auguste Deter, en el Hospital de Enfermedades Mentales y Epilepsia de Frankfurt. El Dr. Emil Kraepelin evaluó su cuadro clínico que, tras cinco años de evolución, se inició con delirios que dieron paso a una progresiva pérdida de memoria acompañada de alucinaciones, trastornos de conducta, desorientación y afectaciones en el lenguaje. Finalmente murió en 1906. El Dr. Alois Alzheimer y colaboradores realizaron el estudio histológico del cerebro de la paciente describiendo la presencia de lo que hoy conocemos como placas seniles, formados por el depósito de β -amiloide (β A); ovillos neurofibrilares y cambios morfológicos y arterioscleróticos (**Figura I.8**) (Alzheimer 1907). De dicho estudio nació el nombre epónimo de la enfermedad, acuñado por el propio Dr. Kraepelin.

Figura I.8. Dibujos originales del Dr. Alzheimer. Ovillos neurofibrilares y placas amiloideas

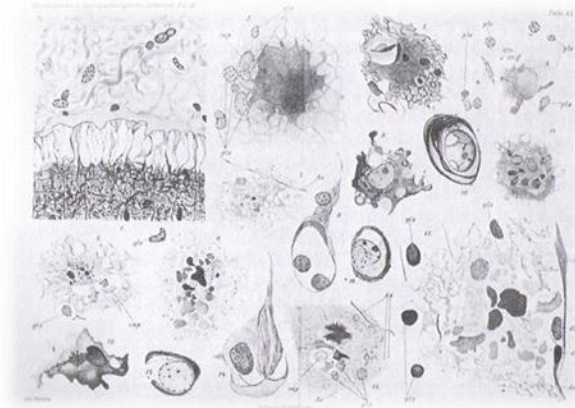


Figura I.8. Extraída de Goñi (Goñi 2010).

2.1. Prevalencia de la enfermedad de Alzheimer

En la actualidad sabemos que la enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo, y por tanto asociado a la edad. Más de 35 millones de personas en el mundo padecen Alzheimer; 5.5 millones de ellas en Estados Unidos (Querfurth & LaFerla 2010) y unas 700,000 en España (Bermejo-Pareja 2007). De todas las causas de demencia, la enfermedad de Alzheimer prevalece en un 50-56% mientras que un 13-17% adicional es causado por la enfermedad de Alzheimer combinada con enfermedades cerebrovasculares (Querfurth & LaFerla 2010). La prevalencia de la enfermedad se dobla cada cinco años a partir de los 60. Así, ésta evoluciona siguiendo la progresión: 1% a los 60 años; 2% a los 65 años; 4% a los 70 años; y 8% a los 75 años.

La enfermedad de Alzheimer tiene dos formas de presentarse, la familiar y la esporádica. La forma familiar o hereditaria se debe a causas genéticas y suele producirse entre los 40 y 65 años. Los genes implicados son fundamentalmente el

gen de la proteína precursora del β A (*APP* por sus siglas en inglés, *amyloid- β precursor protein*) en un 5%; y los genes *S182* y *STM-2* que codifican para las proteínas presenilina 1 y 2 (*PSEN1*, *PSEN2*) que corresponden a un 80% de los casos. La forma familiar supone alrededor de un 10% del total (Hardy *et al.* 1989; Schellenberg *et al.* 1992; Rogaev *et al.* 1995).

La forma esporádica de Alzheimer se origina en la gran mayoría de los casos de manera idiopática aunque existen diversos factores de riesgo entre los que caben destacar los cardiovasculares (Altman & Rutledge 2010), la diabetes de tipo 2 (Yang & Song 2013), o la posesión del alelo ϵ 4 para la apolipoproteína E (*apoE*) (Corder *et al.* 1993; Meyer *et al.* 1998). Otros factores de origen ambiental también han demostrado jugar un papel importante en la etiología de la enfermedad como por ejemplo las dietas altas en ácidos grasos y carbohidratos simples (Hsu & Kanoski 2014) o la inactividad física (Rolland *et al.* 2008).

2.2. Sintomatología de la enfermedad de Alzheimer

El paciente de Alzheimer presenta un ecléctico cuadro de síntomas que incluyen desde alteraciones cognitivas y neurológicas hasta conductuales. Los trastornos cognitivos se caracterizan por el deterioro precoz y progresivo de la memoria, manifestado por una incapacidad para adquirir nueva información y para recordar aquella ya adquirida. Cuando el déficit cognitivo se agrava, el paciente está desorientado temporal y espacialmente, presenta alteraciones en el lenguaje y es incapaz de razonar frente a determinadas situaciones. Las alteraciones conductuales incluyen agresividad, delirios, depresión, alucinaciones y cambios en el ritmo de sueño. Por último, las anomalías neurológicas periféricas se manifiestan mediante la aparición de un aumento del tono muscular, dificultando ciertos movimientos en las extremidades y la pérdida del control de los esfínteres. En algunos casos pueden aparecer crisis epilépticas. Todos estos síntomas están asociados a una serie de

alteraciones genéticas, neuroquímicas y morfológicas que afectan a la mayoría de los centros cognitivos, tales como el lóbulo temporal, el hipocampo y parte del sistema límbico, así como las áreas de asociación presentes en la corteza frontal y parietal (Arendt 2001).

Se distinguen entre 3 fases en la evolución de la enfermedad de Alzheimer. En la primera el paciente presenta deterioro cognitivo leve. Las alteraciones son mínimas y no afectan a la autonomía de la persona. Sus signos más claros son pérdidas de memoria leves, reducción de la expresión en el lenguaje y dificultad a la hora de realizar tareas complejas. En la fase siguiente se presenta un descenso de las capacidades descritas para la fase leve. En este punto el paciente ya no es completamente independiente. En el último punto, considerada la forma severa de Alzheimer, el paciente es completamente dependiente para todas las actividades, incluso las más básicas, como comer o beber. Pierde el control de los esfínteres, puede desarrollar incapacidad para hablar y comportamientos catatónicos (Alberca 2005; Desai & Grossberg 2005).

2.3. Factores de riesgo e hipótesis etiológica de la enfermedad de Alzheimer

La etiología de la enfermedad de Alzheimer no es conocida completamente. Si bien es cierto que se ha avanzado mucho en la comprensión bioquímica, molecular y clínica de la enfermedad, mejorando así la calidad de vida de los pacientes, no existe un tratamiento efectivo que evite su avance degenerativo. Las potenciales hipótesis etiopatológicas que se barajan comprenden un intrincado e interrelacionado conjunto de mecanismos de desregulación molecular.

La disminución en los niveles de acetilcolina se ha postulado como responsable de las afectaciones cognitivas (Bartus *et al.* 1982). De ahí que uno de los fármacos más ampliamente prescritos en enfermos de Alzheimer sean los anticolinesterásicos.

Por otro lado, la hipótesis amiloidea, causada por la acumulación de β A, es una potencial teoría apoyada por numerosas investigaciones (Glenner & Wong 1984; Masters *et al.* 1985). Su importancia estriba en que este péptido está asociado con alelos mutados en genes relacionados con la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar. Las mutaciones en *APP* (Kang *et al.* 1987) o *S182* y *STM-2* (Cruts *et al.* 1995; Hutton *et al.* 1996) codifican proteínas involucradas en la formación de β A (Jankowsky *et al.* 2004). Como se verá más adelante, la deposición de este péptido se ha considerado el eje principal de la enfermedad (Hardy & Selkoe 2002).

Otra hipótesis etiopatológica es la hiperfosforilación de la proteína tau (Grundke-Iqbal *et al.* 1979; Grundke-Iqbal *et al.* 1986). Su fosforilación normal está implicada en el mantenimiento de la estructura de los microtúbulos de la célula, mientras que la desregulación en su fosforilación da lugar a estructuras intracelulares conocidas como ovillos neurofibrilares que llevan a la célula a la muerte (Lace *et al.* 2007).

Por último, señalar la hipótesis del estrés oxidativo que, como el resto, se desconoce si es causa o consecuencia con respecto al resto de alteraciones fisiológicas. No obstante, numerosos estudios, incluyendo los resultados de la presente Tesis Doctoral, han evidenciado que el daño oxidativo ocasionado en el tejido cerebral por los radicales libres es un importante factor en el desarrollo de distintas enfermedades neurodegenerativas y concretamente en la enfermedad de Alzheimer (Subbarao *et al.* 1990; Balazs & Leon 1994; Lovell *et al.* 1995; Sayre *et al.* 1997).

Existen también diversos factores de riesgo biológicos y psicosociales para la enfermedad de Alzheimer. En primer lugar, destacar la edad como el mayor factor de riesgo (Schonberger *et al.* 2001). En cuanto al sexo, las mujeres muestran mayor frecuencia frente a los hombres (Molsa *et al.* 1982; Jorm *et al.* 1987; Gussekloo *et*

al. 1995). A continuación se muestra la **Tabla I.2** de factores de riesgo para la enfermedad de Alzheimer.

Tabla I.2. Factores de riesgo biológicos, psicosociales y de personalidad en la enfermedad de Alzheimer.

Biológicos	Psicosociales	Personalidad
ApoE	Bajo nivel cultural	Depresiva
Edad avanzada	Inactividad psicosocial	Sumisa
Síndrome de Down	Inactividad física	Introvertida
Alteraciones en cromosomas 14 y 21	Trabajos manuales	Pesimista
Trauma craneal	Dieta alta en grasa y carbohidratos simples	
Sexo: femenino		
Zona geográfica: Europa, África y América		
Raza afroamericana		
Tóxicos: tabaco, alcohol, aluminio, etc.		

Tabla I.2. Extraída de Garcia-Mesa et al. (Garcia-Mesa et al. 2011a) y elaborada desde Siest et al.; Bird; y Lahiri & Maloney (Siest et al. 1995; Bird 2008; Lahiri & Maloney 2010).

2.4. Climaterio femenino y enfermedad de Alzheimer

La esperanza de vida es superior en las mujeres que en los hombres. Ello ha dado pie a sugerir que la mayor prevalencia de mujeres con enfermedad de Alzheimer se debe simplemente a que hay una mayor proporción de mujeres que de hombres con edad avanzada. Asimismo, se ha postulado que existe un riesgo de Alzheimer en la menopausia. Sin embargo, diferentes cohortes han demostrado que no existe un

efecto del sexo en el riesgo de desarrollar Alzheimer (Rocca *et al.* 1998; Hebert *et al.* 2001; Barnes *et al.* 2003). No obstante, el hecho de que existen más mujeres que hombres con Alzheimer ha llevado a investigar terapias específicas.

La terapia estrogénica ha demostrado ser neuroprotectora en distintos modelos experimentales (Vina *et al.* 2011). Sin embargo, ensayos clínicos con terapia hormonal han resultado inconsistentes e incluso negativos en relación a las alteraciones cognitivas asociadas a la demencia (Maki & Henderson 2012). Asimismo, los ratones ovariectomizados, modelo de menopausia en roedores, desarrollan declive cognitivo (Su *et al.* 2012). En ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer la ovariectomía induce un empeoramiento de la patología (Carroll *et al.* 2010) así como una disfunción mitocondrial exacerbada (Yao *et al.* 2012).

2.5. Mecanismos moleculares involucrados en la enfermedad de Alzheimer

De los eventos neurofisiopatológicos que tienen lugar en la enfermedad de Alzheimer, caben destacar las placas seniles, formadas por β A y otros agregados; y los ovillos neurofibrilares, formados por la hiperfosforilación de tau. La pérdida neuronal y sináptica, la angiopatía congófila, alteraciones mitocondriales, inflamación y el daño oxidativo son otros importantes marcadores fisiológicos y morfológicos de la enfermedad (Selkoe 2000; Reddy & Beal 2008; Querfurth & LaFerla 2010). A continuación se describen en profundidad los mecanismos moleculares y características fenotípicas más importantes.

2.5.1. Placas seniles

Las placas seniles son masas compuestas por un núcleo central amiloideo rodeado de neuritas distróficas. Estas neuritas poseen astrocitos, microglía y restos de

lisosomas, mitocondrias y vesículas sinápticas resultantes del daño neuronal adyacente (Glennner & Wong 1984; Dickson 1997). Las placas y los ovillos neurofibrilares pueden encontrarse también en cerebros de personas sanas de avanzada edad (Seubert *et al.* 1992). Sin embargo, en la enfermedad de Alzheimer la distribución y alta densidad de estos agregados conlleva una interrupción de los circuitos neuronales (Hof & Morrison 1996).

El β A, de unos 4 KDa, proviene de la proteólisis del APP, una proteína transmembrana con un largo segmento amino-terminal extracelular y uno corto carboxilo-terminal intracelular, cuyo gen se localiza en el cromosoma 21. Este gen es codificado y expresado en diversos tipos de tejidos como el endotelio, la glía y las neuronas cerebrales (Schmechel *et al.* 1988). Una vez sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, la APP migra al aparato de Golgi donde adquiere su conformación estructural llegando finalmente a la membrana plasmática mediante vesículas de secreción. El APP es una glicoproteína que puede ser procesada proteolíticamente por dos vías competitivas, la no amiloidogénica y la amiloidogénica, la cual forma β A (Kang *et al.* 1987; Ponte *et al.* 1988). Ciertas mutaciones, como la “*Swedish*” (Swe) (KM594/595NL), inducen la sobreexpresión de este péptido (Yan *et al.* 1999). Esto ha llevado a hacer ratones transgénicos con este genotipo como los utilizados en la presente Tesis Doctoral.

El procesamiento de la APP se lleva a cabo mediante la acción de la α , β y γ secretasas. La α -secretasa está involucrada en la vía no amiloidogénica ya que corta dentro del dominio β A produciéndose el ectodominio α -APP soluble y el fragmento carboxilo-terminal C83 anclado a la membrana (Kang *et al.* 1987; Verdile *et al.* 2007). La vía amiloidogénica viene representada por la β -secretasa (BACE) que corta la región amino terminal del dominio β A liberando formas solubles, β -APPs y la región carboxilo terminal (C99) conteniendo el dominio β A. La actividad de BACE está aumentada en la enfermedad de Alzheimer (Fukumoto *et al.* 2002). El paso final de la vía amiloidogénica es llevado a cabo por la enzima

γ -secretasa, formada por las proteínas presenilinas (PSEN1 y PSEN2). La γ -secretasa corta el fragmento intermembranoso C83 y C99 liberando péptidos β A de diferente longitud. Las formas más largas, de 42 y 43 aminoácidos (β A-42 y β A-43) provenientes del fragmento C99, forman agregados dando lugar a las placas seniles (Kang *et al.* 1987; Verdile *et al.* 2007). Las formas más cortas, de 39 y 40 aminoácidos (β A-39 y β A-40) producidas desde el fragmento C83, se acumulan en los vasos sanguíneos o son liberados a la sangre y al líquido cefalorraquídeo (Prelli *et al.* 1988). Es por ello que la γ -secretasa es considerada una importante diana terapéutica frente a la sobreproducción de β A (He *et al.* 2010) (**Figura I.9**).

Figura I.9. Procesamiento de la proteína precursora de β A.

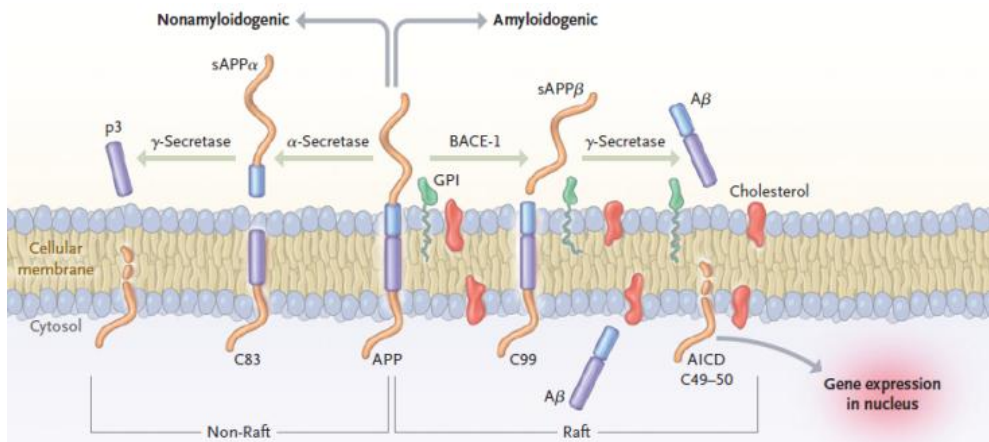


Figura I.9. Extraída de Querfurth & LaFerla (Querfurth & LaFerla 2010).

La forma soluble del β A (1-40) forma parte del metabolismo normal de las células mientras el β A (1-42) está asociado a procesos patológicos como la enfermedad de Alzheimer (Scheuner *et al.* 1996). Alteraciones en el balance entre producción y aclaramiento causan la acumulación del β A según postula la “hipótesis amiloidea”

(Querfurth & LaFerla 2010). Niveles fisiológicos de β A en sinapsis pueden disminuir la transmisión excitadora y prevenir la hiperactividad neuronal (Kamenetz *et al.* 2003). Los agregados intracelulares de β A inducen toxicidad celular y han demostrado saturar el sistema ubiquitina-proteasoma, impidiendo la eliminación de otras sustancias tóxicas como la proteína tau hiperfosforilada. Asimismo, el β A genera disfunción mitocondrial y apoptosis ya que desde el núcleo induce mecanismos de duplicación del ADN (Querfurth & LaFerla 2010). Esto lleva a la célula a una mitosis alterada que desemboca en un proceso apoptótico (Ohyagi 2008).

Los oligómeros de β A extracelulares se unen a la membrana celular induciendo vías pro-apoptóticas y un efecto pro-oxidante. Por otro lado generan mecanismos intracelulares que provocan una menor fosforilación de la glucógeno sintasa quinasa (GSK3 por sus siglas en inglés, *glycogen synthase kinase 3*), aumentando su funcionalidad y por tanto promoviendo la hiperfosforilación de la proteína tau (Hernandez *et al.* 2009). Los efectos neuroinmunológicos que pueden producir los agregados de β A se basan en una autoinmunidad poco específica. Así, los oligómeros se unen a diferentes receptores de inmunidad innata estimulando mecanismos de defensa a través de una inflamación crónica (Salminen *et al.* 2009).

Los depósitos de β A disminuyen la LTP, implicada en procesos de memoria y aprendizaje (Kim & Tsai 2009; Lauren *et al.* 2009). La afectación sináptica producida por el péptido β A ocurre a varios niveles. En la post-sinapsis, las espinas dendríticas tienen un modelado continuo de formación y eliminación. La estabilización de este proceso y su terminación presináptica juegan un importante papel en el aprendizaje. Los oligómeros de β A inducen cambios en la forma de las espinas y reduce su número en regiones como el hipocampo (Naylor *et al.* 2008). Además las células más sensibles a estos efectos son aquellas que presentan un mayor árbol dendrítico y cuyas regiones anatómicas son las primeras en verse afectadas en la enfermedad de Alzheimer (Naylor *et al.* 2008).

Mencionar también el papel del receptor lipoproteico de baja densidad asociado a proteína 1 (LRP1) que media la salida de β A del cerebro desde la barrera hematoencefálica (Trommsdorff *et al.* 1998; Pflanzner *et al.* 2011) así como su formación (Kounnas *et al.* 1995; Ulery *et al.* 2000). También la enzima degradadora de insulina (IDE por sus siglas en inglés, *insulin-degrading enzyme*), considerada una de las peptidasas más importantes en la degradación del β A citoplasmático (Stargardt *et al.* 2013).

2.5.2. Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares constan de un componente proteico, principalmente tau hiperfosforilada, y uno no proteico, formado por glucosaminoglicanos y ácidos grasos entre otros (Querfurth & LaFerla 2010). Estos acúmulos se forman en distintas regiones cerebrales como el lóbulo temporal y parietal de la corteza, afectando posteriormente al hipocampo y otras áreas de asociación. Algunos estudios establecen una relación lineal entre la cantidad de ovillos neurofibrilares y el grado de afectación de la demencia (Arriagada *et al.* 1992).

La proteína tau es una proteína neuronal hidrofílica perteneciente a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos. En condiciones fisiológicas facilita el ensamblaje de la tubulina estabilizando la organización de los microtúbulos, lo cual permite mantener las prolongaciones citoplasmáticas típicas de las células nerviosas y su estructura (Weingarten *et al.* 1975). Cuando tau está hiperfosforilada, se produce un cambio conformacional de la molécula que impide su unión a los microtúbulos, desestabilizándolos y favoreciendo la agregación de esta proteína. Los cambios en tau llevan a formar haces de filamentos pareados de disposición helicoidal que favorecen su aglomeración (Kosik *et al.* 1986). No obstante, en condiciones fisiológicas, la fosforilación de tau permite su unión con los microtúbulos estructurales de la célula. *In vitro* se conocen muchas proteínas

capaces de fosforilar tau como las MAPKs; la proteína quinasa dependiente de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC); la PKC; y la GSK3 entre otras. *In vivo* se desconoce cuál de estas quinasas es la principal responsable. GSK3 participa en la fosforilación de tau tanto en condiciones normales como patológicas. De esta manera se ha detectado que el β A incrementa la fosforilación de tau mediada por GSK-3 β , favoreciendo así su agregación (Avila *et al.* 2004).

El desensamblaje de los microtúbulos provocado por la hiperfosforilación de tau provoca cambios en el armazón celular así como en estructuras subcelulares como las mitocondrias y los lisosomas. Esto lleva a una interrupción de la neurotransmisión (Grundke-Iqbal *et al.* 1986; Lee *et al.* 1991; Gotz *et al.* 2007), de las sinapsis, así como a una inducción de la muerte neuronal por apoptosis (Alonso *et al.* 1997).

2.5.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies 1985). Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias pro-oxidantes o radicales libres, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez. A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunos radicales libres, éstos pueden dar lugar a reacciones de oxidación, contra las cuales los organismos han desarrollado defensas antioxidantes (Moorhouse *et al.* 1987).

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso fisiológico normal (Slater 1984), ya que son producto de multitud de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. Estas especies reactivas no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes. Sin embargo, cuando la capacidad de los

mecanismos antioxidantes se ve superada por las agresiones oxidativas, se produce un daño a biomoléculas como los lípidos, las proteínas, los glúcidos o el ADN.

En la enfermedad de Alzheimer, el estrés oxidativo es considerado como una etiología coadyuvante de gran importancia (Balazs & Leon 1994; Smith *et al.* 1996; Markesbery 1997; Pratico 2008). El sistema nervioso central es especialmente vulnerable al estrés oxidativo por tener una alta tasa de consumo de oxígeno, abundante contenido lipídico (rico en ácidos grasos poliinsaturados), alteraciones de la función mitocondrial, alto contenido en metales y relativa escasez de enzimas antioxidantes comparado con otros tejidos (Coyle & Puttfarcken 1993; Pratico 2008).

2.5.3.1. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de molécula, que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital externo. Tienen una vida media del orden de milisegundos debido a su gran reactividad, aunque varía según el tipo de radical libre. En el medio biológico, los radicales libres son compuestos generalmente oxigenados y por tanto denominados especies reactivas de oxígeno (Sastre *et al.* 1992). Los organismos aeróbicos están asociados a una producción de radicales libres que son responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas (Sies 1993; Halliwell 1996). Los radicales libres están implicados en diferentes procesos patológicos como algunos tipos de cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, así como en procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Cross *et al.* 1987; Pratico 2008). También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Pacifci & Davies 1991; Bondy 1992) y el daño causado por el ejercicio físico agotador (Sastre *et al.* 1992; Alessio 1993), entre otros. Por otro lado existen radicales libres nitrogenados o especies reactivas

del nitrógeno, cuya importancia ha crecido considerablemente en los últimos tiempos.

En la enfermedad de Alzheimer las fuentes de especies pro-oxidantes en el sistema nervioso central incluyen alteraciones en el metabolismo mitocondrial, la acumulación del péptido β A, así como el alto contenido en metales (Reddy & Beal 2008). El cerebro posee un alto contenido en oligoelementos tales como el aluminio, el mercurio y el hierro (Ehmann *et al.* 1986). Aunque todos estos elementos juegan un importante papel en la formación de radicales libres, el hierro tiene especial importancia fisiopatológica por su rol como catalizador en la generación de radicales libres. A través de la reacción de *Fenton*, el catión del hierro es capaz de producir peróxidos, hidroxilos y peróxidos de hidrógeno altamente reactivos (Goodman 1953; Markesbery 1997).

El β A interfiere en las mitocondrias donde incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno produciéndose así un exceso de estrés oxidativo (Pratico 2008; Vina & Lloret 2010) y un daño mitocondrial que puede conducir a vías apoptóticas (Querfurth & LaFerla 2010) (**Figura I.10**).

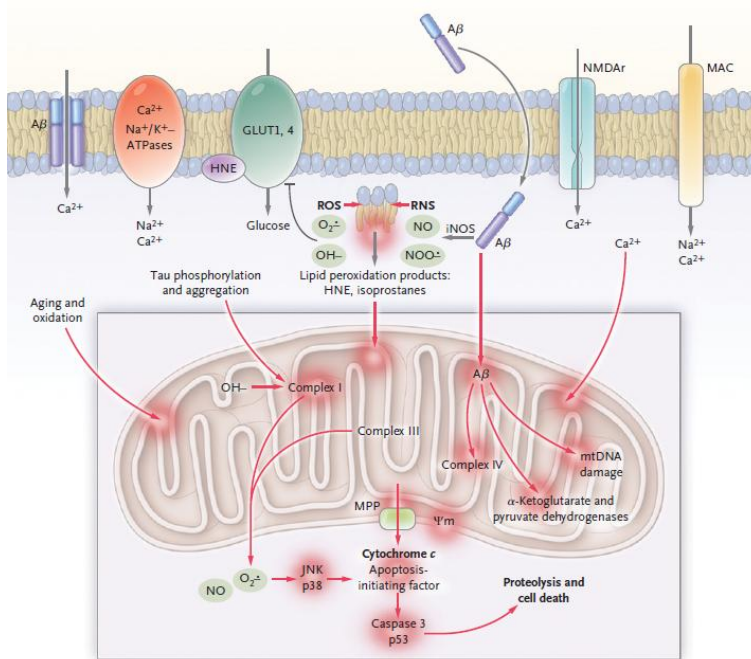
Figura I.10. β A, estrés oxidativo y alteración mitocondrial.

Figura I.10. Extraída de Querfurth & LaFerla (Querfurth & LaFerla 2010).

La agregación de β A está relacionada con neurotoxicidad y su adherencia desencadena una sobreproducción de radicales libres (Vina & Lloret 2010). Gran parte de la producción de especies reactivas se debe a la alteración del normal funcionamiento mitocondrial causado por la presencia intracelular de β A (Pereira *et al.* 1998). La implicación de la mitocondria en los mecanismos patogénicos de la toxicidad amiloidea se estableció cuando se describió cómo células con carencias en mitocondrias estaban más protegidas frente a la toxicidad del β A (Cardoso *et al.* 2001; Werckenthin *et al.* 2001). El β A bloquea la respiración mitocondrial (Pereira *et al.* 1999; Casley *et al.* 2002). De esta forma, cuando el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria es bloqueado, la producción de especies reactivas del oxígeno por la mitocondria incrementa significativamente. Un 0.15% del

consumo de oxígeno que emplea la mitocondria es transformado en superóxido en vez de en agua en condiciones normales (St-Pierre *et al.* 2002). Sin embargo, cuando la respiración mitocondrial incrementa, esta proporción de superóxido disminuye. Por tanto, el menor ratio de respiración mitocondrial causado por el bloqueo de la cadena de transporte electrónico incrementa la producción de radicales libres (Cardoso *et al.* 2001; Vina & Lloret 2010). El β A tiene tendencia a unirse con los grupos hemo de las moléculas presentes en la cadena de transporte electrónico (Vina & Lloret 2010), dando lugar a una alteración en la función normal de la cadena de transporte electrónico (Atamna & Boyle 2006). Asimismo, experimentos *in vitro* han demostrado que incubando la mitocondria en presencia de β A se produce un incremento de radicales libres. Esto es prevenido mediante una pre-incubación de β A con hierro. Así se demuestra así el papel protector del hierro en la producción de estrés oxidativo por β A, ya que este metal compite con el de los complejos de la cadena de transporte electrónico (Lloret *et al.* 2008). Por otro lado, la adición de β A a cultivos de neuronas hipocampales ha demostrado acumular peróxido de hidrógeno (Mattson *et al.* 1995) y producir una marcada peroxidación lipídica (Butterfield *et al.* 1994). Estudios realizados en cerebros de pacientes con Alzheimer *post-mortem* y ratones transgénicos también muestran que β A y APP pueden estar localizados en las membranas mitocondriales donde bloquean el transporte de proteínas produciendo alteraciones en la cadena de transporte electrónico y en consecuencia daño en la célula (Reddy & Beal 2008).

2.5.3.2. Daño oxidativo

Existen evidencias de que el estrés oxidativo ocurre de forma precoz en la enfermedad de Alzheimer. En modelos animales la peroxidación lipídica cerebral precede a las alteraciones estructurales (Pratico *et al.* 2001) y a procesos

fisiopatológicos como la formación de placas seniles u ovillos neurofibrilares (Nunomura *et al.* 2001).

Los aminoácidos tienen residuos susceptibles de ser dañados por los radicales libres, especialmente por el radical hidroxilo (Stadtman 1992). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y con ello a una pérdida o modificación de su función biológica. El estrés oxidativo cerebral de pacientes con Alzheimer está marcado por una elevada oxidación proteica, mostrando niveles elevados de carbonilación y nitración de los residuos de tirosina. Las dianas del estrés oxidativo son principalmente enzimas relacionadas con la generación de ATP. Por tanto, esta modificación oxidativa de proteínas puede producir alteraciones metabólicas (Zhu *et al.* 2004).

El ADN es susceptible al daño oxidativo en todos sus componentes. El oxígeno es capaz de adicionarse a las bases y al azúcar del ADN formando radical peroxilo. Las posteriores reacciones de estas especies reactivas en el ADN dan lugar a numerosos productos como la 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8-oxodG). Los niveles de esta molécula se utilizan como índice del daño oxidativo al ADN.

Ya que la mitocondria es una de las fuentes y dianas más importantes del daño oxidativo con la edad (Gomez-Cabrera *et al.* 2012), el ADN mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el ADN nuclear (Hellsten *et al.* 1997). El genoma mitocondrial presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes. Éste carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del ADN; su sistema de reparación es poco efectivo (Shen *et al.* 1995) y se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de especies reactivas del oxígeno (Giulivi 1998). Se ha encontrado un daño oxidativo hasta tres veces mayor en el ADN mitocondrial de la corteza parietal de los pacientes de Alzheimer con respecto a controles sanos (Mecocci *et al.* 1994).

Los lípidos, y fundamentalmente los ácidos grasos poliinsaturados, son las biomoléculas más susceptibles de daño por los radicales libres. Su determinación viene dada fundamentalmente por los niveles de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE). La peroxidación lipídica es una reacción en cadena, de modo que el ataque por un solo radical libre da lugar a la formación de un gran número de especies reactivas, lo cual desemboca a su vez en la oxidación de una gran cantidad de biomoléculas, sobre todo aldehídos. Muchos de estos aldehídos formados reaccionan con los componentes celulares causando mutaciones en el ADN y produciendo daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Frei 1994). La lipoperoxidación en el cerebro se encuentra agravada en la enfermedad de Alzheimer (Sayre *et al.* 1997; Pratico *et al.* 2001)

2.5.3.3. Defensa antioxidante

El organismo produce antioxidantes para protegerse de la acción de los radicales libres. En 1995 Halliwell y Gutteridge definieron antioxidante como "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato" (Halliwell & Gutteridge 1995). Desde un punto de vista bioquímico, pueden clasificarse por su naturaleza enzimática o no enzimática. Entre los antioxidantes enzimáticos destacan la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) o de cobre-zinc (Cu/Zn-SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) y entre los no enzimáticos el glutatión, la vitamina C y E y los flavonoides entre otros.

Los antioxidantes pueden actuar en varios niveles: previniendo la formación de radicales libres, interceptando su ataque, secuestrando los metabolitos reactivos y transformarlos en moléculas menos reactivas, amplificando la resistencia de las dianas biológicas, e incluso favoreciendo la reparación del daño causado.

Al comparar la defensa antioxidante de pacientes Alzheimer con sujetos sanos se muestran incrementos de la enzima GPx en el hipocampo y la amígdala de los enfermos, siendo esta enzima una importante detoxificadora de peróxido de hidrógeno en el cerebro (Brigelius-Flohe 1999). También se ha descrito un incremento de la actividad CAT (Catlow *et al.* 2009) en hipocampo y giro dentado en los cerebros de los mismos (Lovell *et al.* 1995), regiones donde la peroxidación lipídica es significativamente mayor lo que sugiere que se produce una compensación en la actividad antioxidante como respuesta a la generación de radicales libres. Asimismo, estas regiones cerebrales son las más afectadas por la neurodegeneración y acumulación de materia tóxica en la enfermedad de Alzheimer (Arendt 2001).

Por otro lado, diferentes estudios no encuentran diferencias en la actividad de las enzimas Cu/Zn-SOD y Mn-SOD en el cerebro de los pacientes con Alzheimer (Kato *et al.* 1991; Balazs & Leon 1994; Gsell *et al.* 1995; Lovell *et al.* 1995). Por otro lado, según afirma Rice, el cerebro tiene riqueza antioxidante a través de sus niveles en GSH y ascorbato (Rice 2000).

2.5.4. Disfunción mitocondrial

Las alteraciones que sufren las mitocondrias en la enfermedad de Alzheimer están estrechamente relacionadas con el mayor estrés oxidativo. Las anomalías mitocondriales se producen tanto en neuronas como en astrocitos, ambos susceptibles de daño por radicales libres (Hirai *et al.* 2001; Abramov *et al.* 2004; Manczak *et al.* 2004). Así, en un estudio *post mortem* con cerebros de pacientes de Alzheimer y controles sanos se demostró un mayor daño oxidativo al ADN mitocondrial en las neuronas piramidales de los enfermos (Hirai *et al.* 2001).

Las mitocondrias que se encuentran en las terminaciones sinápticas son sintetizadas en el cuerpo neuronal y transportadas a las dendritas y axones donde realizarán sus

funciones energéticas (Wong-Riley 1989). Si la mitocondria del soma está dañada y es transportada al terminal sináptico puede contribuir a una alteración sináptica. Por otro lado, como se describió anteriormente, el β A puede potenciar la disfunción mitocondrial (Mungarro-Menchaca *et al.* 2002). En ratones transgénicos para Alzheimer, los oligómeros de β A producen una disminución de la energía metabólica en la fracción mitocondrial sinaptosomal. Diferentes investigadores han sugerido que la disfunción mitocondrial y la consecuente deficiencia del metabolismo energético son eventos tempranos que se correlacionan con afectaciones cognitivas de la enfermedad de Alzheimer (Eckert *et al.* 2003; Hauptmann *et al.* 2006; Keil *et al.* 2006; Eckert *et al.* 2008).

2.5.5. Factores neurotróficos en la enfermedad de Alzheimer

Los factores neurotróficos son potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de multitud de enfermedades neuropsiquiátricas (Fizman 2003; Nagahara & Tuszynski 2011; Autry & Monteggia 2012) como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Párkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Holtzman & Mobley 1994). Holtzman y Mobley relacionaron diferentes desórdenes neurológicos con los factores neurotróficos implicados en su fisiopatología. La enfermedad de Alzheimer podría incluir en sus dianas terapéuticas la modulación de NGF para las neuronas colinérgicas del cerebro anterior, así como BDNF, NT-3 y NT-4/5 para las neuronas neocorticales e hipocampales (Holtzman & Mobley 1994). No obstante, no sólo la acción efectiva de las neurotrofinas es importante sino la regulación de sus precursores, las pro-neurotrofinas. De esta manera, se ha demostrado que existe una menor eficiencia en la escisión de proNGF a NGF en pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer (Harrington *et al.* 2004). El proNGF es la forma predominante de NGF en cerebros humanos y murinos. En la enfermedad de Alzheimer, proNGF se encuentra incrementado en la corteza frontal

y occipital así como en el hipocampo. Por otro lado, se han descrito vínculos entre proNGF, APP y la formación de ovillos neurofibrilares (Schindowski *et al.* 2008).

Tanto el ARNm como los niveles de proteína BDNF están regulados a la baja en el hipocampo y neocortex de pacientes con Alzheimer (Murer *et al.* 2001) al igual que el receptor TrkB en hipocampo y corteza cerebral (Schindowski *et al.* 2008). BDNF regula GSK-3 β incrementando su fosforilación lo cual inactiva la quinasa. También defosforila la proteína tau a través de la activación del TrkB.

Los niveles de BDNF están reducidos en la corteza cerebral de los pacientes con Alzheimer desde estadios tempranos. *In vitro* existe una regulación a la baja de BDNF producida por la presencia de agregados de β A. En ratones transgénicos que sobreexpresan β A se ha demostrado igualmente una menor producción de BDNF (Peng *et al.* 2009).

El factor neurotrófico FGF-2 es regulado por BDNF y viceversa (Schindowski *et al.* 2008). FGF-2 incrementa en cerebros afectados con placas seniles y ovillos neurofibrilares (Gomez-Pinilla *et al.* 1990). Los niveles de NT-3, tanto ARNm como proteína, no sufren cambios en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, los niveles de NT-4/5 aparecen bruscamente mermados en hipocampo y cerebelo de pacientes con Alzheimer sin que existan cambios en el ARNm (Hock *et al.* 1998). NT-4/5 ha demostrado inducir la defosforilación de tau (Elliott & Ginzburg 2006).

Cambios en los niveles de IGF-1 han sido descritos en numerosas enfermedades neurodegenerativas (Carro Díaz *et al.* 2003). Al inicio de una condición neuropatológica los niveles de IGF-1 incrementan con el fin de proteger a las neuronas afectadas regulando el suministro energético a las células cerebrales, favoreciendo procesos neurogénicos y mecanismos de regulación sinaptogénicos y de aclaramiento de β A (Trejo *et al.* 2004). El potencial rol del IGF-1 en la enfermedad de Alzheimer ocurre a distintos niveles. A nivel celular, IGF-1

incrementa la supervivencia neuronal y protege a las neuronas frente a la toxicidad amiloidea. A través de la activación de la ruta PI3K/Akt, IGF-1 inhibe la GSK-3 β . Por otro lado actúa a través de la modulación de la sensibilidad a la insulina a nivel cerebral, alteración vinculada a la pérdida neuronal en la enfermedad de Alzheimer. La insulina está implicada en el transporte celular del β A por lo que un balance inadecuado de esta hormona produce la acumulación de β A intracelular (Carro & Torres-Aleman 2004). Por último, IGF-1 tiene un rol directo en la regulación de β A cerebral a través de cambios en las propiedades en la barrera del plexo coroideo (Carro *et al.* 2002) (**Figura I.11**).

Figura I.11. Rol dual del IGF-1 en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

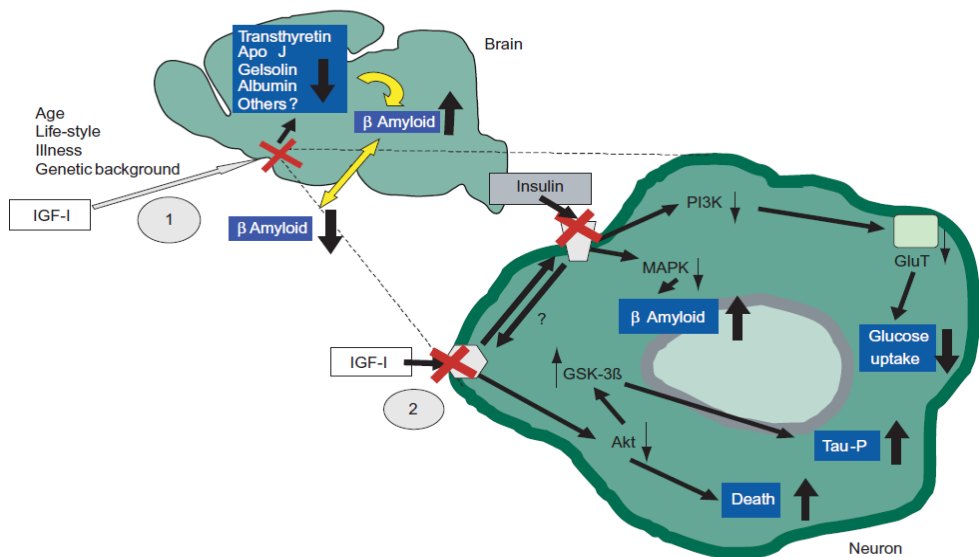


Figura I.11. Extraída de Carro & Torres-Aleman (Carro & Torres-Aleman 2004). (1) IGF-1 entra en el plexo coroideo y en los vasos cerebrales. El cerebro acumula β A porque el aclaramiento del péptido a través de la modulación de IGF-1 está reducido. (2) la amiloidosis cerebral ocurre por una disfunción en la unión IGF-1/Insulina ya que el β A compite con los receptores de insulina y posiblemente con

los receptores de IGF-1 incrementando los depósitos amiloideos y la formación de ovillos neurofibrilares.

2.5.6. Otras alteraciones anatomofisiológicas propias de la enfermedad de Alzheimer

La afectación de las funciones sinápticas es un factor crucial en el desarrollo de declive cognitivo. Durante el envejecimiento normal el número de sinapsis decae (Scheff *et al.* 1991). Sin embargo la pérdida sináptica está asociada al declive cognitivo en la enfermedad de Alzheimer, mostrando un 25-30% de disminución de la sinapsis en el córtex (DeKosky & Scheff 1990; Terry *et al.* 1991; DeKosky *et al.* 1996). Otros estudios describen una disminución de los niveles de proteínas pre-(sinaptofisina) y post-sinápticas (sinaptopodina y PSD-95) en la enfermedad de Alzheimer (Bertoni-Freddari *et al.* 1996; Gyls *et al.* 2004; Almeida *et al.* 2005; Reddy & Beal 2008). Mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que la disfunción sináptica y la disminución de la LTP están relacionadas con la presencia de β A soluble (Billings *et al.* 2005; Cleary *et al.* 2005; Townsend *et al.* 2006).

El gen apoE ha sido establecido como el mayor factor de riesgo genético para padecer Alzheimer. Con la presencia de un alelo ϵ 4 incrementa la prevalencia mientras que se decuplica si los dos alelos presentes son ϵ 4 (Corder *et al.* 1993; Meyer *et al.* 1998).

2.6. Modelos murinos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer

Aunque existen numerosos modelos animales que reproducen ciertas características genotípicas y fenotípicas de la enfermedad de Alzheimer, en los siguientes apartados ampliaremos la descripción de dos de ellos, el doble transgénico B6C3Tg(APP^{Swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/J (2xTg) y el triple transgénico B6;129-Psen1Tg(APP^{Swe},tauP301L)1Lfa/J (3xTg). Estos dos modelos, aún siendo los

genotipos transgénicos más ampliamente aceptados y utilizados en investigación, distan de la compleja realidad fisiopatológica de la enfermedad de Alzheimer humana (Stargardt *et al.* 2013).

2.6.1. Ratón doble transgénico para la enfermedad de Alzheimer

El modelo de ratón transgénico B6C3Tg(APP^{Swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/J fue creado por David Borchelt y comercializado por *Jackson Laboratory*. Éste posee dos transgenes específicos insertados (Mo/HuAPP695Swe y PSEN1-dE9) (Ver apartado de “Materiales y Métodos” para ampliar información). Estas modificaciones genéticas buscan simular una de las alteraciones más significativas ocurridas en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, la sobreproducción y la posterior deposición del péptido β A.

Debido a las mutaciones específicas que posee este modelo, la sobreexpresión de este β A está limitada al sistema nervioso central. Es por ello que la mayor parte de las alteraciones, consecuencia de esta disfunción, están dirigidas al cerebro. Así, extraídas de la información oficial del modelo a través de los datos que provee el *Laboratorio Jackson* (www.jax.org), las características más significativas y demostradas son la formación de placas de β A en hipocampo y corteza entre los 6 y los 7 meses de edad; la pérdida sináptica por neuritas distróficas alrededor de los 9 meses; y los déficits cognitivos, especialmente en cuanto a aprendizaje espacial y memoria entre los 7 y los 12 meses. Por otro lado, no se ha descrito que produzcan ovillos neurofibrilares.

En 2004 el propio Borchelt describió la existencia de abundantes placas de β A en corteza e hipocampo a los 9 meses (Jankowsky *et al.* 2004). Otro estudio, de 2006, describió depósitos a las 5 semanas aunque éstos no fueron abundantes hasta los 11-15 meses e incrementaron drásticamente a partir de los 20 meses. Esta acumulación de β A es más marcada en hembras frente a machos (Burgess *et al.*

2006). También se ha descrito una progresiva angiopatía amiloide cerebral a partir de los 6 meses de edad por deposición de β A, fundamentalmente, en la vasculatura leptomeníngea (García-Alloza *et al.* 2006). Richner *et al.* describieron una reducción del número de neuronas en el estriado de ratones 2xTg de 12 meses (Richner *et al.* 2009). Este modelo transgénico muestra un daño asociado a estrés oxidativo colocalizado con las regiones donde se depositan las placas seniles. Así, analizando la oxidación de proteínas a través de 3-nitrotirosina y la peroxidación lipídica por 4-HNE, Matsuoka *et al.* concluyeron que existe un incremento de estos marcadores comparando ratones de 12 meses 2xTg frente a jóvenes 2xTg y controles (Matsuoka *et al.* 2001).

2.6.2. Ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer

El modelo 3xTg, B6;129-Psen1Tg(APPSwe,tauP301L)1Lfa/J, fue creado por el Dr. Frank M. LaFerla en 2003. Se trata del primer modelo en el que se desarrollan tanto placas de β A como ovillos neurofibrilares ocasionados por una alteración en la fosforilación de tau. Como se detallará en el apartado de “Materiales y Métodos”, para la creación de este modelo se introdujeron dos genes, APP y tau, en una línea germinal de un ratón genéticamente modificado en el gen *PSEN1*.

De acuerdo con la hipótesis amiloidea para la enfermedad de Alzheimer, este modelo desarrolla depósitos amiloideos previos a la formación de ovillos neurofibrilares. El modelo 3xTg presenta una progresiva pérdida de plasticidad sináptica que comienza antes del depósito amiloideo y neurofibrilar (Oddo *et al.* 2003a; Oddo *et al.* 2003b). Asimismo, presenta déficits conductuales y cognitivos que incrementan con la edad (Gimenez-Llort *et al.* 2007a). La relación entre β A, tau y disfunción sináptica queda patente en este modelo (LaFerla & Oddo 2005) así como la implicación del β A en el declive cognitivo (Billings *et al.* 2005).

2.7. Estrategias terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer

Las estrategias terapéuticas para los pacientes con enfermedad de Alzheimer son múltiples e incluyen distintas perspectivas e hipótesis debido a la falta de consenso en su etiología. De manera general se pueden considerar varias clases de fármacos y terapias para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe 1997; Bird 2008; Garcia-Mesa *et al.* 2011a; Lucia & Ruiz 2011):

- 1.- Los inhibidores de proteasas que disminuyen parcialmente la actividad de las enzimas involucradas en la formación de β A.
- 2.- Compuestos que se unen al β A extracelular actuando sobre su agregación y previniendo su deposición.
- 3.- Fármacos antiinflamatorios que permiten la reactivación de la microglía y la liberación de citoquinas.
- 4.- Compuestos antioxidantes. Aunque la administración de antioxidantes como la vitamina E no ha demostrado efectividad (Sano *et al.* 1997) e incluso puede ser perjudicial (Lloret *et al.* 2009).
- 5.- Los fármacos anticolinesterásicos, inhibidores de la colinesterasa (Cummings 2004).
- 6.- Estudios realizados en modelos murinos demostraron efectividad de una vacuna contra el β A (Schenk *et al.* 1999). Sin embargo en humanos los efectos fueron negativos (Orgogozo *et al.* 2003).
- 7.- El IGF-1 modula el aclaramiento de β A (Carro *et al.* 2002), su degradación (Sharma *et al.* 2008) así como la captación celular (Zhao *et al.* 2009). También protege frente a los efectos neurotóxicos de la acumulación de β A (Dore *et al.* 1999).

8.- Estrategias que incrementan los niveles cerebrales de factores neurotróficos como el ejercicio físico (Radak *et al.* 2010; Raichlen & Alexander 2014) o la dieta (Scarmeas *et al.* 2009).

3. Neurobiología del ejercicio físico

La ancestral necesidad de cazar y de buscar, recolectar y almacenar alimentos como actividades de temporada implicaron una demanda variable de actividad física así como de procesamiento de la información, aprendizaje y memoria. Así, el nexo entre la actividad física y la mejora cognitiva puede conferir una ventaja selectiva, probablemente a través de mecanismos conservados evolutivamente (Aberg *et al.* 2006). Por el contrario, la insuficiente actividad física asociada al estilo de vida moderno es un gran factor de riesgo para enfermedades como la obesidad, cardiopatías, diabetes, osteoporosis, depresión y Alzheimer entre otras (Dishman *et al.* 2006; Vaynman & Gomez-Pinilla 2006).

El concepto de ejercicio físico como modulador del comportamiento, la cognición y la memoria es un conocimiento popular muy extendido. No obstante, hasta hace pocos años no comenzaron a sentarse las bases científicas al respecto (Cotman & Berchtold 2002; Dishman *et al.* 2006; Cotman *et al.* 2007). Así, aunque la fisiología del ejercicio ha sido un área de investigación muy activa desde hace más de cincuenta años, la “Neurobiología del ejercicio” ha estado ausente del discurso científico hasta hace pocos años (Booth *et al.* 2002). Esto es algo paradójico porque las evidencias sugieren que la actividad física confiere protección para muchas enfermedades neurológicas como Párkinson, Alzheimer y accidentes isquémicos (Dishman *et al.* 2006). Aunque la base genética de la funcionalidad del cerebro juega una importante función, factores sociales, de desarrollo y ambientales alteran esta expresión génica induciendo cambios en la estructura y función cerebral (Kandel 1998). Aún así se sabe relativamente poco sobre los

mecanismos por los que el ejercicio físico puede influir en la forma y función del sistema nervioso central y periférico (Dishman *et al.* 2006). No obstante, ramas de investigación como la epigenética están arrojando luz en los últimos años a este respecto (Gomez-Pinilla *et al.* 2011; Pareja-Galeano *et al.* 2013b).

La actividad física incrementa la plasticidad cerebral y mejora la capacidad de aprendizaje en individuos jóvenes pero especialmente en personas mayores (Llorens-Martin *et al.* 2008). El ejercicio físico mejora la función cognitiva tanto en modelos animales como humanos (Fordyce & Wehner 1993; Kramer *et al.* 1999; Laurin *et al.* 2001).

Los mecanismos a través de los cuales se producen los cambios neurobiológicos debidos al ejercicio implican infinidad de moléculas, vías y tejidos. La **Figura I.12**, tomada de Dishman *et al.* muestra un diagrama holístico de la neurobiología del ejercicio físico a través de los distintos componentes implicados y sus consecuencias funcionales (Dishman *et al.* 2006).

Figura I.12. Diagrama holístico de la neurobiología del ejercicio

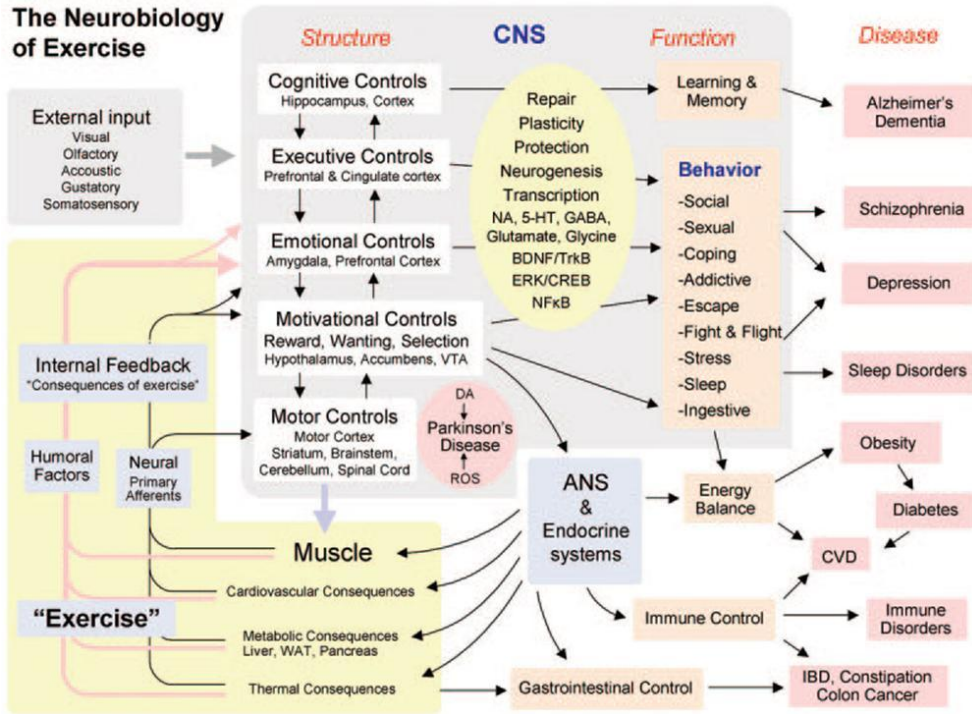


Figura I.12. Extraída de Dishman et al. (Dishman et al. 2006). Abreviaturas no definidas en el texto: ANS (autonomic nervous system [sistema nervioso autónomo]), CNS (central nervous system [sistema nervioso central]), CVD (cardiovascular disease [enfermedad cardiovascular]), DA (dopamine [dopamina]), ERK (extracellular signal-regulated kinase [quinasa reguladora de la señal extracelular]), 5-HT (5-hydroxytryptamine [5-hidroxitriptamina]), GABA (gamma amino butyric acid [gamma amino ácido butírico]), IBD (inflammatory bowel disease [enfermedad inflamatoria intestinal]), NA (noradrenaline [noradrenalina]), ROS (reactive oxygen species [Especies reactivas del oxígeno]), VTA (ventral tegmental area [área ventral tegmental]), WAT (white adipose tissue [tejido adiposo blanco]).

Los factores neurotróficos han demostrado jugar un importante papel terapéutico en individuos con diferentes alteraciones neuropsiquiátricas así como en el rendimiento y funcionalidad cerebral de individuos sanos (Carro & Torres-Aleman

2004; Shoval & Weizman 2005; Autry & Monteggia 2012; Allen *et al.* 2013). Así, la modulación a nivel cerebral de estas proteínas y sus receptores es una ambiciosa diana terapéutica en desórdenes del sistema nervioso y por tanto es de gran interés en el campo de la investigación biomédica translacional (Hefti 1994; Thoenen & Sendtner 2002; Zuccato & Cattaneo 2009). Sin embargo, su diferente origen, fuente, composición y sensibilidad específica a receptores hace que cada factor trófico tenga características funcionales muy diferentes lo que implica una reducida ventana terapéutica en la modulación exógena de los mismos (Cui 2006). Aún así, numerosas evidencias aseguran que estas moléculas tienen un importante potencial terapéutico y/o profiláctico (Nagahara & Tuszynski 2011). Su efecto trófico sobre las neuronas hace que estos factores sean considerados como uno de los agentes terapéuticos más potentes por su efecto reparador e inductor de supervivencia con respecto a otros factores clásicos (Smith *et al.* 1999; Kordower *et al.* 2000; Nagahara *et al.* 2009).

En la actualidad BDNF es el factor neurotrófico más estudiado en distintos desórdenes neuropsiquiátricos (Nagahara & Tuszynski 2011; Autry & Monteggia 2012). Zuccato y Cattaneo plantean las potenciales estrategias actuales para llevar a cabo la modulación endógena de BDNF así como su administración exógena y la modulación de su vía de señalización mediante el uso de miméticos. Como se puede ver en la **Figura I.13**, los autores sugieren un régimen de restricción calórica, ejercicio físico o estimulación cognitiva para inducir la liberación de BDNF. También plantean la infusión directa que, tal y como se ha descrito no es suficientemente eficaz; el uso de miméticos naturales o sintéticos y de fármacos que modulen la síntesis y liberación de este factor neurotrófico; también hacen referencia a técnicas biomédicas más avanzadas de como la liberación de BDNF *in vivo* mediante terapia génica o la liberación *ex vivo* utilizando células modificadas genéticamente (Zuccato & Cattaneo 2009). Dado lo que se sabe hasta la fecha sobre la modulación del resto de neurotrofinas, las estrategias que se describen bien

pueden ser utilizadas para la modulación de la síntesis y liberación de NGF, NT-3 y NT-4/5.

Figura I.13. Estrategias para modular la actividad de BDNF

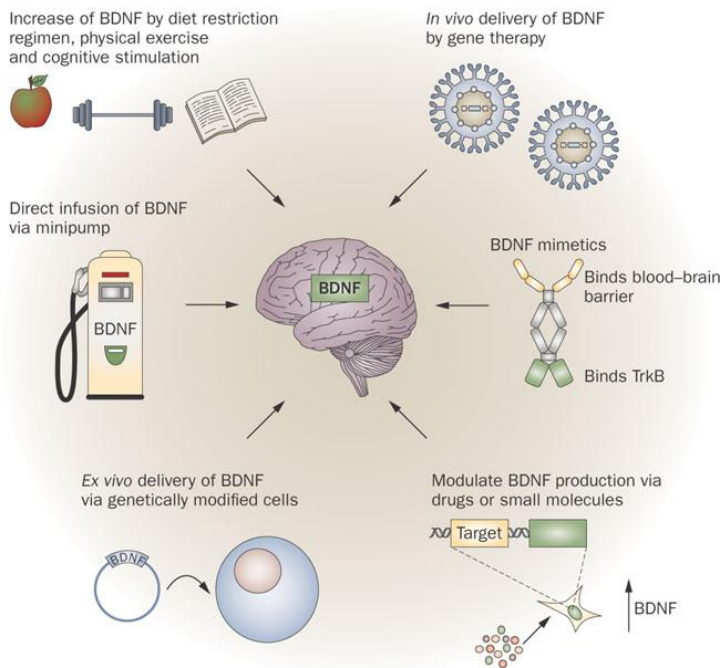


Figura I.13. Extraída de Zuccato & Cattaneo (Zuccato & Cattaneo 2009).

3.1. Ejercicio físico como modulador de factores neurotróficos

La primera evidencia que se publicó respecto a la modulación cerebral de factores neurotróficos mediante el ejercicio físico, concretamente de BDNF, fue llevada a cabo por Neeper *et al.* (Neeper *et al.* 1995). Desde esa primera investigación hasta la actualidad se han llevado a cabo cientos de estudios que demuestran la inducción de la expresión génica, síntesis y liberación de numerosos factores neurotróficos a través del ejercicio físico. Algunos de estos factores neurotróficos son el IGF-1

(Carro *et al.* 2000), BDNF (Neeper *et al.* 1995; Neeper *et al.* 1996), VEGF (Fabel *et al.* 2003), NGF (Neeper *et al.* 1996), GDNF (Revilla *et al.* 2014), NT-3 (Koo *et al.* 2013) y NT-4/5 (Chung *et al.* 2013). Todas estas proteínas actúan en concierto para producir efectos tróficos complementarios (Cotman & Berchtold 2002).

El ejercicio físico ha demostrado mediar las vías reguladas por BDNF a nivel neuronal. A través del bloqueo farmacológico de ciertas proteínas mediadoras de la vía neurotrófica, se ha constatado que el ejercicio activa las MAPKs, los receptores de NMDA y la calmodulina quinasa 2 que conducen a su vez a la activación de CREB y sinapsina 1 (Vaynman *et al.* 2003). Además, el bloqueo de la acción de BDNF durante el ejercicio es suficiente para disminuir significativamente la memoria y el aprendizaje a través de la prevención de la producción de ARNm de CREB así como su activación (Vaynman *et al.* 2004b).

La regulación hipocampal de BDNF a través del ejercicio está mediada tanto por neurotransmisores (Cotman & Berchtold 2002; Russo-Neustadt & Chen 2005), por mecanismos neuroendocrinos (Cotman & Berchtold 2002), como por IGF-1 (Ding *et al.* 2006; Llorens-Martin *et al.* 2008). Al igual que la expresión de BDNF, la de IGF-1 incrementa a nivel hipocampal tras el ejercicio físico (Ding *et al.* 2006). La señalización de ambos factores neurotróficos media los efectos neurotróficos del ejercicio y sus efectos sobre la cognición. Esto se ha demostrado mediante la inyección intrahipocampal de anticuerpos anti-TrkB que atenúan los efectos beneficiosos del ejercicio sobre el aprendizaje así como la inducción de distintas proteínas sinápticas como la sinaptofisina y la sinapsina (Vaynman *et al.* 2004b; Vaynman *et al.* 2006). Asimismo, el bloqueo de la señalización de IGF-1 mediante anticuerpos anti-IGF-1 ha demostrado afectar a ciertos aspectos de la cognición así como a la modulación de sinapsina y MAPKs, vías dependientes de la regulación de BDNF (Ding *et al.* 2006). En resumen, tal y como detalla Cotman *et al.*, los puntos de convergencia entre IGF-1 y BDNF son (Cotman & Berchtold 2002):

1.- IGF-1 aumenta la señalización de BDNF en respuesta al ejercicio. El bloqueo *in vivo* de IGF-1 previene a inducción hipocampal de BDNF tras el ejercicio así como los segundos mensajeros mediados por TrkB (Ding *et al.* 2006).

2.- IGF-1 incrementa los niveles de TrkB en neuronas hipocampales *in vitro* y en consecuencia aumenta la señalización de BDNF (McCusker *et al.* 2006).

3.- BDNF, y no IGF-1, modula el incremento de mecanismos inductores de la plasticidad sináptica. Así, el ejercicio, a través de BDNF, media la LTP (Soule *et al.* 2006) y activa las MAPKs (Zheng & Quirion 2004). Por el contrario, el papel directo de IGF-1 sobre la LTP es desconocido y su mediación sobre las MAPKs es muy débil en comparación con BDNF (Zheng & Quirion 2004).

Tal y como muestra la **Figura I.14**, IGF-1, BDNF y otros factores neurotróficos como el VEGF, actúan de manera complementaria y sinérgica para mediar los efectos del ejercicio sobre el cerebro mediando la LTP, el aprendizaje y la memoria, neurogénesis y efectos ansiolíticos entre otros (Llorens-Martin *et al.* 2008).

Figura I.14. Interacción entre diferentes factores neurotróficos modulados por ejercicio

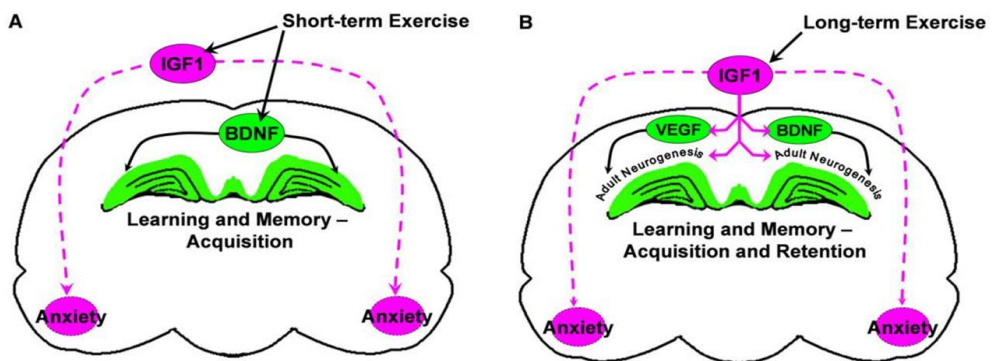


Figura I.14. Extraída de Llorens-Martin *et al.* (Llorens-Martin *et al.* 2008).

Dado que la presente Tesis Doctoral versa concretamente sobre la inducción del factor BDNF a través del ejercicio físico, prestamos especial atención a esta modulación. De todos los factores neurotróficos, BDNF es el más susceptible de ser regulado mediante el ejercicio físico (Knaepen *et al.* 2010; Huang *et al.* 2014). Knaepen *et al.* realizaron una completa revisión sistemática donde incluyeron los estudios experimentales llevados a cabo hasta Julio de 2010 en los que se había estudiado la inducción de BDNF sanguíneo en humanos, sanos y enfermos, a través de ejercicio físico agudo o crónico (Knaepen *et al.* 2010). En este trabajo se analizaron veinticuatro estudios: nueve ensayos controlados randomizados (Schulz *et al.* 2004; Ferris *et al.* 2007; Winter *et al.* 2007; Goekint *et al.* 2008; Levinger *et al.* 2008; Schiffer *et al.* 2009; Baker *et al.* 2010; Seifert *et al.* 2010; Strohle *et al.* 2010), un ensayo randomizado no controlado (Yarrow *et al.* 2010), cinco ensayos controlados no randomizados (Gold *et al.* 2003; Castellano & White 2008; Gustafsson *et al.* 2009; Goekint *et al.* 2010; Laske *et al.* 2010), cinco ensayos comparativos no controlados ni randomizados (Rojas Vega *et al.* 2006; Rojas Vega *et al.* 2008; Tang *et al.* 2008; Zoladz *et al.* 2008; Rasmussen *et al.* 2009) y cuatro estudios observacionales retrospectivos (Chan *et al.* 2008; Nofuji *et al.* 2008; Currie *et al.* 2009; Floel *et al.* 2010). Finalmente concluyeron que el ejercicio aeróbico agudo incrementa los niveles de BDNF circulantes aunque su efecto es transitorio. Asimismo, el entrenamiento aeróbico eleva los niveles basales de BDNF y el procesamiento celular del mismo. Además, el entrenamiento crónico lleva a una mayor síntesis de BDNF tras una sesión de ejercicio agudo (Knaepen *et al.* 2010).

Más recientemente, Huang *et al.* han revisado los efectos del ejercicio físico aeróbico crónico, agudo y el entrenamiento de fuerza en los niveles de BDNF circulantes de humanos sanos a través de 32 estudios (Huang *et al.* 2014); muchos de los cuales coinciden con el trabajo de Knaepen *et al.* (Knaepen *et al.* 2010). Tras

su análisis concluyeron que los niveles de BDNF periférico incrementan significativamente en respuesta al ejercicio agudo y que este incremento retorna hasta valores basales durante la recuperación (Huang *et al.* 2014). Por otro lado, el entrenamiento de fuerza no afecta a los niveles de BDNF. El efecto de los niveles crónicos de actividad física no muestra un claro patrón de cambio en BDNF a través de los distintos estudios. Así, mientras que dos estudios demostraron mayores niveles de BDNF en deportistas comparado con personas sedentarias (Zoladz *et al.* 2008; Correia *et al.* 2011), Nofuji *et al.* encontraron resultados opuestos y otros dos estudios no encontraron asociación (Floel *et al.* 2010; Winker *et al.* 2010). Algunos estudios han demostrado asociaciones negativas entre VO_{2max} y BDNF ante lo cual sugieren que, puesto que BDNF atraviesa la barrera hematoencefálica (Pan *et al.* 1998), la relación inversa puede reflejar una captación más eficiente del BDNF circulante al cerebro en los individuos físicamente activos (Currie *et al.* 2009).

El origen del BDNF circulante inducido por ejercicio físico en humanos sanos ha demostrado ser el cerebro en un 70-75% aproximadamente (Rasmussen *et al.* 2009; Seifert *et al.* 2010). Las regiones cerebrales concretas responsables de esta liberación de BDNF aún no están claras. Sin embargo, a través de experimentos con animales se ha comprobado que el ARNm de BDNF incrementa tras el tratamiento con ejercicio físico principalmente en el hipocampo (Neeper *et al.* 1996; Griffin *et al.* 2009; Seifert *et al.* 2010). El BDNF restante (25% aproximadamente) liberado a la sangre tras el ejercicio proviene de fuentes periféricas entre las que se han sugerido el músculo esquelético (Matthews *et al.* 2009), el endotelio vascular (Nakahashi *et al.* 2000), las células musculares vasculares lisas (Donovan *et al.* 1995), la glándula pituitaria (Tsukinoki *et al.* 2006), las glándula salivar submandibular (Tsukinoki *et al.* 2006; Tsukinoki *et al.* 2007) e incluso células inmunes como los linfocitos T y B (Sobue *et al.* 1998; Besser & Wank 1999; Kerschensteiner *et al.* 1999), eosinófilos (Noga *et al.* 2003;

Raap *et al.* 2005) y los monocitos (Besser & Wank 1999; Kerschensteiner *et al.* 1999; Rost *et al.* 2005); a parte del contenido en las plaquetas (Yamamoto & Gurney 1990; Radka *et al.* 1996; Lommatzsch *et al.* 2005).

3.2. Ejercicio físico en la enfermedad de Alzheimer

En las últimas dos décadas, evidencias extraídas de numerosos estudios realizados en animales y en humanos han demostrado que el ejercicio físico posee un efecto neuroprotector contra ciertas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Karsten & Geschwind 2005). Además, el ejercicio incluye un importante papel mejorando las capacidades físicas de los pacientes así como la prevención de caídas y la dependencia (Santana-Sosa *et al.* 2008). Esto ha hecho que el ejercicio físico sea considerado como una de las estrategias biomédicas a tener en cuenta en la prevención y terapia coadyuvante de la enfermedad (Lucia & Ruiz 2011).

Rolland y colaboradores llevaron a cabo una amplia revisión sistemática que analizó los estudios publicados desde 1966 a 2007 en los que se evidenciaba un efecto de la actividad física sobre la enfermedad de Alzheimer desde una perspectiva preventiva y terapéutica en humanos. De un total de 24 estudios epidemiológicos longitudinales contemplados en esta revisión, 20 mostraron un significativo e independiente efecto preventivo del ejercicio físico en el declive cognitivo o la demencia (Rolland *et al.* 2008). Yoshitake *et al.* pautaron ejercicio físico diario moderado-intenso a un grupo de ancianos durante 7 años y concluyeron que la actividad física fue un significativo factor preventivo para esta demencia (Yoshitake *et al.* 1995). Scarmeas *et al.* siguieron un protocolo similar al anterior con un ejercicio más suave encontrando relación beneficiosa entre el tratamiento y la enfermedad de Alzheimer (Scarmeas *et al.* 2001). Otro estudio mostró que ciertas actividades físicas recreativas como el baile redujeron el riesgo

de esta enfermedad (Verghese *et al.* 2003). En un estudio realizado por Abbott *et al.* se evaluó la distancia andada diariamente y concluyó que los hombres que anduvieron a partir de cierta distancia disminuyeron su riesgo de padecer Alzheimer (Abbott *et al.* 2004). Estudios de caso-control analizados en la revisión de Rolland *et al.* mostraron igualmente que la actividad física tiene una influencia directa en la neuropatología de esta demencia (Rolland *et al.* 2008). Así se describe un estudio que asoció un bajo nivel de actividad física en el pasado reciente y lejano con la enfermedad de Alzheimer (Broe *et al.* 1990).

Por otro lado, en un estudio finlandés en el que evaluaron a 1500 personas, concluyeron que aquellas que realizaban ejercicio físico de manera habitual redujeron en un 60% el riesgo de padecer Alzheimer respecto a los sedentarios (Kivipelto & Solomon 2008). Resultados similares se describen en un estudio canadiense con 4600 adultos mayores (Laurin *et al.* 2001). Con el seguimiento durante 6 años de 2000 personas mayores no dementes, Larson *et al.* obtuvieron que 107 desarrollaron Alzheimer y aquellos que hacían ejercicio 3 veces a la semana redujeron en un 40% el riesgo desarrollar la enfermedad (Larson *et al.* 2006). Destacar el estudio desarrollado por Grande *et al.* que demostró que aquellas personas con declive cognitivo leve que demostraron mayores niveles de actividad física en forma de ocio tenían asociado menor riesgo de Alzheimer (Grande *et al.* 2014). Incluso algunos estudios han correlacionado positivamente efectos neuroprotectores con cantidad de ejercicio físico desarrollado (dosis-respuesta) (Laurin *et al.* 2001; Scarmeas *et al.* 2009)

En roedores el ejercicio físico actúa a nivel cerebral en varios niveles (Radak *et al.* 2014). El ejercicio físico crónico disminuye el estrés oxidativo cerebral mediante la inducción de enzimas antioxidantes (Radak *et al.* 2001a; Ogonovszky *et al.* 2005; Gimenez-Llort *et al.* 2010). Además incrementa los niveles de distintos factores neurotróficos que promueven la neurogénesis y la neuroprotección. Fundamentalmente este efecto viene mediado por IGF-1 (Carro *et al.* 2000; Carro

et al. 2001; Trejo *et al.* 2001; Llorens-Martin *et al.* 2010) y BDNF (Um *et al.* 2008; Garcia-Mesa *et al.* 2014). En varios modelos murinos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer el ejercicio físico ha demostrado inducir BDNF y mejorar la fisiopatología propia del modelo (Um *et al.* 2008; Garcia-Mesa *et al.* 2011b).

Existen menores niveles de BDNF en enfermos de Alzheimer (Aisen 2014) existiendo un efecto protector del BDNF inducido por ejercicio en la prevención de esta demencia (Coelho *et al.* 2014). La importancia de la inducción de BDNF cerebral a través del ejercicio físico estriba en el rol de este factor neurotrófico modulando la neurogénesis hipocampal, reparando las neuronas dañadas así como la pérdida de la función sináptica (Gomez-Pinilla *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002; Vaynman *et al.* 2004b; Rossi *et al.* 2006).

Hasta ahora, todos los efectos mediados por el ejercicio físico en la enfermedad de Alzheimer que se han descrito actúan sobre la fisiopatología de manera indirecta. Sin embargo, el ejercicio físico modula la actividad y los niveles de las enzimas que degradan el β A (Radak *et al.* 2010). Así en el modelo transgénico TgCRND8 el ejercicio físico produjo una disminución del β A sin mostrar alteraciones en la neprilisina (Adlard *et al.* 2005). También se ha visto que la acumulación de β A colapsa la actividad del proteasoma impidiendo la degradación del β A (Almeida *et al.* 2005), resultados que han sido confirmados *post mortem* en cerebros humanos de pacientes con Alzheimer (Keller *et al.* 2000). El enriquecimiento ambiental, que incluye el ejercicio físico voluntario, incrementa los niveles de neprilisina disminuyendo los de β A (Lazarov *et al.* 2005).

La **Figura I.15** refleja sintéticamente cómo afecta el ejercicio físico en la enfermedad de Alzheimer. En resumen, plasma cómo la inactividad física tiene consecuencias tales como el aumento del daño oxidativo, el menor metabolismo cerebral, una reducción en los niveles de neurotrofinas o la disminución en la

degradación de β A. Estas consecuencias son prevenidas parcialmente mediante la práctica habitual de ejercicio físico evitando el empeoramiento de la función cerebral que conduce a un mayor riesgo de padecer demencias como el Alzheimer (Radak *et al.* 2010).

Figura I.15. Diagrama sobre la prevención mediante el ejercicio físico de las consecuencias deletéreas producidas en la enfermedad de Alzheimer

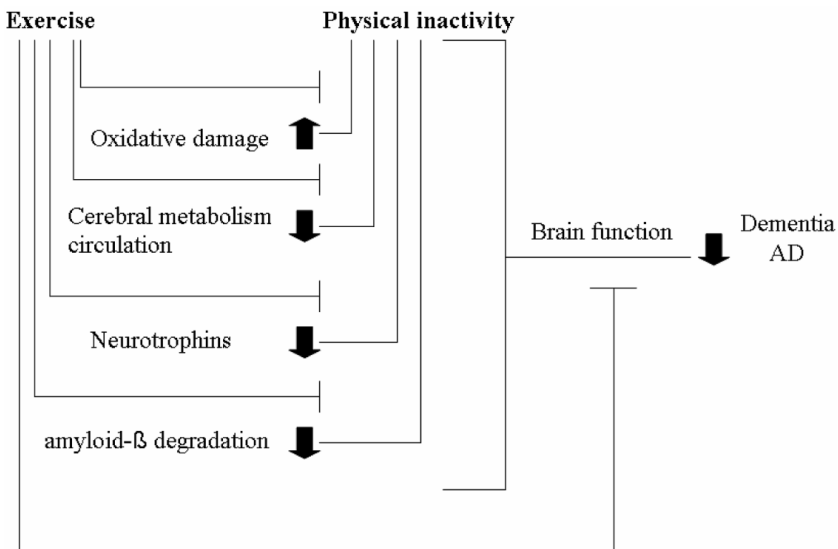


Figura I.15. Extraída de Radak *et al.* (Radak *et al.* 2010). Abreviaturas: AD (Alzheimer's disease [enfermedad de Alzheimer]).

3.3. Medición de BDNF circulante en estudios que implementan ejercicio físico

BDNF es una ambiciosa estrategia terapéutica en numerosas enfermedades neuropsiquiátricas (Nagahara & Tuszynski 2011). Es por ello que, además de la ingente cantidad de estudios desarrollados en distintos modelos experimentales

animales, la medición de los niveles sanguíneos en humanos sea una estrategia muy extendida (Autry & Monteggia 2012). Además, ya que el ejercicio ha demostrado ser un potente inductor de los niveles circulantes de BDNF, también han crecido considerablemente los estudios en los que se ha aplicado un tratamiento con ejercicio físico para comprobar el cambio en los niveles de esta neurotrofina (Huang *et al.* 2014).

No obstante, aunque en la actualidad existe el consenso de que el ejercicio físico, agudo y crónico, incrementa los niveles circulantes de BDNF, la metodología y el tipo de muestra sanguínea donde se analiza cambia notoriamente la concentración de este factor enmascarándose en consecuencia el grado de efecto del tratamiento. En la completa revisión de Knaepen *et al.* revisaron las publicaciones originales en los que se evaluaba el efecto de distintos tipos y protocolos de ejercicio en la inducción de BDNF en humanos sanos y enfermos (Knaepen *et al.* 2010). En este trabajo se evidencia la heterogeneidad en la metodología de la determinación de BDNF entre los distintos estudios. Así, la concentración de este factor aparece medida indistintamente en suero, plasma, sangre total y plaquetas aisladas. Por otro lado existe una gran variabilidad entre los niveles de BDNF cuando éstos son medidos en plasma o en suero (Cho *et al.* 2012) debido en parte a la presencia y liberación del BDNF por las plaquetas y a los procesos de degradación que pueden ser activos durante la manipulación de la muestra y su almacenaje (Trajkovska *et al.* 2007; Elfving *et al.* 2010). La falta de estandarización en el procesamiento de las muestras afecta igualmente al contenido de BDNF. En base a las conclusiones del trabajo de Knaepen *et al.*, y Bus *et al.* (Bus *et al.* 2011) a continuación se muestra una tabla en la cual se incluyen algunos de los procedimientos experimentales y estrategias susceptibles de sesgar los niveles de BDNF en experimentos con ejercicio físico (**Tabla I.3**):

Tabla I.3. Condiciones metodológicas en el procesado de la muestra susceptibles de alterar los niveles de BDNF

Ejercicio físico implementado
VO _{2max} o grado de entrenamiento de la persona en diseños experimentales agudos
Tipo de ejercicio / entrenamiento (aeróbico, de resistencia, de fuerza...)
Duración e intensidad del ejercicio
Lugar de ejecución del ejercicio (laboratorio, aire libre con/sin contaminación)
Condiciones de la obtención y procesado de las muestras sanguíneas
Puntos temporales de medición (inmediatamente después, pasado un tiempo)
Tipo de muestra (suero, plasma, sangre total, plaquetas aisladas, plasma rico en plaquetas, etc.)
En el caso del plasma, tipo de anticoagulante
En el caso del suero, tiempo y temperatura de la muestra durante la coagulación
Condiciones de la centrifugación de la muestra
Temperatura del almacenaje de la muestra
Corrección de las concentraciones de BDNF por los cambios en el volumen sanguíneo

II. OBJECTIVES / OBJETIVOS

OBJECTIVES

The major aim of this Doctoral Thesis is to study the role of physical exercise inducing BDNF and its neurotrophic signaling pathways in the central nervous system. It will be analyzed both in healthy models, animal and human, and in Alzheimer's disease models. The specific aims of this Doctoral Thesis are:

Objective 1. Study of the basal levels of neurotrophic factors (BDNF and IGF-1) in healthy adolescent cyclist and their respective controls.

Objective 2. Study of BDNF levels measured in peripheral blood, under different processing conditions, after its induction by acute physical exercise in healthy young adults.

Objective 3. Study of the effects of exercise training (12 weeks) on cognitive, performance and neurobiological variables related to oxidative stress, mitochondriogenesis, neurotrophic and pathophysiological pathways in a double transgenic murine model of Alzheimer's disease [B6C3Tg(APP^{Swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/J], and their respective controls.

Objective 4. Study of the effects of voluntary physical exercise (12 weeks) on neurobiological variables related to oxidative stress, mitochondriogenesis, neurotrophic and pathophysiological pathways in a triple transgenic murine model of Alzheimer's disease [B6;129-Psen1 Tg(APP^{Swe},tauP301L)1Lfa/J] subjected to ovariectomy, and their respective controls.

Objective 5. Study of the potential synergic effect of chronic physical exercise and the TrkB agonist (7,8-dihydroxyflavone) administration (6 weeks) on cognitive and psychological variables in healthy rats.

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el estudio del papel del ejercicio físico en la inducción de BDNF y sus vías de señalización neurotróficas en el sistema nervioso central. Esto se analizará tanto en modelos sanos, animal y humano, como en modelos para la enfermedad de Alzheimer. Los objetivos específicos de la Tesis Doctoral son:

Objetivo 1. Estudiar los niveles basales de factores neurotróficos (BDNF e IGF-1) sanguíneos en ciclistas adolescentes sanos y sus respectivos controles.

Objetivo 2. Estudiar los niveles de BDNF medidos en sangre, bajo distintas condiciones de procesamiento, tras su inducción mediante ejercicio físico agudo en individuos jóvenes sanos.

Objetivo 3. Estudiar los efectos del entrenamiento (12 semanas) sobre variables cognitivas, físicas y neurobiológicas relacionadas con el estrés oxidativo, mitocondriogénesis, vías neurotróficas y fisiopatológicas en un modelo murino doble transgénico para la enfermedad de Alzheimer [B6C3-Tg(APP^{Swe},PSEN1^{dE9}) 85Dbo/J] y sus respectivos controles.

Objetivo 4. Estudiar los efectos del ejercicio físico voluntario (12 semanas) sobre variables neurobiológicas relacionadas con el estrés oxidativo, mitocondriogénesis, vías neurotróficas y fisiopatológicas en un modelo murino triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer [B6;129-Psen1Tg(APP^{Swe},tau P301L)1Lfa/J] sometido a ovariectomía y sus respectivos controles.

Objetivo 5. Estudiar el potencial efecto sinérgico del ejercicio físico crónico y la administración del agonista de TrkB (7,8-dihidroxi-flavona) (6 semanas) sobre variables cognitivas y psicológicas en ratas sanas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales.

1.1. Comités éticos.

Los protocolos experimentales desarrollados en la presente Tesis Doctoral han sido realizados de acuerdo a lo establecido en el Real Decreto 1201/2005 sobre la protección de los animales de experimentación con fines científicos (BOE 21 de octubre 2005), así como en concordancia con la legislación Española, que ha sido desarrollada en base a los principios de la declaración de Helsinki, las Directivas de la UE sobre Ensayos Clínicos 2001/20/EC y Buenas Prácticas Clínicas 2005/28/EC y legislación relacionada. En concreto, debido a las colaboraciones realizadas, los comités éticos que aprobaron los distintos protocolos experimentales, animales y humanos, fueron: Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de la Plana, Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universidad de Valencia, Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona y el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universidad de Valencia.

1.2. Muestra humana.

1.2.1. Objetivo 1.

En el presente protocolo experimental participaron 9 adolescentes entrenados y 7 sedentarios. Ambos grupos estuvieron constituidos por varones igualados en edad (14.0 ± 2.2 años). Todos los adolescentes del grupo entrenado (*Trained*) fueron ciclistas de élite de sus respectivas categorías. Se reclutó en este grupo a aquellos sujetos que participaban en actividades deportivas competitivas regularmente con un promedio de 5 sesiones de entrenamiento y 19 horas semanales durante al menos los 3 años previos. El grupo sedentario (*Sedentary*) no tomó parte en ningún

programa de ejercicio físico regular más que aquel pautado en el currículo escolar, el cual no superaba las 2 horas semanales. Aquellos participantes que excedieron o no alcanzaron estos límites fueron excluidos del estudio. Todos los participantes eran no fumadores, sanos y proveyeron firmado el consentimiento informado previa participación.

1.2.2. Objetivo 2.

En este diseño experimental participaron 12 voluntarios. Todos ellos eran varones estudiantes de la Universidad de Valencia. Su edad (24.7 ± 5.6 años) y antropometría (1.77 ± 0.06 metros de altura y 74.5 ± 5.7 Kg de peso) era homogénea. Ninguno de los participantes había tomado suplementación vitamínica ni fármacos durante al menos los 6 meses previos al experimento. Todos los participantes eran no fumadores, sanos y proveyeron firmado el consentimiento informado previa participación.

1.3. Muestra animal.

1.3.1. Objetivo 3.

El presente protocolo experimental fue llevado a cabo en el animalario del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia.

Empleamos ratones 2xTg procedentes de la colonia establecida en el SCSIE, los cuales fueron creados por ingeniería genética en *The Jackson Laboratory* (EEUU). El modelo transgénico que se empleó fue el “B6C3-Tg(APPSwe,PSEN1dE9)85Dbo/J” (Ref. 004462; <http://www.jax.org/>). Dicho modelo fue diseñado mediante dos plásmidos de expresión (Mo/HuAPP695Swe y PS1-dE9) controlados cada uno por una proteína priónica (PrP) murina independiente. Estas PrPs son

agregados supramoleculares (glicoproteínas) acelulares y patógenas que se expresan en varios tejidos, pero principalmente en neuronas del sistema nervioso central. En un transgen (Mo/HuAPP695Swe) el ADNc codifica una proteína quimera “humanizada” de la APP cuyo gen ha sido modificado en tres aminoácidos para simular los residuos amiloides humanos y además modificada para codificar la mutación Swe (K595N/M596L) que eleva la cantidad de β A por aumento de su procesamiento a través de la ruta BACE (mutación que ha sido encontrada en humanos con la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar). En el segundo transgen (PSEN1-dE9), el ADNc codifica la PSEN1 humana con la mutación *DeltaE9* que porta una variante de la delección del exón 9 asociado con la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar. Estos constructos fueron co-microinyectados en un pronúcleo (con fondo genético B6C3H, F2) haciéndose la inserción de los transgenes en un mismo locus. De la línea 85 fue obtenida la colonia resultante que fue mantenida como homocigota por cruzamiento con ratones transgénicos B6C3F1/J. Los rasgos fenotípicos de este modelo vienen marcados por una sobreexpresión de β A limitada al sistema nervioso central. Así, extraído de la información de *The Jackson Laboratory* sobre el modelo, los rasgos mostrados por estos ratones comprenden la formación de placas de β A en hipocampo y corteza entre los 6 y los 7 meses; pérdida sináptica por neuritis distróficas alrededor de los 9 meses, convergiendo estas afectaciones en alteraciones funcionales a través de déficits cognitivos, principalmente aprendizaje espacial y memoria entre los 7 y los 12 meses. Este modelo no produce ovillos neurofibrilares como consecuencia de las mutaciones.

Utilizamos 10 ratones 2xTg hembras que iniciaron el estudio con una edad de 10 meses. Los 8 ratones no transgénicos (NTg) empleados como controles de los 2xTg fueron igualmente hembras de 10 meses con el mismo fondo genético híbrido de C57BL/6 y C3H (B6C3H). Los genotipos fueron confirmados con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante análisis de ADN extraído de biopsias de

la cola. Los ratones fueron estabulados individualmente y divididos de manera aleatoria entre los grupos entrenados (Ex por sus siglas en inglés, *exercise*) y sedentarios (Sed). Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz y oscuridad (12 – 12 horas). El acceso a agua y comida fue *ad libitum*, siendo la dieta pienso estándar (Panlab S.L.) cuyo valor calórico es de 3100 Kcal/Kg.

1.3.2. Objetivo 4.

El presente protocolo experimental fue llevado a cabo en la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Psicología de la Universidad de Barcelona.

Empleamos ratones 3xTg homocigotos procedentes de la colonia establecida en la Unidad de Psicología Médica de la Universidad Autónoma de Barcelona, los cuales fueron creados por ingeniería genética en la Universidad de California en Irvine (EEUU). El modelo transgénico que se empleó fue el “B6;129-Psen1^{tm1Mpm}Tg(APP^{Swe}, tauP301L)1Lfa/J” (Ref. 004807). El diseño de este ratón partió de un pronúcleo de la célula embrionaria de dos mutantes *knockin* de PSEN1 a la cual co-microinyectaron dos transgenes independientes, Mo/HuAPP695Swe y tauP30IL (Oddo *et al.* 2003b). Estos dos transgenes fueron diseñados para ser expresados bajo el control del promotor Thy1.2 que dirige la expresión de los mismos al sistema nervioso central. Como se explicó en el modelo 2xTg, el ADNc del transgen Mo/HuAPP695Swe codifica una proteína quimera “humanizada” de la APP con la mutación Swe. En el segundo transgen, tauP30IL, el ADNc codifica la sobreexpresión de los microtúbulos asociados a la proteína tau que, al hiperfosforilarse crearán los llamados ovillos neurofibrilares. Lo hace sin las inserciones amino terminales (4R0N) portadores de la mutación hP301L. Los rasgos fenotípicos de este modelo comprenden desde la deposición de placas de βA

intraneuronales (3-4 meses) y extraneuronales (6 meses), tanto en corteza como en hipocampo; la formación de ovillos neurofibrilares en hipocampo (6 meses) y después en corteza; déficits en la plasticidad sináptica; déficits en la potenciación a largo plazo (6 meses); y alteraciones cognitivas (4 meses) ocurridas antes de que se evidencien placas u ovillos.

Se utilizaron 27 ratones 3xTg y 28 ratones no transgénicos (NTg), empleados como controles de los 3xTg, todos ellos hembras de 4 meses de edad y fondo genético híbrido de 129/C57BL6. Los genotipos fueron confirmados por PCR mediante análisis de ADN extraído de biopsias de la cola. Los ratones fueron estabulados en grupos de 3 a 5 del mismo genotipo. Después fueron divididos de manera aleatoria para ser intervenidos quirúrgicamente con una ovariectomía (Ov) o una operación simulada (S por sus siglas en inglés, *Sham*). Posteriormente fueron aleatoriamente divididos en dos subgrupos: entrenados (Ex) y sedentarios (Sed). Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz y oscuridad (12-12 horas). El acceso a agua y comida fue *ad libitum*.

1.3.3. Objetivo 5.

El presente protocolo experimental fue llevado a cabo en el animalario de la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM) de la Universidad de Valencia.

Utilizamos 36 ratas Wistar macho adquiridos de la empresa *Janvier Labs* (<http://www.janvier-labs.com>). Desde las 8 semanas de edad hasta que cumplieron 3 meses fueron estabuladas en grupos de 3 a 5 con el fin de acondicionarlas a las instalaciones. Después fueron divididas de manera aleatoria y reagrupadas de acuerdo a los distintos grupos: entrenadas (Ex); tratadas con 7,8-DHF (7,8-DHF); tratadas con la combinación de entrenamiento y 7,8-DHF (Ex+7,8-DHF); y un grupo control tratado con el vehículo del tratamiento con 7,8-DHF y expuesto al

tapiz rodante sin entrenar. Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones constantes de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz y oscuridad (12-12 horas). El acceso a agua y comida fue *ad libitum*.

1.4. Aparatos.

- Agitador magnético: Marca Stuart, modelo SB 162-3.
- Autoclave: Marca Selecta, modelo Autester-G.
- Balanzas: Marca Sartorius, modelo 6110 (sensibilidad $\pm 0.0001\text{g}$); marca Sartorius, modelo Aculab, (sensibilidad $\pm 0.0001\text{g}$); y marca Gram precision, modelo AHZ (sensibilidad $\pm 0.01\text{g}$).
- Calorímetro: Marca Body-Media, modelo SenseWear Armband.
- Campanas de flujo laminar: Marca Burdinola, modelo OR-ST 1200; Marca Cruimar.
- Centrífugas: Marca Heraeus, modelo Sepatech Biofuge 17RS; marca Hattich, modelo Rotina 35R; marca Sigma, modelo 1-14; marca Thermo Scientific, modelo Sorvall legend XTR.
- Colesterómetro: Marca Roche, modelo Accutrend GC.
- Cromatógrafo líquido de alta eficacia para la determinación de glutatión: 2 bombas marca Waters, modelo 510; autoinyector marca Shimadzu, modelo SIL-10AD vp; detector UV marca Waters, modelo 441 (longitud de onda constante de 365 nm); ordenador marca IBM XT, modelo 286 (con integrador y control de equipo); columna cromatográfica marca Waters, modelo Spherisorb aminada (dimensiones 20 x 0.46cm y 5 μm de diámetro de partícula).
- Cromatógrafo líquido de alta eficacia para la determinación de MDA: Bomba marca Shimadzu, modelo LC-10 AD; autoinyector marca Shimadzu, modelo

SIL-10AD vp; detector UV Shimadzu, modelo SPD-10 AV; controlador del equipo marca CBM-10 A; ordenador marca IBM XT, modelo 486 (programa de integración Classic10); columna marca Teknokroma (de fase reversa), modelo Spherisorb C18 (dimensiones 15 x 0.46cm y 5µm de diámetro partícula).

- Cubetas de electroforesis: Marca Bio-Rad, modelo Mini-Protean 3 Cell.
- Cubetas de electrotransferencia: Marca Bio-Rad, modelo Mini Trans-Blot Cell.
- Cuenta kilómetros: Marca Mach, modelo CN 34030850 Totana.
- Dispositivo de grabación de video: Cámara web marca Genius, serie V2.
- Dispositivo fotográfico: Marca Nikon, modelo Coolpix S200.
- Equipo de sedación: Marca Cibertec (con vaporizador de Isoflurano).
- Espectrofotómetros: Marca Cecil, modelo CE 3021, 3000 Series; marca Kontron, modelo Uvikon 810 termostatazador; Microplate Spectrophotometer, marca Spectra-max, modelo PLUS 384.
- Fuentes de alimentación para la electroforesis: Marca Sigma, modelo PS 250-2; marca Biorad, modelo 200/2.0 Power Supply.
- Glucómetro: Marca Aviva, modelo Accu-check 0088.
- Homogeneizador: Marca Janke & Kunkel. Ika-Werk, modelo RW 20 DZM.
- Lactatómetro: Marca LactatePro.
- Lavador de placas ELISA: Marca Tecan, modelo HydroFlex.
- Lupa binocular: Marca Motic, modelo SMZ-140 Series.
- Material quirúrgico: Marca Lawton, modelo Hibc-Code.
- Nanodrop: Marca Thermo Scientific, modelo 2000.
- pHmetro: Marca Crison, modelo GLP21. Electrodo incorporado INGLOD.

- Pulsómetro: Marca Sigma, modelo PC 3.11.
- Ruedas para ejercicio voluntario: Marca AQ 6084 (11.5 cm de diámetro).
- Sistema de digitalización y análisis de Imágenes: Marca Fujifilm, modelo LAS-1000 plus.
- Sistema de purificación de agua: Marca Millipore, modelo Milli-Q y Milli-R.
- Tapiz rodante: Marca Columbus Instruments, modelo Excer-3r Treadmill.
- Termociclador: Marca Biorad, modelo iCyder Iqtm Multi-Color. Real-Time PCR Detection System.
- Test de campo abierto: Cubo casero abierto y con superficie blanca de 50x50x25 cm dividida en cuadrados de 5 cm² siguiendo el protocolo “Panlab/Harvard-Apparatus”.
- Test de fuerza de agarre: Marca Bioseb, Grip strength test, modelo GS3.
- Test de reconocimiento de objetos: Recipiente blanco rectangular de unas dimensiones de 60x48x52 cm dentro de un cubo de mayor tamaño, blanco también. 4 objetos para reconocimiento, 3 de ellos diferentes en color, forma y textura.
- Tiras reactivas de colesterol: Marca Roche, Accutrend Cholesterol.
- Tiras reactivas de glucosa: Marca Bayer, Ascensia Elite.
- Tiras reactivas de lactato: Marca LactatePro.

1.5. Reactivos.

- Aislamiento de ARN total: *Trizol Reagent* (Invitrogen™).
- Anestesia: Isoflurano, sevoflurano, ketamina, xilacina.

- Desinfección: Etanol 70%, betadine.
- Determinación de proteínas por el método de Bradford: Se utilizó el reactivo *Bradford Reagent* (BioRad).
- Determinación de proteínas por el método de Lowry: Se empleó *Protein ASSAY Kit*, que contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin (Sigma-Aldrich Química).
- ELISAs: *Kit Human A β 42 ELISA* (Ref. KHB3441, Invitrogen) y *kit Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich Elisa kit* (Ref. CYT306, ChemiKine, Millipore).
- Enzimas: Glutación reductasa, glutatión-S-transferasa, peroxidasa de rábano (HRP), Glutatión-S- transferasa, 18F-Fluorodesoxiglucosa (18F-FDG).
- Eutanasia: Pentobarbital sódico.
- Proteínas carboniladas: *Kit Oxyblot protein oxidation detection kit* (Millipore).
- Retrotranscripción y amplificación: Para la realización de la RT-PCR se empleó el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*.
- Revelado de las membranas de Western blotting. Para revelar las membranas de nitrocelulosa (Whatman. PROTRAN) y las de PVDF (Bio-Rad) de los Western blotting se empleó el kit *Amersham ECL Western blotting detection reagents and análisis system* (GE Healthcare). Está basado en la utilización de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa.
- Tratamiento: 7,8-dihidroxi flavona (7,8-DHF), suero salino fisiológico, DMSO.
- Otros reactivos: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS); ácido acético; ácido batofenantrolindisulfónico (BPDS); ácido clorhídrico; ácido iodoacético; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); ácido málico; ácido perclórico; acrilamida; azul bromofenol; azul comassie; bisacrilamida; cianuro

potásico; cloro dinitrobenceno; cloruro sódico; dimetil sulfóxido (DMSO); etileno glicol-bis (aminoetil eter)-N,N,N',N'- ácido tetracético (EGTA); fosfato potásico; glicerol; glicina; glutatión oxidado (GSSG); glutatión reducido (GSH); hidróxido de potasio (KOH); malondialdehído (MDA); mercaptoetanol; metanol; N-(2-hidroxiethyl)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico) (HEPES); N,N,N,N'-tetrametilnetilenodiamina (TEMED); N-etilmaleimida (NEM); ortovanadato de sodio; peróxido de hidrógeno (H₂O₂); persulfato amónico (APS); polioxietileno sorbitan monooleato (Tween 20); púrpura de m-cresol; sacarosa; sodio dodecil sulfato (SDS); suero bovino albúmina (BSA); γ -glutamylglutamato (γ -Glu-Glu).

Los reactivos se obtuvieron de las firmas: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Panreac, Merck Biochemica (Alemania), Fisher Scientific Company (USA), Pharmacia Biotech (USA), Intergen Company (USA), Cell Signaling Technology (USA).

2. Métodos.

2.1. Diseños experimentales.

2.1.1. Objetivo 1.

En el diseño experimental llevado a cabo en el *Objetivo 1* participaron dos grupos de adolescentes, uno entrenado (*Trained*; n=9) y otro sedentario (*Sedentary*; n=7). El grupo entrenado fue evaluado en dos momentos distintos del periodo deportivo: en pretemporada, donde la intensidad de entrenamiento es moderada; y en post-competición, donde el nivel de exigencia física es muy intenso. En ambas citaciones los adolescentes entrenados tuvieron al menos 1 semana de descanso desde el último entrenamiento. En el periodo de pretemporada deportiva ambos grupos fueron citados conjuntamente. En este momento se evaluó la actividad física cotidiana (mediante calorimetría) así como la antropometría. Por último se extrajo sangre. El volumen destinado a hematología se procesó y analizó y aquél destinado al análisis de IGF-1 y BDNF se congeló a -20°C hasta su análisis (véase en los apartados 2.7.5. y 2.7.6.). En el periodo post-competitivo el grupo entrenado fue citado nuevamente para una nueva extracción de sangre. Ésta fue procesada y congelada bajo idénticas condiciones hasta su análisis (**Figura III.1**).

Figura III.1. Diagrama del diseño experimental del *Objetivo 1*.

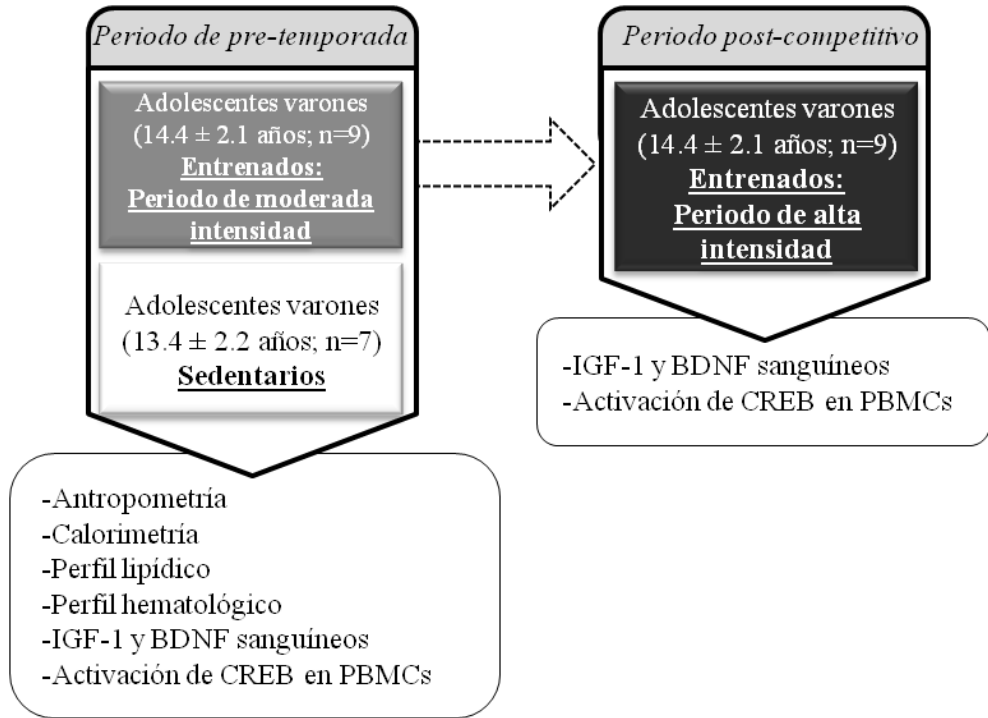


Figura III.1. Abreviaturas no definidas en el texto: PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells [células mononucleares de sangre periférica]*).

2.1.2. Objetivo 2.

El diseño experimental del *Objetivo 2* fue longitudinal. En él 12 voluntarios adultos, varones y sanos fueron reclutados. En una primera visita al laboratorio los sujetos fueron evaluados antropométricamente, se les realizó un electrocardiograma de reposo y cumplieron el cuestionario de hábitos de actividad física IPAQ-S. En los siguientes días cada sujeto volvió al laboratorio individualmente. En cada una de estas sesiones se procedió de la misma forma: Se pidió a cada participante que permaneciera 30 min tumbado en reposo. A continuación se realizó la primera extracción de sangre (*Pre*). Las muestras fueron procesadas de acuerdo a varios protocolos (véase en el apartado 2.6.1). Una vez el voluntario estuvo preparado comenzó el test incremental en cicloergómetro. La duración del ejercicio dependió de cada participante mientras que el protocolo se mantuvo fijo (véase en el apartado 2.2.1.). Durante el ejercicio la frecuencia cardíaca (FC) fue monitorizada mediante el uso de un pulsómetro (Sigma, PC 3.11) así como el lactato en sangre capilar mediante un analizador portátil de lactato (LactatePro). Inmediatamente después del ejercicio (*Post*), a los 30 y a los 60 min de recuperación (30' y 60' respectivamente) se extrajeron nuevas muestras de sangre que fueron sometidas a los mismos procesamientos (**Figura III.2**).

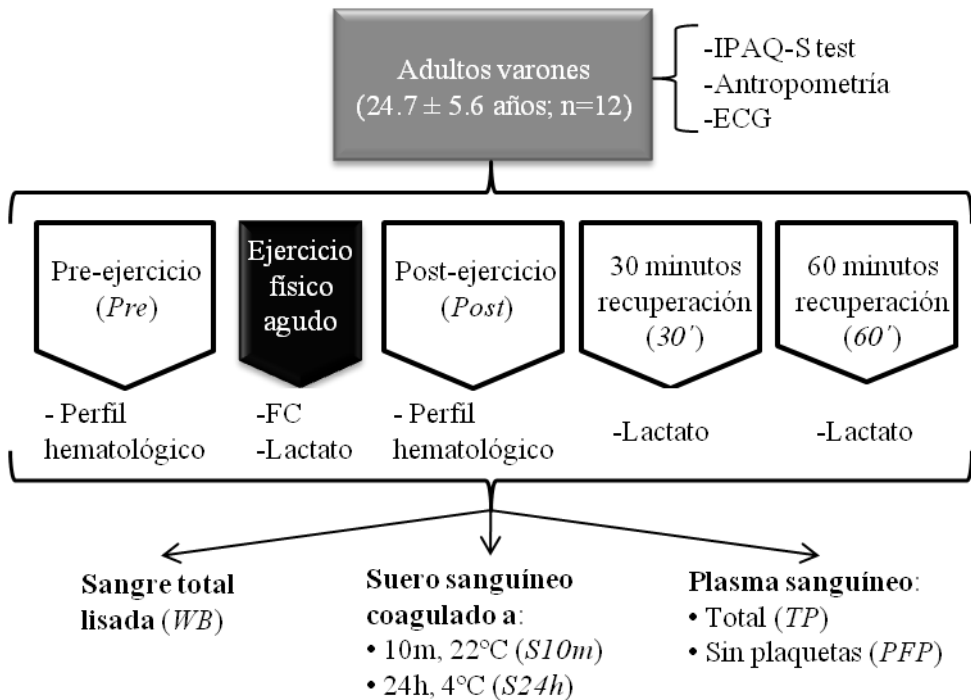
Figura III.2. Diagrama del diseño experimental del *Objetivo 2*.

Figura III.2. Abreviaturas no definidas en el texto: *IPAQ-S* (international physical activity questionnaire [cuestionario internacional de actividad física]), *ECG* (electrocardiograma), *WB* (whole blood [sangre total]), *TP* (total plasma [plasma total]), *PFP* (Platelets-free plasma [plasma libre de plaquetas]).

2.1.3. Objetivo 3.

El diseño experimental desarrollado para el presente objetivo comenzó con dos grupos de ratones hembra, 2xTg (n=10) y NTg (n=8) de 10 meses de edad. Éstos fueron sometidos a una batería de test cognitivo/comportamentales y físicos. Posteriormente fueron divididos aleatoriamente en dos subgrupos: ejercicio (Ex) y sedentarios (Sed). Los entrenados fueron sometidos a 12 semanas de ejercicio (véase en el apartado 2.2.2.1.) mientras que los sedentarios fueron manipulados en condiciones similares sin ser sometidos a entrenamiento. Durante este periodo se realizó un estudio de la glucemia, colesterolemia y peso de todos los animales. Al finalizar fueron sometidos nuevamente a la misma batería de test cognitivo/comportamentales y físicos. Así mismo se sometieron a una prueba de tomografía por emisión de positrones (PET por sus siglas en inglés, *positron emission tomography*) con el fin de estudiar la captación de glucosa por parte del cerebro. Al finalizar los animales fueron eutanasiados y sus órganos y sangre debidamente procesados y congelados hasta su análisis (véase en apartado 2.5.2.) (**Figura III.3**).

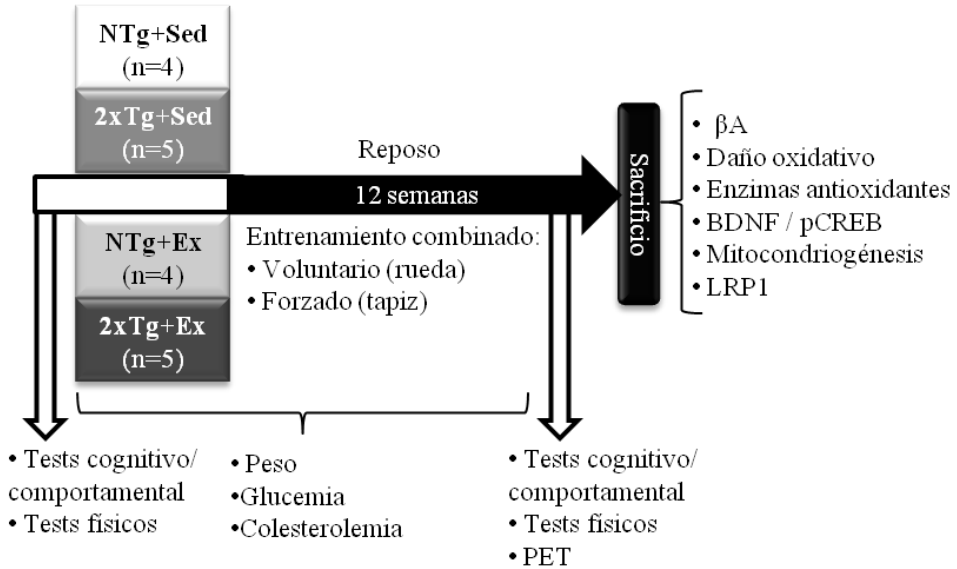
Figura III.3. Diagrama del diseño experimental del *Objetivo 3*.

Figura III.3. NTg+Sed, ratón no transgénico sedentario; 2xTg+Sed, ratón doble transgénico de Alzheimer sedentario; NTg+Ex, ratón no transgénico entrenado; 2xTg+Ex, ratón doble transgénico de Alzheimer entrenado.

2.1.4. Objetivo 4.

El diseño experimental desarrollado para el *Objetivo 4* partió de dos grupos de ratones hembra, 3xTg y NTg. Cuando los ratones tuvieron 4 meses de edad fueron aleatoriamente subdivididos en dos grupos en base a la cirugía a la que serían sometidos: ratones sometidos a ovariectomía (Ov) y ratones a los que se realizaría una operación simulada (S) (véase en apartado 2.2.3.). Dos meses después los 4 grupos fueron subdivididos a su vez en dos, sometiendo a la mitad a un entrenamiento con ejercicio físico voluntario (Ex) mientras que la otra mitad se mantuvo en reposo (Sed). En total trabajamos con 8 grupos experimentales (NTgS+Sed, n=6; NTgS+Ex, n=8; NTgOv+Sed, n=6; NTgOv+Ex, n=7; 3xTgS+Sed, n=8; 3xTgS+Ex, n=7; 3xTgOv+Sed, n=7; 3xTgOv+Ex, n=5). El periodo de ejercicio físico (y sedentarismo) fue de 12 semanas. Al terminar los ratones fueron sometidos una batería de test cognitivo/comportamentales, tras lo cual fueron eutanasiados y sus órganos debidamente procesados y congelados hasta su análisis (véase en apartado 2.5.2.) (**Figura III.4**).

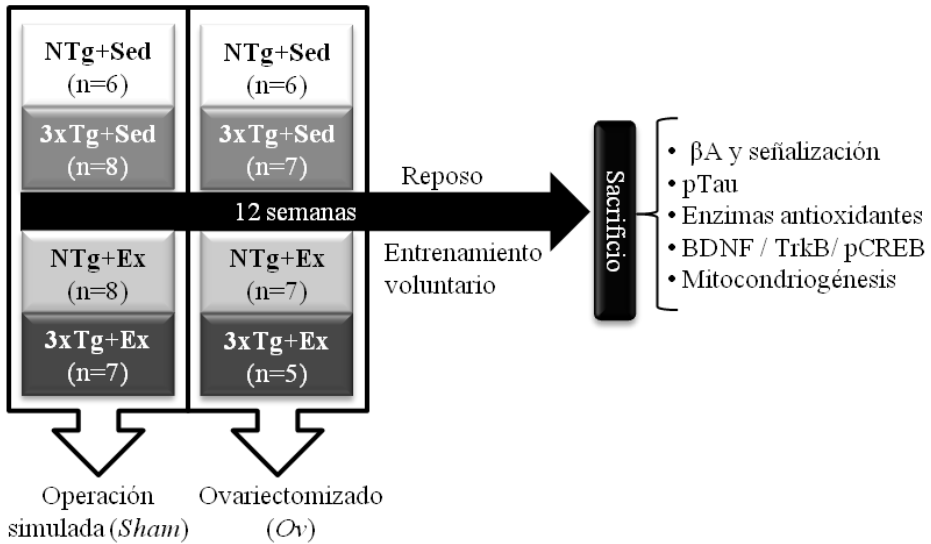
Figura III.4. Diagrama del diseño experimental del *Objetivo 4*.

Figura III.4. NTg+Sed, ratón no transgénico sedentario; 3xTg+Sed, ratón triple transgénico de Alzheimer sedentario; NTg+Ex, ratón no transgénico entrenado; 3xTg+Ex, ratón triple transgénico de Alzheimer entrenado.

2.1.5. Objetivo 5.

En el diseño experimental desarrollado para el *Objetivo 5* se dividió aleatoriamente a ratas de 4 meses de edad en 4 grupos experimentales: ratas tratadas con 7,8-DHF (7,8-DHF, n=8); ratas sometidas a entrenamiento físico (Ex, n=10); ratas sometidas a entrenamiento y tratadas con 7,8-DHF (Ex+7,8-DHF, n=8); y ratas controles (Control, n=10). El periodo de tratamiento fue de 6 semanas. Al terminar las ratas fueron sometidas a una batería de test cognitivo/comportamentales. Tras esto, los animales fueron eutanasiados y sus órganos debidamente procesados y congelados hasta su análisis (véase en apartado 2.5.2.) (**Figura III.5**).

Figura III. 5. Diagrama del diseño experimental del *Objetivo 5*.

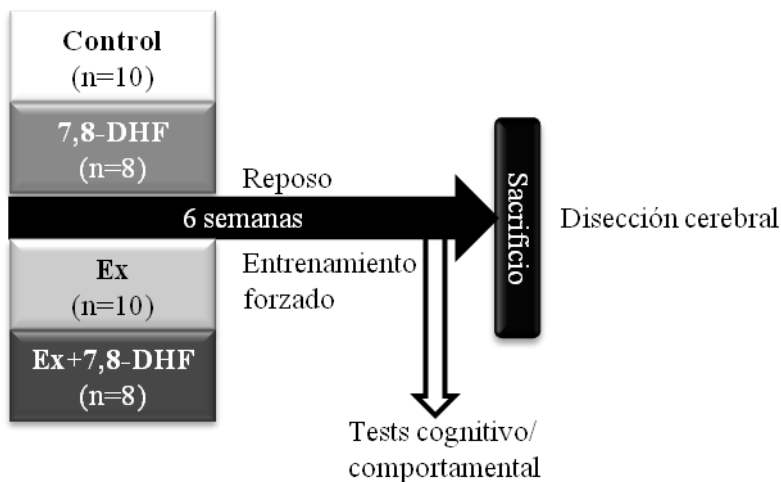


Figura III.5. 7,8-DHF, grupo tratado con 7,8-dihidroxiflavona; Ex, grupo entrenado.

2.2. Tratamientos y condiciones.

2.2.1. Protocolo de ejercicio físico implementado en humanos (Objetivo 2).

El protocolo de ejercicio desarrollado en el *Objetivo 2* se llevó a cabo en cicloergómetro. Tras 5 min de calentamiento, la prueba incremental empezó con 75 W. Posteriormente la carga de trabajo se incrementó 50 W cada 3 min hasta alcanzar los 9 min. A partir de entonces, la carga de trabajo incrementó en 25 W/min hasta el agotamiento.

2.2.2. Protocolo de entrenamiento físico implementado en roedores.

2.2.2.1. Entrenamiento físico implementado en el Objetivo 3.

En el desarrollo del *Objetivo 3*, con ratones 2xTg y NTg de 10 meses de edad, se empleó un protocolo de entrenamiento combinado entre ejercicio voluntario y forzado durante 12 semanas. El ejercicio voluntario consistió en una rueda de carrera instalada en la jaula de cada ratón y de acceso libre 24 horas. En ésta se instaló un sistema electromagnético de recuento de vueltas mediante el cual se calculó la distancia recorrida diariamente por cada ratón (cuentakilómetros Mach, modelo CN 34030850, Totana). El entrenamiento forzado se llevó a cabo en un tapiz rodante (Columbus Instruments, modelo Excer-3r Treadmill). Este tapiz regulaba la velocidad de carrera y la intensidad de las electrocuciones que se mantuvieron en todo momento al mínimo. Estas electrocuciones sirvieron para garantizar que todos alcanzaran un mínimo volumen de entrenamiento. El protocolo empleado comenzó con una semana de familiarización y adaptación tras la cual se incrementó la intensidad y duración de forma paulatina hasta alcanzar los 60 min a una velocidad de 20 m/min, 3 días a la semana.

Los ratones de los grupos sedentarios fueron manipulados y sometidos a las mismas condiciones que los ratones entrenados. Así, se introdujeron

frecuentemente en el tapiz rodante activo con el fin de compensar posibles sesgos ocasionados por el estrés de la manipulación. Los ratones de los grupos sedentarios no fueron entrenados.

2.2.2.2. Entrenamiento físico implementado en el Objetivo 4.

En el *Objetivo 4* los ratones 3xTg y NTg con 6 meses de edad, fueron sometidos a un entrenamiento voluntario con rueda de carrera durante 12 semanas. Estas ruedas, de acceso libre 24 horas, permanecieron conectadas al sistema computarizado *Activity Wheel Cage System* para ratones (Techniplast) tal como describe García-Mesa *et al.* (García-Mesa *et al.* 2011b). Dicho sistema permitió recoger de manera continua el número de vueltas de la rueda para así calcular la actividad realizada en cada caja y por ende la distancia y tiempo cubierto aproximadamente por cada ratón.

2.2.2.3. Entrenamiento físico implementado en el Objetivo 5.

En el desarrollo del *Objetivo 5* las ratas de 4 meses de edad fueron sometidas a un protocolo de entrenamiento mediante ejercicio forzado durante 6 semanas. El entrenamiento se llevó a cabo en un tapiz rodante (Columbus Instruments, modelo Excer-3r Treadmill). Las electrocuciones se mantuvieron en todo momento al mínimo. Con ellas garantizamos que todas alcanzaran un mínimo volumen de entrenamiento. El protocolo empleado comenzó con una semana de familiarización y adaptación (5 min a 20 m/min) tras la cual se incrementó la intensidad y duración de forma paulatina hasta alcanzar los 85 min a una velocidad de 50 cm por segundo, 5 días a la semana.

Las ratas de los grupos sedentarios fueron manipuladas y sometidas a las mismas condiciones que los ratones entrenados. Así, se introdujeron frecuentemente en el

tapiz rodante activo con el fin de igualar posibles sesgos debidos al estrés. Los ratones de los grupos sedentarios no fueron entrenados.

2.2.3. Ovariectomía y cirugía simulada.

2.2.3.1. Anestesia.

El procedimiento de extirpación ovárica duró aproximadamente 30 min. Por ello la sedación se administró mediante una combinación de ketamina/xilacina (50-150/5-10 mg/Kg) por vía intraperitoneal.

2.2.3.2. Cirugía.

Una vez anestesiado, cada animal fue rasurado en la zona sacro-lumbar. Tras desinfectar con etanol 70% y povidona yodada (*Betadine*) se realizaron dos pequeñas incisiones paralelas a la columna vertebral, al terminar la región costal, para localizar los ovarios bilateralmente. Una vez localizados se procedió a ligar los oviductos y los vasos sanguíneos junto a los ovarios. Seguidamente fueron extirpados y se suturó cada incisión con un punto interior y otro exterior (Sutura PGA, reabsorción 40 días, *Suturas Aragón*). Todo el procedimiento fue realizado con material quirúrgico estéril. En el post-operatorio los ratones fueron colocados sobre una manta térmica hasta su recuperación.

Los ratones utilizados como controles de la ovariectomía se expusieron de forma similar a todo el procedimiento salvo que sus ovarios fueron expuestos al medio y luego reintroducidos cuidadosamente.

Todos los animales permanecieron en reposo durante los dos meses posteriores a la cirugía. A continuación comenzaron el entrenamiento físico.

La comprobación de la ovariectomía fue realizada tras sacrificar a los animales al final del diseño experimental pesando su útero. Así, se comprobó que el peso del útero de los ratones ovariectomizados fue significativamente menor ($P < 0.0001$), resultados mostrados en García-Mesa *et al.* (García-Mesa *et al.* 2011a).

2.2.4. Tratamiento con 7,8-dihidroflavona.

La 7,8-DHF fue disuelta en suero salino y DMSO (17%) tras varios minutos de vorteo vigoroso. Se calculó una dosis de 5mg/Kg de peso del animal. La administración fue intraperitoneal 5 veces por semana con un volumen aproximado de 200 μ L siguiendo las concentraciones descritas en modelos similares (Andero *et al.* 2011; Devi & Ohno 2012; Zeng *et al.* 2012a; Zeng *et al.* 2012b).

Las ratas del grupo control fueron tratadas exclusivamente con el vehículo (suero salino y DMSO 17%) 5 veces por semana respetando el mismo volumen de inyección.

2.3. Evaluaciones no invasivas en humanos.

2.3.1. Calorimetría / Acelerometría en humanos.

Para realizar el análisis de los niveles de actividad física diarios de los participantes reclutados en el diseño experimental del *Objetivo 1* utilizamos el sistema *ArmBand SenseWear* (BodyMedia). Se trata de un dispositivo portátil que integra un sistema de calorimetría y acelerometría. Proporciona información sobre el gasto calórico y los niveles de actividad física durante un periodo de tiempo de varios días. Dicho dispositivo registra distintas variables: temperatura corporal con alta precisión y resolución, disipación térmica corporal, corriente galvánica de la piel (conductividad), movimientos y aceleraciones longitudinales y transversales.

2.3.1.1. Procedimiento.

El dispositivo fue colocado sobre el tríceps del brazo derecho de cada adolescente durante 4 días que incluyeron al menos un día de fin de semana. Durante este tiempo los participantes sólo se quitaron el dispositivo para ducharse.

2.3.1.2. Cálculos.

Tras algoritmos realizados con el programa informático *InnerView* se analizaron los datos considerando principalmente la disipación térmica y el grado de humedad de la piel así como los movimientos corporales en tipo y magnitud. Este programa muestra datos promediados cada 24 horas sobre el gasto energético total (TEE por sus siglas en inglés, *total energy expenditure*) así como aquel gasto realizado con una actividad superior a 2.5 equivalentes metabólicos (METs por sus siglas en inglés, *Metabolic Equivalent Task*) (PAEE por sus siglas en inglés, *physical activity energy expenditure*) en calorías.

2.3.2. Cuestionario internacional de actividad física (IPAQ-S).

En el diseño experimental del *Objetivo 2* se analizaron los niveles de actividad física a través del Cuestionario Internacional de Actividad Física en su versión corta (IPAQ-S) (<http://www.ipaq.ki.se>) (Craig *et al.* 2003). IPAQ-S es ampliamente utilizado y ha sido validado en estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Eurobarómetros de la Unión Europea entre otros (Hagstromer *et al.* 2008). Se trata de un cuestionario auto-administrado aplicable a sujetos de entre 15 y 69 años y las preguntas hacen referencia al tiempo que el sujeto estuvo físicamente activo en 7 días previos al test. Analiza 4 esferas de la vida cotidiana: actividades que el sujeto realiza como

parte de su trabajo; las actividades domésticas (jardín, hogar, etc.); el transporte para ir de un sitio a otro; y el tiempo libre (ejercicio físico, deporte, etc.).

2.3.2.1. Procedimiento.

Se trata de un cuestionario auto-administrado. Se reclutó a los participantes y, tras realizar una explicación sobre la cumplimentación del documento, procedieron a rellenarlo.

2.3.2.2. Cálculos.

Se clasifican los resultados según el tipo de actividad física que realizan. Los datos recogidos con IPAQ-S permiten calcular la actividad física mediante la ponderación de cada tipo de actividad teniendo en cuenta sus requerimientos energéticos definidos en METs (McArdle 2004) y así obtener una puntuación en METs/min. Las correspondencias para el cálculo se basaron en los siguientes datos de referencia proporcionados por el propio cuestionario: Caminar (3.3 METs); actividad física moderada (4 METs) y actividad física vigorosa (8 METs). En base a estos resultados los sujetos se clasifican en tres categorías:

- Bajo: Personas que no cumplen los criterios para la categoría “moderado” y “alto”.
- Moderado: Cumple uno de los siguientes criterios: 3 o más días de actividad de intensidad vigorosa durante al menos 20 min/día; 5 o más días de intensidad moderada y/o caminar por lo menos 30 min/día; 5 o más días realizando caminatas de intensidad moderada o vigorosa, cumpliendo al menos 600 METs/min a la semana.

- Alto: Cumple uno de los siguientes criterios: actividad de intensidad vigorosa al menos 3 días semanales logrando así un mínimo de 1500 METs/min por semana; 7 o más días caminando a intensidad moderada o vigorosa, logrando un mínimo de 3000 METs/min semanales.

2.3.3. Antropometría en humanos.

Se analizaron las características antropométricas en los diseños experimentales donde se reclutaron humanos (*Objetivo 1 y 2*). Éstas tuvieron la doble finalidad de definir las características físicas de los participantes reclutados así como establecer la existencia o no de homogeneidad en la muestra.

Se evaluó el peso y altura en los sujetos adultos (*Objetivo 2*) y además los pliegues y porcentajes graso y magro en los adolescentes. En éstos últimos, el análisis antropométrico junto con el estudio del estadio madurativo (escalas de Tanner (Marshall & Tanner 1970)) ayudó a establecer una homogeneidad en la muestra de estudio (*Objetivo 1*).

2.3.3.1. Procedimiento.

El peso corporal, la altura y los pliegues tricípital y subescapular de los adolescentes reclutados en el diseño experimental del *Objetivo 1* se midieron mediante técnicas estandarizadas así como el peso y la altura de los participantes adultos del *Objetivo 2*. Por otro lado, todos los sujetos fueron monitorizados de acuerdo al estadio de desarrollo puberal según la escala de Tanner (Marshall & Tanner 1970). Todas las determinaciones antropométricas se llevaron a cabo por personal sanitario con experiencia y debidamente cualificados en la implementación de estas técnicas.

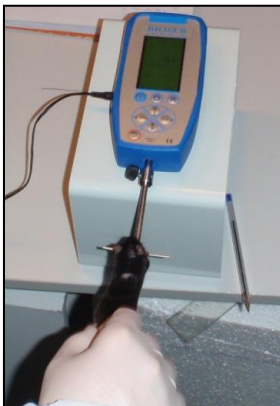
2.3.3.2. Cálculos.

Debido a la juventud de los participantes del *Objetivo 1* (14.0 ± 2.2 años), el peso corporal fue medido por técnicas estandarizadas y expresado en unidades clásicas (Kg) (al igual que la antropometría de los sujetos adultos del *Objetivo 2*); mientras que los parámetros antropométricos altura e índice de masa corporal (IMC) fueron calculados y expresados mediante el “z-score” para su edad (basado en las referencias de crecimiento de la OMS, 2007). Para calcular el porcentaje de grasa corporal (% fat) se determinaron los pliegues tricípital y subescapular y se empleó la ecuación descrita por Slaughter *et al.* (Slaughter *et al.* 1988). El porcentaje de masa magra (% lean mass) se calculó restando al peso total el peso graso.

2.4. Evaluaciones *in vivo* de los roedores.

2.4.1. Test de fuerza de agarre.

Este test fue implementado en los ratones del *Objetivo 3* utilizando un aparataje específico conocido como *Grip strength test* (Bioseb, modelo GS3). *Grip strength test* está compuesto de 4 unidades: una base donde se apoya el transductor de señal y pantalla digital a la cual se atornilla ésta; el propio transductor donde llega la información dinamométrica de tracción y que a través de la pantalla plasma el resultado obtenido; la barra donde se agarra el ratón (modelo de ratón con forma de “T”); y el tornillo que une la barra con el transductor de señal (**Figura III.6**).

Figura III.6. Test de fuerza de agarre en ratones.

2.4.1.1. Procedimiento.

Antes de comenzar aseguramos un ambiente tranquilo, sin ruidos y con luz tenue. Todos los ratones permanecieron al menos 10 min antes en la habitación para habituarse a la misma. Para la realización del test se cogió a cada ratón por la cola en un punto medio dejándolo suspendido sobre la barra “T”. A continuación se bajó al ratón paulatinamente hasta que pudiera asirse a la barra con las patas delanteras. Una vez agarrado se bajaba la cola hasta dejar el cuerpo del animal horizontal y con cierta tensión. A continuación, con un movimiento suave y uniforme, se tiraba de la cola del ratón horizontalmente buscando romper el agarre de éste a la barra (Ingram 1983; Senechal *et al.* 2008).

2.4.1.2. Cálculos.

Se realizaron un total de 5 intentos con 30 segundos entre cada uno de ellos. Después se calculó el promedio. La información de la fuerza ejercida por el ratón hasta que soltaba la barra se obtuvo en Newtons (N). Estos resultados fueron

relativizados por el peso de cada animal (N/g) con el fin de evitar sesgos. Todos los componentes del aparato fueron limpiados previo uso en cada ratón.

2.4.2. Test de velocidad aeróbica máxima.

Para la realización del test de velocidad aeróbica máxima en los ratones del *Objetivo 3* se utilizó un tapiz rodante adaptado para ratones (Columbus Instruments, modelo Excer-3r Treadmill).

La capacidad oxidativa muscular es uno de las mejores determinantes de la capacidad aeróbica. El VO_2 máximo está indirectamente relacionado con esta capacidad aeróbica pero lo está directamente con la intensidad del trabajo realizado no siendo ésta limitada por la capacidad oxidativa (Davies *et al.* 1982).

2.4.2.1. Procedimiento.

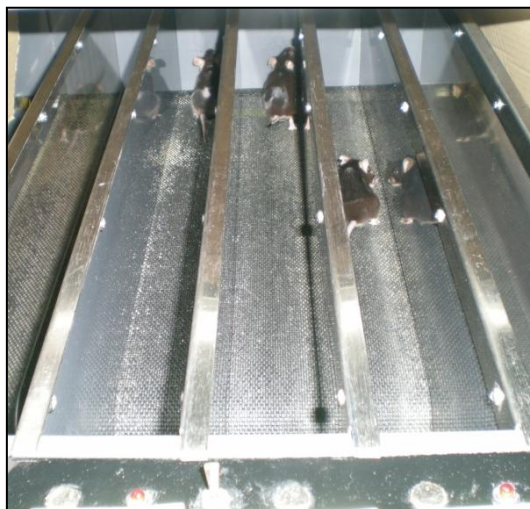
Antes de comenzar el test todos los animales fueron habituados al aparataje y a la dinámica del tapiz siendo sometidos a 3 días de acondicionamiento (velocidad de 10 m/min durante 10-20 min). Una vez transcurridas las 12 semanas de entrenamiento/sedentarismo los ratones fueron sometidos nuevamente al test respetando idénticas condiciones técnicas, horarias y personales. El tapiz dispone de un diseño específico para proporcionar pequeñas electrocuciones a cada animal individualmente cuando éste llega al final de su carril por haber cesado su carrera. No obstante, minimizamos la utilización de este estímulo mediante pinceles con los que empujamos suavemente al animal hacia delante para estimular su carrera (**Figura III.7**). El protocolo incremental progresivo de velocidad que se desarrolló fue adaptado de la bibliografía más representativa que lo describe (Davies *et al.* 1982; Davidson *et al.* 2006) tal como muestra la Tabla III.1.

Tabla III.1. Protocolo del test de velocidad aeróbica máxima.

Rango de tiempo (min)	Velocidad (m/min)
0 – 6	6
6 – 8	8
8 – 10	10
10 – 12	12
12 – 14	14
14 – 16	16
16 – 18	18
18 – 20	20
...	...

2.4.2.2. Cálculos.

Para considerar que un ratón había llegado al límite de su velocidad aeróbica máxima consideramos que éste debía permanecer en el final del tapiz recibiendo la electrocución (o siendo empujado manualmente) y regresase seguida y repetidamente hasta un máximo de 3 veces. Al finalizar el test se anotó la velocidad y tiempo máximos alcanzados.

Figura III.7. Test de velocidad aeróbica máxima.

2.4.3. Test de campo abierto.

El test de campo abierto se realizó a los ratones del *Objetivo 3* y a las ratas del *Objetivo 5* para evaluar su estado comportamental y psicológico.

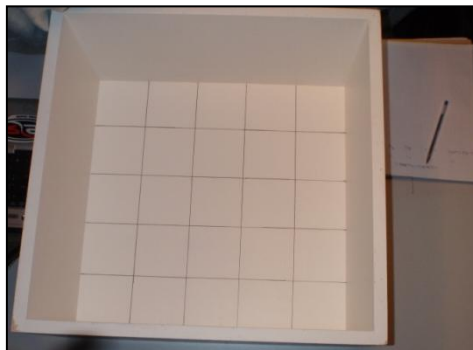
El test de campo abierto fue descrito originalmente por Hall que planteó el test como una herramienta para evaluar el estado emocional de roedores (Hall 1934). El procedimiento original consistía en un animal de experimentación encerrado en un ambiente desconocido del cual quería escapar (Walsh & Cummins 1976). Actualmente el test es ampliamente utilizado en fisiología con distintas variantes. No obstante todas ellas tienen un principio básico: enfrentar al ratón a una situación no conocida (Prut & Belzung 2003). Los parámetros que se cuantifican son: frecuencia de exploraciones verticales, lavados prolongados; preferencia a la periferia del recipiente frente a la zona central; andar cerca de las paredes (comportamiento tigmotáctico); o permanencia en la zona central. Este test es un

buen modelo para analizar la ansiedad normal producida al enfrentarse a una situación estresante o desconocida (Prut & Belzung 2003).

2.4.3.1. Procedimiento.

Se llevó a cabo en un cubo casero abierto y con superficie blanca de 50x50x25 cm y dividida en cuadrados dibujados de 5 cm² siguiendo el protocolo de *PanLab/Harvard-Apparatus* en el que se grabó cada prueba para su posterior análisis (Gimenez-Llort *et al.* 2007b; Fuss *et al.* 2010). Igualmente las pruebas se realizaron en un ambiente tranquilo, sin ruidos y con luz tenue. Así mismo, todos los animales permanecieron en la habitación donde se llevaría a cabo el test al menos 10 min antes. En este test el roedor fue introducido en la caja 5 min y de la grabación se analizaron la batería de variables descritas a continuación (**Figura III.8**).

Figura III.8. Test de campo abierto.



2.4.3.2. Cálculos.

En los ratones del *Objetivo 3* se contabilizaron las siguientes variables: latencia inmóvil; latencia en el cuadrado central; tiempo que tardó el ratón en llegar a la periferia; el tiempo que transcurrió hasta la primera exploración vertical; el tiempo hasta el primer lavado, acicalamiento o “grooming”; el número de total de exploraciones verticales; el número de lavados y el número de defecaciones.

En las ratas del *Objetivo 5* analizamos: el número de total de exploraciones verticales; el número de lavados y el número de defecaciones (Gimenez-Llort *et al.* 2007b).

2.4.4. Test de las esquinas.

Este test fue llevado a cabo en los ratones 2xTg y NTg del *Objetivo 3*. Está basado en fundamentos similares a los descritos en el test de campo abierto con la salvedad de que el análisis se realiza en un ambiente conocido (caja de estabulación clásica).

2.4.4.1. Procedimiento.

En un ambiente tranquilo, sin ruidos y con luz tenue, todos los ratones permanecieron en la habitación donde se llevaría a cabo el test al menos 10 min antes. Después, se introdujo a cada ratón del *Objetivo 3* en una jaula conocida (de tamaño y forma idéntica a donde está estabulado) durante 30 segundos. Durante este tiempo se contabilizaron las variables descritas a continuación.

2.4.4.2. Cálculos.

Se analizaron y contabilizaron los siguientes parámetros: número de esquinas exploradas por el ratón; número de exploraciones verticales (conocidas también

como “rearing”; el ratón verticaliza su posición apoyándose en las patas traseras y el rabo); y el tiempo al que se ha producido la primera exploración vertical.

2.4.5. Test de reconocimiento de objetos.

El test de reconocimiento de objetos, realizado en las ratas del *Objetivo 5*, se basa en el paradigma de la espontánea preferencia a la novedad y en la propensión de los roedores a explorar los objetos nuevos (Ennaceur & Meliani 1992).

Se llevó a cabo en una estructura casera adaptada de la descripción hecha por Hammond *et al.* Se trata de un recipiente blanco rectangular de unas dimensiones de 60x48x52 cm dentro de un cubo de mayor tamaño, blanco, y cuyo objetivo fue aislar el recipiente donde se introduce a los animales de posibles distracciones o ruidos ambientales. En el lado superior del mismo se hizo un agujero para grabar el test con el fin de analizarlo posteriormente (Hammond *et al.* 2004) (**Figura III.9**).

Figura III.9. Test de reconocimiento de objetos.



2.4.5.1. Procedimiento.

El test consistió en dos evaluaciones distanciadas por una semana. Cada sesión consistió en un “ensayo prueba” seguido de un “ensayo test”. En el “ensayo prueba” los animales fueron introducidos en la caja y se les permitió explorar (hocico a aproximadamente 1 cm del objeto en cuestión) dos objetos idénticos, “S1” y “S2”. Ambos objetos fueron colocados con un espaciamiento idéntico sobre la superficie de la caja. Se permitió la exploración hasta alcanzar el “criterio de exploración” que consistió en un tiempo acumulado de 20 segundos explorando ambos objetos (Tiempo 1). 1 min después las ratas fueron reintroducidas durante 5 min para realizar el “ensayo test” en el cual había dos objetos diferentes y no explorados: una copia idéntica del utilizado en el “ensayo prueba” (S3) y un objeto completamente diferente en color, forma y tamaño (N).

Todos los objetos utilizados así como la caja del test fueron lavados y desinfectados entre cada prueba.

2.4.5.2. Cálculos.

La preferencia por el nuevo objeto fue evaluada mediante el índice $TN-TS/TN+TS$ (donde TS y TN son los tiempos que exploraron los objetos “S3” y “N” respectivamente) (Willig *et al.* 1987; Ennaceur & Delacour 1988; Gimenez-Llort *et al.* 2007b).

2.4.6. Tomografía por emisión de positrones (PET).

Los ratones empleados para desarrollar el *Objetivo 3* (2xTg y NTg) fueron sometidos a PET tras terminar el periodo de 12 semanas de ejercicio físico/sedentarismo previo sacrificio.

El estudio del metabolismo glucídico a nivel fisiológico y fisiopatológico mediante tomografía por emisión de positrones (PET) - ^{18}F -Fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG) proporciona importante información acerca del estado de salud de los órganos estudiados. La ^{18}F -FDG es un análogo de la glucosa, con la salvedad de que el isótopo radiactivo ^{18}F sustituye, tras un procedimiento de marcación y síntesis de la molécula ^{18}F -FDG, el grupo OH del carbono 2 de la molécula de glucosa. De este modo, la base teórica para su utilización es que compite con la molécula por entrar en las células para ser consumida y generar ATP, en el proceso de la glucólisis. Sin embargo, y por esa modificación en el carbono 2, una vez que entra en la célula y se fosforila a glucosa-6-fosfato, no puede seguir la reacción y pasar a fructosa-6-fosfato. De este modo, queda atrapada en la célula donde se había iniciado su consumo (**Figura III.10**).

Figura III.10. Molécula de ^{18}F -FDG y esquema de su consumo en la célula.

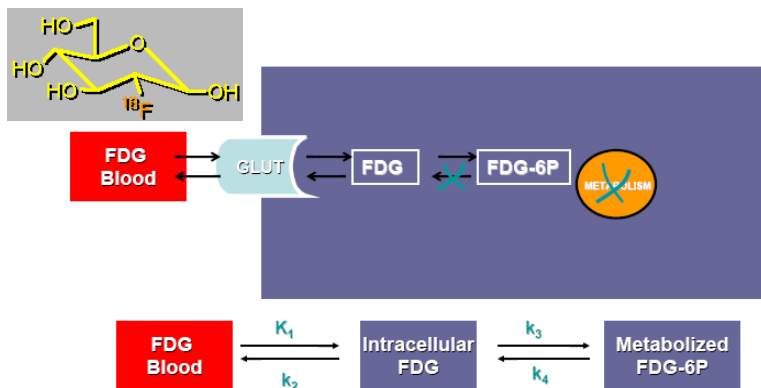


Figura III.10. Abreviaturas: *FDG Blood* (fluorodesoxiglucosa sanguínea); *Glut* (transportador de glucosa); *FDG-6P* (fluorodesoxiglucosa-6 fosfato).

Al ser el ^{18}F un isótopo emisor de positrones (antimateria de los electrones), se produce una emisión más alta ahí donde se ha acumulado más esta molécula, es

decir, en aquellas regiones donde el consumo de glucosa es más elevado. Los positrones, al encontrarse con los electrones, se aniquilan emitiendo dos fotones de alta energía (± 511 KeV) a $\pm 180^\circ$ que son detectados por los módulos de la cámara PET. Estos fotones pasan un filtro temporal y energético para ser aceptados como “verdaderos”, es decir, provienen del mismo punto de origen.

Esta “ventana temporal” se establece en 2-3 nanosegundos, por lo que un fotón que incide en el cristal detector se asocia a otro fotón detectado en el lado opuesto en ese mismo espacio de tiempo. Es necesario además que ambos lleguen dentro del rango de energías del equipo (400-600 KeV), lo cual depende a su vez de la sensibilidad (0.7%). Esta señal luminosa se amplifica a través de unos fotomultiplicadores insertados en cada uno de los módulos de la cámara PET, con lo que al final se transforma en una señal eléctrica proporcional a la intensidad con la que llegaron los fotones y proporcionando información acerca de su punto de origen, o sea, dónde fue consumida la ^{18}F -FDG.

Para discriminar la captación de las diferentes regiones de interés, un aspecto también importante es la resolución espacial. Ella nos permitirá diferenciar zonas con distintos valores de captación pero muy próximos. En el equipo *Albira* PET es de 1.5 mm.

Por ello, y teniendo en cuenta que es una técnica no invasiva, se optó por analizar el consumo de glucosa fisiológico a nivel cerebral de los ratones del *Objetivo 3*. Varios estudios previos se han realizado para intentar estandarizar los métodos y protocolos para animales de investigación (Green *et al.* 1998; Huang *et al.* 2004; Shimoji *et al.* 2004; Laforest *et al.* 2005; Fueger *et al.* 2006; Kim *et al.* 2006; Schiffer *et al.* 2007). Considerando las características del equipo PET *Albira* y la bibliografía existente se determinó el consumo cerebral de glucosa en los grupos estudiados como se expone en el apartado de procedimiento.

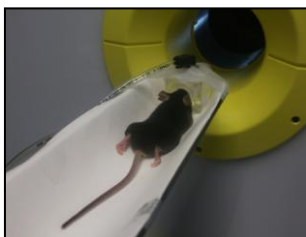
2.4.6.1. Reactivos

- Fluodos, 1110 MBq/mL, solución inyectable (^{18}F -Fluorodesoxiglucosa).
- Isoflurano.
- Oxígeno comprimido medicinal $\geq 99.5\%$.
- Solución salina fisiológica.

2.4.6.2. Procedimiento

En primer lugar, se mantuvo a los animales 4 horas en ayuno (agua *ad libitum*) antes de realizar el estudio PET- ^{18}F -FDG. Tras pesar cada animal y comprobar su temperatura rectal y niveles de glucemia, se introdujo en una cámara de anestesia durante 5 min con oxígeno e isoflurano al 1-2% a un flujo constante de 1.5 L/min. A continuación, se inyectó 200-300 μCi de ^{18}F -FDG vía intravenosa y rápidamente se colocó en la camilla de la cámara PET en la posición establecida previamente para escanear el cerebro (**Figura III.11**).

Figura III.11. Ratón dispuesto en la camilla para ser sometido a PET.



Se realizó un protocolo dinámico de adquisición por secuencias de 1 min hasta completar un periodo de distribución del radiotrazador por todo el cuerpo de 30 min.

Una vez terminada la adquisición de PET, se recolocó la camilla en la posición adecuada para iniciar el estudio anatómico/estructural mediante tomografía computarizada (TC). Para ello, se estableció una adquisición de cuerpo completo estructurado en secuencias espaciales (en este caso de 75 mm de *field of view*) y medida de calidad “estándar”, es decir, 180 proyecciones (de 2°) para formar el giro completo del anillo del CT sobre el animal.

La suma de estos paquetes de datos (30x1 min) generaba un nuevo archivo de datos que fue reconstruido por el programa informático que proporcionó la casa comercial del aparato, mediante un algoritmo *Ossem Cross*, en el cual se hacían 3 correcciones: por decaimiento (puesto que la 18F-FDG tiene una vida media 109.8 min); por dispersión de los positrones; y por coincidencias aleatorias.

Tras reconstruir el archivo de datos se generó un archivo de imagen que utilizamos para cuantificar las regiones de interés y volúmenes de interés (VOI por sus siglas en inglés, *volume of interest*). En nuestro estudio se ha analizado el cerebro y cerebelo de cada ratón. El VOI construido para cada cerebro es analizado mediante el programa *PMOD 2.95*.

Una vez terminado el estudio, se mantuvo 12 horas a cada animal en su jaula (para asegurar que toda la radiación había sido eliminada) con comida y agua *ad libitum*, antes de devolver las jaulas con el resto de su grupo.

2.4.6.3. Cálculos.

La actividad cuantificada en cada uno de los VOIs analizados es la suma de todos los eventos captados por cada uno de ellos en ese periodo de tiempo (30 min) expresada en mCi por unidad de volumen (cm³). Esta captación de ¹⁸F-FDG (SUV por sus siglas en inglés, *standard uptake value*,) es corregida por la dosis inyectada

(ID por sus siglas en inglés, *injected dose*) y el peso del animal, mediante la siguiente fórmula:

$$SUV = \frac{\text{actividad captada en el volumen de interés (mCi/cm}^3\text{)} \times \text{peso (g)}}{\text{ID (mCi)}}$$

$$SUV = \frac{VOI \times \text{Peso}}{\text{ID}} = \frac{(\text{mCi/cm}^3) \times \text{g}}{\text{mCi}} = \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

2.5. Obtención de muestras biológicas.

2.5.1. Extracción de sangre en humanos.

Las muestras de sangre humana fueron tomadas por personal sanitario autorizado y con dilatada experiencia.

En el diseño experimental del *Objetivo 1* los participantes fueron citados a las 8:00 a.m. en ayunas. Tras permanecer en reposo durante al menos 15 min a cada sujeto, sedente y con el brazo en semiflexión, se le fijó el compresor en la parte medial del bíceps. Tras localizar la vena más adecuada por calibre y movilidad en la fosa antecubital, se aplicó alcohol 70% sobre la zona. Posteriormente realizó la punción y se llenaron 4 tubos *Vacutainer*: 1 tubo con etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA), 2 tubos secos y 1 tubo *Ficoll* (BD Vacutainer CPT) para aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés, *peripheral blood mononuclear cells*) (protocolos de procesamiento en apartado 2.6.1.). Por último se retiró la aguja y se ejerció presión sobre la zona de punción con la gasa hasta que dejó de sangrar.

El protocolo de extracción sanguínea del *Objetivo 2* se repitió 4 veces: Basal, post-ejercicio, 30 y 60 min después. El procedimiento fue similar al descrito anteriormente salvo porque el sujeto permaneció tumbado durante todas las extracciones; la punción se realizó con un catéter *Abocat* en la vena radial

permaneciendo éste desde la primera hasta la última extracción. En este caso se extrajeron 4 tubos *Vacutainer*: 2 tubos con EDTA y 2 tubos secos.

2.5.2. Sacrificio de los animales.

2.5.2.1. Técnicas eutanásicas.

En todos los casos se sedó a los animales antes de ser eutanasiados. Se emplearon modelos de anestesia específicos cuyo procedimiento fue versátil e indoloro a la vez que seguro y en el que no se hubiera demostrado toxicidad que pudiera sesgar posteriores análisis de vías neurobiológicas.

Objetivo 3: Los ratones (2xTg y NTg) fueron anestesiados por vía inhalatoria mediante una cámara de inducción con sevoflurano (Sevorane) al 5% durante 5 segundos. Tras asegurar la sedación se extrajo sangre desde la vena cava inferior y a continuación se procedió a la dislocación cervical.

Objetivo 4: Los ratones (3xTg y NTg) fueron anestesiados por vía inhalatoria con CO₂ y posteriormente decapitados.

Objetivo 5: Las ratas recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico (*Eutanax*, 50 mg/Kg) por vía intraperitoneal con el fin de eutanasiar a los animales.

2.5.2.2. Obtención de sangre y órganos.

Objetivo 3: Con el animal anestesiado se procedió a abrir la cavidad abdominal por laparotomía amplia lo cual permitió obtener el plano idóneo para rechazar el paquete intestinal y visualizar el retroperitoneo, por donde se accedió a la vena cava inferior para obtener la sangre con una jeringa de 1 mL.

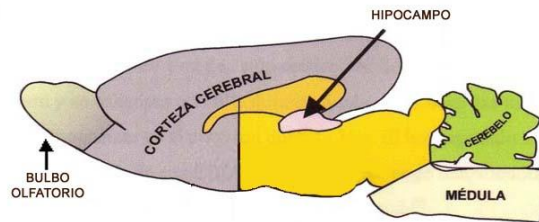
A partir de este momento se dividieron las tareas según la anatomía del animal por lo que se procede a describir de las técnicas separando por regiones.

Al terminar de exanguinar se decapitó al ratón para diseccionar las distintas partes del cerebro. Así, tras cortar el tejido conectivo se dejó el cráneo al descubierto y se procedió a la extracción del cerebro como se detalla a continuación: Se introdujo la punta de unas tijeras finas en los márgenes laterales del agujero occipital de forma dorsolateral al bulbo raquídeo, y en dirección oblicua hacia el conducto auditivo externo. Con unas pinzas, se separó el hueso occipital haciendo presión hacia fuera y, del mismo modo, se levantaron los huesos parietales, haciendo tracción hacia arriba. Con el cerebro al descubierto, se introdujo la pinza curva por la parte delantera envolviendo el lóbulo frontal y se extrajo el cerebro tirando hacia atrás rompiendo así los nervios ópticos y uniones cráneo-encefálicas. Colocando el cerebro en una superficie fría, se lavó con suero fisiológico para eliminar restos de sangre, rápidamente se procedió a la separación de las distintas partes que interesaban: cerebelo, bulbo olfatorio, hipocampo y cortezas (**Figura III.12**).

El cerebelo se extrajo mediante un corte con bisturí en las uniones de éste con el resto del encéfalo. El bulbo olfatorio, situado en la parte más frontal del cerebro, se extrajo cortándolo. Según la labilidad del tejido, parte del bulbo olfatorio podía quedarse obturado en las cavidades nasales. En este caso se extrajo accediendo a las cavidades. Para la extracción del hipocampo, se colocó el cerebro con la corteza hacia arriba. Con un bisturí se realizó una incisión superficial en el seno longitudinal superior para separar ambos hemisferios. Con la pinza curvada se separó una de las cortezas del resto dejando al descubierto el sistema límbico (tálamo, hipotálamo, hipocampo, amígdala cerebral, cuerpo caloso, séptum y mesencéfalo). Se hizo igual con el otro hemisferio. Con ayuda del bisturí y la pinza curvada se extrajo la región anatómica del hipocampo identificada por su color más blanquecino, su morfología redondeada y su situación anatómica. El resto del tejido cerebral se limpió y separó del resto regiones con el fin de aislar la corteza. Todas las regiones cerebrales aisladas se introdujeron en tubos Eppendorf por separado y se congelaron en nitrógeno líquido.

Por último se extrajeron órganos como el hígado, los riñones, el corazón y los pulmones así como los músculos gastrocnemio y sóleo. No obstante, al no haber sido analizados en la presente tesis, no serán descritos los protocolos de obtención y procesamiento.

Figura III.12. Esquema del encéfalo murino.



Objetivo 4: Los ratones de este diseño experimental fueron decapitados tras ser anestesiados. Se accedió al encéfalo de forma similar a la descrita antes. Se diseccionó y aisló el hipocampo y la corteza cerebral que fueron congeladas a -80°C hasta su análisis. En el momento del sacrificio se aisló y pesó el útero para testar la eficacia de la ovariectomía.

Objetivo 5: Tras eutanasiar a las ratas se procedió a su decapitación. La sangre fue extraída del cuerpo que se mantuvo decapitado en posición vertical mientras la cabeza fue diseccionada por otro lado. El protocolo de aislamiento y recogida de hipocampo, corteza cerebral, bulbo olfatorio y cerebelo fue idéntico al descrito anteriormente, salvo porque un hemisferio completo (derecho) fue introducido en paraformaldehído 4% al igual que los riñones e hígado. Estas muestras después fueron incluidas en parafina con el objetivo de realizar análisis inmunohistoquímicos.

2.6. Procesamiento de la sangre y los tejidos.

2.6.1. Procesamiento de la sangre humana.

Se siguieron varios protocolos de procesamiento de la sangre con el fin de obtener distintos tipos de fracciones sanguíneas. Los protocolos descritos a continuación se refieren por defecto al diseño experimental del *Objetivo 2* a excepción de los que se indica explícitamente que se utilizaron igualmente en el *Objetivo 1*.

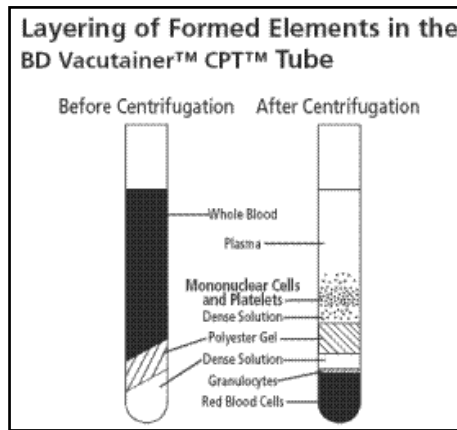
La obtención de muestras de suero se llevó a cabo recogiendo la sangre en un tubo *Vacutainer* sin aditivos. En ese momento dividimos las condiciones de procesamiento con el fin de obtener dos muestras de suero con propiedades y características distintas. Así, una de ellas se dejó coagular durante 10 min a temperatura ambiente (muestra denominada S10m), mientras que la otra permaneció 24 horas a 4°C (muestra denominada S24h). Una vez transcurrido el tiempo oportuno cada muestra fue centrifugada (1500xG, 15 min, 4°C) y se recogió el sobrenadante que fue congelado a -20°C hasta su análisis. El procesamiento para S10m fue utilizado también en la medición de IGF-1 del *Objetivo 1*.

Las muestras de plasma sanguíneo se obtuvieron mediante tubos *Vacutainer* con EDTA. Una vez lleno cada tubo fue agitado para asegurar la mezcla y depositado en hielo hasta su centrifugación (1500xG, 15 min, 4°C). Se recogió el sobrenadante y la mitad del volumen fue congelado a -20°C dando lugar a la muestra de plasma total (TP por sus siglas en inglés, *total plasma*). La otra mitad fue inmediatamente centrifugada de nuevo (10000xG, 10 min, 4°C) para asegurar la precipitación de las plaquetas. Al terminar se aspiró el sobrenadante y se congeló siendo esta la muestra de plasma sin plaquetas (PFP por sus siglas en inglés, *platelets-free plasma*) hasta su análisis (Rasmussen *et al.* 2009). El protocolo para la obtención de PFP fue utilizado también para el análisis de BDNF del *Objetivo 1*.

Las muestras de sangre total lisada (WB por sus siglas en inglés, *whole blood*) fueron obtenidas en tubos *Vacutainer* con EDTA. Una vez lleno cada tubo fue

agitado para asegurar la mezcla e inmediatamente congelado a -20°C . Tras varios días cada muestra fue descongelada a 4°C durante 1.5 horas y se le añadió Triton X-100 (9:1 v/v). Se dejó incubar durante 1.5 horas a 4°C . A continuación las muestras fueron sonicadas y centrifugadas ($12000\times\text{G}$, 10 min, 4°C). El sobrenadante fue aspirado y congelado a -20°C hasta su análisis (Trajkovska *et al.* 2007).

Por último, en el *Objetivo 1* se aislaron las PBMCs de sangre periférica. Para ello la sangre fue recogida en tubos con heparina sódica y *Ficoll* (BD Vacutainer CPT). Después los tubos fueron centrifugados en una centrifuga con rotor horizontal ($1800\times\text{G}$, 45 min, temperatura ambiente). Tras la centrifugación se mantuvo el tubo vertical sobre un fondo blanco para identificar las tres fases: arriba plasma, anillo turbio intermedio con células mononucleares y abajo el gel y los eritrocitos (**Figura III.13**). Se pipeteó con cuidado a la altura del anillo de células mononucleares atravesando el plasma y se transfirió a un tubo *Corning* de 15 mL. A continuación se realizaron dos lavados de la muestra añadiendo PBS hasta completar los 15 mL. Se mezcló y se centrifugó ($100\times\text{G}$, 15 min, temperatura ambiente) retirando el sobrenadante. El pellet remanente se lavó de nuevo siguiendo el mismo protocolo. Después se realizaron 3 lavados adicionales a mayor velocidad de centrifugación ($300\times\text{G}$, 15 min, temperatura ambiente). El pellet final de PBMCs fue congelado a -80°C hasta su posterior procesamiento. Éste consistió en resuspender la muestra con 500 μL de tampón de lisis (Hepes 20 mM pH 7.4; NaCl 100 mM; TritonX100 1%; NaF 50 mM; β -glicerofosfato 10 mM; PMSF 1 mM; ortovanadato sódico 1 mM; cocktail de inhibidor de proteasas) dejándolo incubar durante 15 min en hielo. Posteriormente se vortexó la muestra, se sonicó (Amplitud 38%, 10 pulsos) y centrifugó ($13000\times\text{G}$, 10 min, 4°C). El sobrenadante fue recogido y congelado a -80°C hasta su procesamiento final para Western blotting.

Figura III.13. Distribución del anillo de PBMCs en el tubo con *Ficoll*.

2.6.2. Procesamiento de la sangre murina.

La sangre fue recogida con una jeringa durante la disección de los animales. Parte de esta sangre (300 μL) fue depositada en un tubo heparinizado que posteriormente fue centrifugado (1500xG, 15 min, temperatura ambiente). El sobrenadante fue recogido en una alícuota e inmediatamente congelado a -20°C . Se obtuvo 40 μL de sangre del tubo heparinizado que se mezcló en un tubo que contenía 40 μL de ácido perclórico al 12%, BPDS 2 mM y fue conservado en hielo. Seguidamente fue centrifugado (1500xG, 15 min, 4°C). El sobrenadante se congeló a -20°C para la posterior medición de GSH. Otros 40 μL de sangre se pipetearon del tubo heparinizado que se mezcló con 40 μL de ácido perclórico al 12%, BPDS 2 mM, NEM 40 mM y se conservó en hielo. Seguidamente fue centrifugado (1500xG, 15 min, 4°C) y se congeló el sobrenadante a -20°C para la posterior medición de GSSG. El resto de la sangre fue recogida en un tubo con EDTA que centrifugado (1500xG, 15 min, temperatura ambiente) para separar el plasma de los elementos formes. El sobrenadante fue alicuotado y congelado a -20°C para la medición por HPLC de MDA.

2.6.3. Extracción de proteínas a partir del tejido cerebral.

La extracción de proteínas desde el tejido es un paso imprescindible para su posterior análisis por técnicas de inmunodetección. En apartados anteriores se detalló bajo qué condiciones se obtuvieron los órganos y tejidos de los ratones y ratas empleados en los diseños experimentales de los *Objetivos 3,4 y 5*. En este punto se describe el procedimiento por el cual el tejido congelado a -80°C es procesado hasta una muestra con la cual poder trabajar, fundamentalmente mediante las técnicas de Western blotting y ELISA.

2.6.3.1. Procedimiento.

Se dispuso el tejido a procesar (corteza cerebral o hipocampo) sobre un mortero previamente introducido en una balsa de nitrógeno líquido con el fin de manipular las muestras sin que se descongelaran. Con unas pinzas y un bisturí (limpiados entre cada muestra) se cortó el tejido en partes más pequeñas.

Una vez tarado el tubo Eppendorf se introducía en él una parte del tejido (40-100 mg) añadiendo seguidamente el tampón correspondiente. A continuación se describen los protocolos y los tampones de lisis en los que se procesaron las muestras para cada técnica utilizada según el analito medido:

► Protocolo de extracción de proteínas para las muestras analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y posterior Western blotting:

- Se preparó el tampón de lisis (Tris-SDS-Glicerol):
 - Tris 76.5 mM en 83 mL H₂O Milli-Q; pH=7.4.
 - Añadir 2.41% SDS (2 g).

- Añadir 12% glicerol (10 mL).
 - Ortovanadato sódico (200 mM) activo, 10 μ L por 1 mL tampón Tris-SDS-Glicerol.
 - Cocktail inhibidor de proteasas, 10 μ L por 1 mL tampón Tris-SDS-Glicerol.
- Al tubo Eppendorf con la muestra se añadió el tampón de lisis en una proporción de 100 mg de tejido por 1 mL del tampón.
 - Se realizó el homogeneizado mecánico mediante el sistema rotatorio RW 20 DZM (Janke & Kunkel) con adaptador para tubos Eppendorf.
 - Tras dejar incubando al menos 15 min en hielo se sonicó (Amplitud 28%, 5 impulsos).
 - Se centrifugó (1500xG, 5 min, 4°C) y se recogió el sobrenadante que fue congelado a -80°C hasta su procesamiento específico para la medición de proteínas y Western blotting.

► Protocolo de extracción de proteínas para las muestras analizadas mediante Oxyblot (proteínas carboniladas):

- Se preparó el tampón Kpi 0.05 M / EDTA 0.1 mM:
 - Solución A: 680.45 mg KH_2PO_4 + 3.7 mg EDTA + 100 mL H_2O Milli-Q.
 - Solución B: 870.9 mg K_2HPO_4 + 3.7 mg EDTA + 100 mL H_2O Milli-Q.
 - Con 70 mL Solución B ajustar pH=7.4 mediante la adición de Solución A.

- Sacarosa 0.5 M.
- DTT 50 mM.
- Ortovanadato sódico (200 mM) activo, 5 μ L por 1 mL de tampón.
- Al tubo Eppendorf con la muestra se añadió el tampón de lisis en una proporción de 100 mg de tejido por 1 mL del tampón.
- Se realizó el homogeneizado mecánico mediante el sistema rotatorio RW 20 DZM (Janke & Kunkel) con adaptador para tubos Eppendorf.
- Tras dejar incubando al menos 15 min en hielo se sonicó (Amplitud 28%, 5 impulsos).
- Se centrifugó (15000xG, 30 min, 4°C) y se recogió el sobrenadante que fue congelado a -80°C hasta su procesamiento específico para la medición de proteínas y *Oxyblot*.

► Tampón de lisis para las muestras analizadas por ELISA de BDNF:

- Se preparó el tampón de lisis según indicaciones del kit:
 - Tris/HCl 100 mM, pH=7.0.
 - BSA 2%.
 - NaCl 1 M.
 - EDTA sódico 4 mM.
 - Triton X100 2%.
 - Cocktail inhibidor de proteasas, 5 μ L por 1 mL tampón.
- Al tubo Eppendorf con la muestra se añadió el tampón de lisis en una proporción 100 mg de tejido por 1 mL del tampón.

- Se realizó el homogeneizado mecánico mediante el sistema rotatorio RW 20 DZM (Janke & Kunkel) con adaptador para tubos Eppendorf.
 - Se centrifugó (14000xG, 30 min, 4°C) y se recogió el sobrenadante que fue congelado a -80°C hasta su procesamiento específico para la medición de proteínas y ELISA.
- Tampón de lisis para las muestras analizadas por ELISA de β -amiloide:
- Se preparó el tampón A:
 - Guanidina HCl 5 M.
 - Tris/HCl 50 mM, pH=8.0.
 - Se preparó el tampón B con base DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*):
 - BSA 5%.
 - Tween-20 0.03%.
 - Cocktail inhibidor de proteasas.
 - Al tubo Eppendorf con la muestra se añadió el tampón de lisis en una proporción 8x respecto al peso.
 - Se realizó el homogeneizado mecánico mediante el sistema rotatorio RW 20 DZM (Janke & Kunkel) con adaptador para tubos Eppendorf.
 - Se mezcló el homogeneizado durante 3 horas a temperatura ambiente.
 - Posteriormente se diluyó y resuspendió repetidamente con el tampón B en una proporción de 1:20.
 - Se centrifugó (16000xG, 20 min, 4°C) eliminando el sobrenadante.

- El pellet se congeló a -80°C hasta su análisis por ELISA.

2.6.3.2. Cálculos.

Los valores de concentración de proteínas en las muestras fueron obtenidos mediante los métodos descritos por Lowry (Lowry *et al.* 1951) y por Bradford (Bradford 1976) tal como se describe a continuación.

2.6.4. Cuantificación de la concentración de proteínas por el método Lowry.

2.6.4.1. Fundamento.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en la propiedad de las proteínas para absorber luz en el espectro ultravioleta visible, la formación de derivados químicos, o la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes.

Lambert y Beer demostraron que la absorbancia (A) de una sustancia es directamente proporcional a la concentración (c) de la sustancia absorbente, la longitud del paso de luz (l) (espesor de la solución) y una constante denominada coeficiente de extinción o coeficiente de absorción (ϵ), que es característico para cada sustancia a una longitud de onda (λ) determinada.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

El método espectrofotométrico se basa en la comparación de la absorbancia de una sustancia de concentración desconocida con la de una solución de la misma sustancia cuya concentración se conoce (patrón o estándar). Se obtiene la curva de calibrado midiendo la absorbancia del patrón tratado con un mismo método y medidas a igual longitud de onda en el mismo instrumento. El resultado se expresa en una gráfica de la absorbancia (A) en función de la concentración (c). Si el

sistema sigue la ley de Lambert-Beer se obtiene una línea recta que pasa cerca del origen. Así es posible determinar gráficamente la concentración de una muestra desconocida dibujando la absorbancia frente a concentraciones conocidas de un patrón interno, normalmente albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés, *bovine serum albumin*). Se escoge la parte lineal y se calcula la recta de regresión lineal que mejor se ajusta y de ésta se interpolan los datos de absorción de nuestras muestras.

Para la cuantificación de la concentración de proteínas de la presente tesis utilizamos método de Lowry utilizando el reactivo "Lowry Reagent, Powder" (Sigma-Aldrich Química) (Lowry *et al.* 1951). Su proceso químico consta de dos etapas. En primer lugar los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína muestran un característico color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. En segundo lugar la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

2.6.4.2. Reactivos.

- Reactivo Lowry:
 - Añadir 40 mL de agua a la botella de reactivo *Lowry reagent powder*.

- Mezclar hasta disolver por completo cubierto de la luz.
- Guardar a temperatura ambiente.
- Reactivo Folin-Ciocalteu:
 - 88 mL de agua + 18 mL de la solución *Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent* en una botella con opacidad topacio.
 - Guardar a temperatura ambiente.
- BSA diluido en el mismo tampón donde se encuentran las muestras homogeneizadas y formando un patrón de diluciones seriadas de concentración conocida.

2.6.4.3. Procedimiento.

1. Se preparó una recta patrón seriada de diluciones de BSA que se procesó en las mismas condiciones que las muestras.
2. Se pipeteó 490 μL de agua Milli-Q y 10 μL de cada muestra o patrón en un tubo Eppendorf.
3. Se añadió 500 μL del reactivo de Lowry y se incubó 20 min en oscuridad.
4. Se añadió 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se incubó 30 min en oscuridad.
5. Se midió la absorbancia a 660 nm.

2.6.4.4. Cálculos.

Los resultados se calcularon restando a todos los valores de absorbancia el valor de la muestra “blanco” (sin BSA, sólo tampón y reactivos) e interpolando la

absorbancia de las muestras a la de la recta patrón construida a partir de concentraciones conocidas de proteína.

2.6.5. Cuantificación de la concentración de proteínas por el método Bradford.

2.6.5.1. Fundamento.

El fundamento del método Bradford está basado en el método espectrofotométrico de Lambert-Beer al igual que el descrito para el método Lowry. En este caso utilizamos *Bradford Reagent* (BioRad) basado en el cambio de la absorbancia del colorante azul de Coomassie el cual en condiciones ácidas se une a las proteínas convirtiéndose de color rojo a azul. En la formación de este complejo dos interacciones ocurren. En primer lugar, la forma roja del colorante dona su electrón libre a los grupos ionizables de la proteína lo que causa una ruptura del estado nativo de la proteína exponiendo en consecuencia sus regiones hidrofóbicas. Estas regiones en la estructura terciaria de la proteína se unen no covalentemente a la región no polar del colorante posicionando los grupos amino positivos próximos a la carga negativa del colorante. La unión de la proteína estabiliza la forma azul del colorante. Por tanto la cantidad del complejo presente en la muestra es una medida de la concentración de la proteína y puede ser medida a través de la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Utilizamos el método Bradford para determinación de proteínas en los casos en los que apenas se disponía de muestra puesto que el protocolo de esta técnica requiere 2 μL en vez de los 10 μL del método Lowry; siempre que fuera compatible con los reactivos del tampón.

2.6.5.2. Reactivos.

- BSA diluido en el mismo tampón donde se encuentran las muestras homogeneizadas y formando un patrón de diluciones seriadas de concentración conocida.
- Reactivo *Bradford Reagent* (BioRad).

2.6.5.3. Procedimiento.

1. Se preparó una recta patrón de BSA que se procesó en las mismas condiciones que las muestras.
2. Se preparó dilución 1/5 de reactivo Bradford con agua Milli-Q + 2 μ L de cada muestra o patrón.
5. Se midió la absorbancia a 595 nm.

2.6.5.4. Cálculos.

Los resultados se calcularon restando a todos los valores de absorbancia el valor de la muestra “blanco” (sin BSA, sólo tampón y reactivos) e interpolando la absorbancia de las muestras a la de la recta patrón construida a partir de concentraciones conocidas de proteína.

2.6.6. Aislamiento del ARN a partir del tejido cerebral.

2.6.6.1. Fundamento.

La expresión de ARN de las enzimas antioxidantes del *Objetivo 4* fue determinada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*). Para ello, lo primero fue aislar el ARN a partir del

tejido cerebral de los ratones mediante el reactivo *Trizol* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del protocolo descrito por el fabricante y basado en una adaptación del método (Chomczynski & Sacchi 1987). Este método está basado en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica).

2.6.6.2. Reactivos.

- Tampón de extracción.
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Etanol 70%.
- Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) 0.01% (v/v).

2.6.6.3. Procedimiento.

Homogeneizado:

1. Se cortó una porción del tejido hipocámpal y se embebió en *Trizol* (siguiendo una proporción de 60 mg de tejido por 1 mL de *Trizol*) dentro de un tubo Eppendorf libre de ARNasas.
2. Se homogeneizó la muestra mediante el sistema mecánico mediante rotatorio RW 20 DZM (Janke & Kunkel) con adaptador para tubos Eppendorf.

Separación de fases:

3. Se dejó incubar las muestras a temperatura ambiente durante 5 min.

4. Se añadió cloroformo siguiendo una proporción de 200 μ L de cloroformo por 1 mL de *Trizol* y se agitó vigorosamente durante 15 segundos.

5. Se incubó durante 3 min a temperatura ambiente.

6. Se centrifugó (12000xG, 10 min, 4°C) obteniendo dos fases: Abajo el cloroformo-fenol (rojo) y arriba la fase acuosa con el ARN y 60% del *Trizol* usado.

Precipitación del ARN:

7. Se recogió la fase acuosa (superior) y se llevó a un tubo Eppendorf estéril.

8. Se añadió 500 μ L de isopropil alcohol para precipitar el ARN.

9. Se agitó y se dejó incubar durante 10 min a temperatura ambiente.

10. Se centrifugó (12000xG, 10 min, 4°C) y se retiró el sobrenadante.

Lavado del ARN:

11. Se descartó el alcohol y el precipitado restante se lavó con etanol 75% (proporción 1 mL de etanol 75% por cada 1 mL de *Trizol*).

12. Se vorteoó para mezclar y se centrifugó (7500xG, 5 min, 4°C).

Redisolución del ARN:

13. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet.

14. Se disolvió el ARN en 50 μ L de agua DEPC.

15. Se vorteoó y calentó a 65°C durante 10 min.

16. Se hicieron alícuotas que fueron congeladas a -80°C hasta ser procesadas realizando la correspondiente retrotranscripción y amplificación del ARN (procedimientos ampliados en los apartados 2.7.13. y 2.7.14.).

2.6.6.4. Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN.

La cuantificación de la concentración de ARN se realizó mediante una medida espectrofotométrica a 260 nm con el sistema *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific). Este dispositivo es un espectrofotómetro de amplio espectro (220-270 nm) que analiza muestras de 1 μL con alta precisión y reproducibilidad mediante métodos de tensión superficial. La comprobación de la pureza fue llevada a cabo mediante la relación de las medidas a 260/280 nm. Así, valores comprendidos entre 1.8 y 2.0 indicaron una calidad aceptable del ARN.

2.7. Determinaciones bioquímicas en sangre y tejidos humanos y murinos.

2.7.1. Determinaciones hematológicas automatizadas.

En los sujetos del *Objetivo 1* y *2* se realizó la medición de distintos parámetros hematológicos de manera automatizada en el Servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica del Hospital Clínico de Valencia a través del sistema *Sysmex XE-2100* de acuerdo con los procedimientos descritos por el fabricante (Roche Diagnostics S.L, Barcelona, España) (**Tabla III.2**).

Tabla III.2. Parámetros hematológicos analizados de forma automatizada en humanos

Objetivo 1 <i>(niveles basales)</i>	Objetivo 2 <i>(pre- y post-ejercicio)</i>
Hemoglobina	Hemoglobina
Colesterol total	Hematocrito
Colesterol lipoproteína de alta densidad (HDL)	Plaquetas
Colesterol lipoproteína de alta densidad (LDL)	Eritrocitos
Triglicéridos	Leucocitos

Glucemia en ayunas	Linfocitos
Hierro	Monocitos
	Basófilos
	Eosinófilos

2.7.2. Cálculo de la hemoconcentración.

El cálculo de la concentración del volumen sanguíneo se realizó en el diseño experimental del *Objetivo 2*.

El ejercicio físico agudo produce hemoconcentración debido a la sudoración y la exhalación más intensa fundamentalmente. Esta pérdida de líquido lleva a incrementar la concentración de solutos en sangre de manera sesgada (ya que no incrementan los solutos sino que disminuye el volumen). Es por ello que si un estudio analiza los niveles de cierto parámetro en sangre, no es necesario corregir por esta hemoconcentración ya que los valores absolutos reflejan la concentración real. Sin embargo, en aquellos estudios en los que se estudia si cierto parámetro sanguíneo proviene de otra fuente (en este caso el BDNF del cerebro u otros tejidos), es preciso tener en cuenta y corregir por la pérdida de líquido sanguíneo ya que de otra forma se mostrarían elevados los niveles de ese parámetro aun cuando no hubiera incrementado.

2.7.2.1. Procedimiento.

Se midieron los niveles de hemoglobina y hematocrito antes y después del protocolo de ejercicio agudo en cicloergómetro por el método descrito en apartados anteriores.

2.7.2.2. Cálculos.

Con el fin de calcular el porcentaje de hemoconcentración ocurrido en la muestra post-ejercicio (B) frente a la basal (A), se siguieron las ecuaciones descritas por Dill y Costill. Según éstas se pueden calcular tanto los cambios en el volumen sanguíneo (VS), los cambios en el volumen eritrocitario (VE) así como los cambios en el volumen plasmático (VP) (Dill & Costill 1974). Así:

$$VS_B = VS_A (Hb_A / Hb_B)$$

$$VE_B = VS_B (Hc_B)$$

$$VP_B = VS_B - VE_B$$

De esta forma, el cambio porcentual de volumen se calcula mediante:

$$\Delta VS\% = 100 (VS_B - VS_A) / VS_B$$

$$\Delta VP\% = 100 (VP_B - VP_A) / VP_B$$

A continuación corregimos las concentraciones de BDNF analizadas en distintos tipos de muestra sanguínea. Así, la sangre total fue relativizada por $\Delta VS\%$ mientras que las muestras de suero y plasma fueron corregidas por $\Delta VP\%$. Los cálculos realizados fueron:

$$\Delta[\text{BDNF}] (\text{sangre total}) = [\text{BDNF}]_{\text{Post}} \times (1 - (\Delta VS / 100))$$

$$\Delta[\text{BDNF}] (\text{sueros y plasmas}) = [\text{BDNF}]_{\text{Post}} \times (1 - (\Delta VP / 100))$$

2.7.3. Determinación de lactato en humanos.

El lactato se midió en los participantes del *Objetivo 2* para evaluar el nivel de intensidad metabólica producido por el ejercicio físico agudo al que fueron sometidos.

La medición del lactato sanguíneo es una de las pruebas indirectas más utilizadas para evaluar la intensidad metabólica ante un ejercicio físico agudo. Al ser un

producto del metabolismo anaeróbico de la glucosa, estima el tipo de requerimientos energéticos utilizados. Por ello, en un ejercicio como el implementado donde el sujeto alcanzó el agotamiento, se espera que el valor de lactato alcance niveles altos. Por versatilidad y fácil manejo se utilizó un medidor portátil de lactato (LactatePro) con tiras reactivas de la misma marca y específicas para este metabolito.

2.7.3.1. Procedimiento.

Se limpió la superficie de la yema del dedo con alcohol 70%. Se secó y con una lanceta automática se realizó una punción. Se colocó la tira reactiva en el lactatómetro. Tras desechar la primera gota de sangre se comprimió el dedo recogiendo la siguiente gota con la tira reactiva. Esta tira está diseñada para dejar un pequeño hueco que por capilaridad introducirá la sangre necesaria para realizar el análisis. Tras unos segundos el valor de lactato es mostrado en la pantalla (**Figura III.14**). Se tomaron muestras en diferentes momentos (Basal, tras el calentamiento, cada 5 min durante el ejercicio, al terminar éste y a los 30 y 60 min de recuperación).

Figura III.14. Lactatómetro LactatePro.



2.7.4. Estudio de la glucemia y la colesterolemia en ratones.

Evaluamos la glucemia basal y la colesterolemia de los ratones del *Objetivo 3* en distintos puntos del periodo de entrenamiento.

Las mediciones de la glucemia basal se realizaron con un glucómetro portátil (Accu-Chek, Aviva) con tiras reactivas de glucosa (Bayer, Ascensia Elite). La colesterolemia fue analizada con un coleserómetro portátil (Roche, Accutrend GC) con tiras reactivas de colesterol (Accutrend Cholesterol).

2.7.4.1. Procedimiento.

Las mediciones fueron realizadas en todos los ratones en la semana 0 (antes de comenzar el periodo de entrenamiento), 2, 4, 7 y 10. Con el fin de que la glucemia fuera basal, ambas medidas fueron realizadas tras un ayuno de 4 horas. Se aprovechó el procedimiento (punción, ayunas, etc.) para analizar ambos parámetros

En el momento de la medición se limpió con alcohol 70% la pata del ratón y mediante fricción con la caperuza de la aguja se localizó la vena safena. A continuación se realizó una punción con una aguja (27G) y, tras desechar la primera gota de sangre, se introdujo el resto en las tiras reactivas para glucemia y colesterolemia. Al acabar se presionó suavemente la punción con una gasa impregnada en alcohol 70%.

2.7.5. Determinación de IGF-1 por ensayo inmunométrico quimioluminiscente marcado con enzima.

2.7.5.1. Fundamento.

El ensayo inmunométrico quimioluminiscente marcado con enzima en fase sólida se realizó con el sistema automatizado *Immulite 1000 IGF-1 assay* (Siemens;

Diagnostic Products, California, EEUU). El soporte del test es pre-incubado con anticuerpo murino monoclonal anti-IGF-1, fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpo policlonal de conejo anti-IGF-1 en el tampón y sustrato quimioluminiscente (éster fosfato de dioxetano de adamantilo en un tampón de AMP con potenciador) (**Figura III.15**).

La determinación de IGF-1 mediante esta técnica se llevo a cabo para el *Objetivo 1* y se realizó en el Servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica del Hospital Clínico de Valencia a través del Servicio de Pediatría.

Figura III.15. Immulite 1000 IGF-1 de Siemens.



2.7.5.2. Procedimiento.

Se utilizaron 20 μL de suero sanguíneo previamente congelado a -20°C . Tras una dilución automatizada de 1/10 el personal operador especializado del aparataje siguió las instrucciones descritas por el instrumento para la determinación del IGF-1.

2.7.5.3. Cálculos.

Los valores de concentración fueron obtenidos en $\mu\text{g/mL}$.

2.7.6. Determinación de BDNF por ELISA.

2.7.6.1. Fundamento.

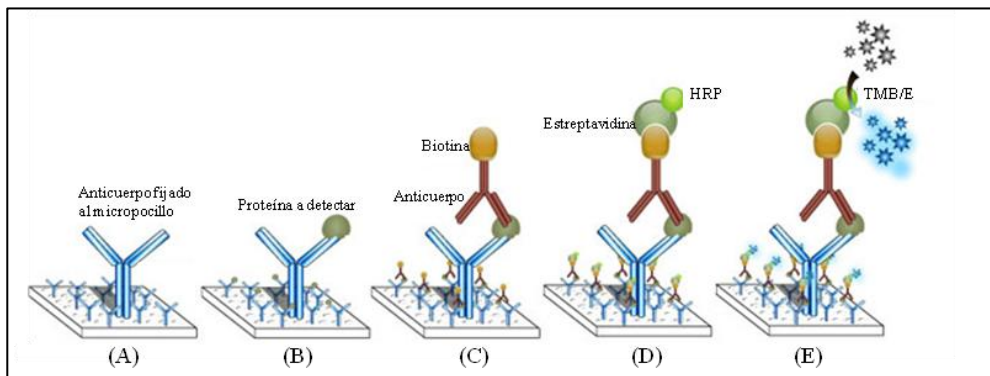
La determinación de BDNF por ELISA fue llevada a cabo en todos los diseños experimentales de la presente tesis. Así, en la muestra humana fue medido en sangre periférica mientras que en la muestra de roedores fue medido en tejido cerebral.

La técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*) y más concretamente su formato de tipo sándwich, modalidad de ELISA empleado en la presente tesis, se basa en técnicas de inmunodetección y reacción entre enzimas. Siguiendo la **Figura III.16** se puede observar los distintos pasos del método ELISA. Así, el kit provee una placa pre-incubada con el anticuerpo específico que reconocerá como antígeno la proteína diana que queremos medir (BDNF en este caso) (A). Posteriormente, tras incubar la muestra con las condiciones adecuadas, la proteína diana queda unida a su anticuerpo específico y tras lavar el pocillo la unión anticuerpo-antígeno es lo única que permanece (B). A continuación el pocillo es incubado con un anticuerpo biotinilado que reconoce de nuevo la proteína diana de forma específica (anti-BDNF en este caso). En este paso las uniones que quedan son de anticuerpo-antígeno-anticuerpo (C). Seguidamente se incuba con estreptavidina, proteína con elevada afinidad por la biotina, que está conjugada con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés, *horseradish peroxidase*) (D). Por último, al incubar cada pocillo con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, por sus siglas en inglés, *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*) la enzima HRP es excitada y el color de la solución cambia (E) de manera correlacionada con la cantidad de uniones antígeno-anticuerpo y por ende con la concentración de la proteína diana a medir. Este cambio de color es medido espectrofotométricamente e interpolado a una recta patrón de absorbancia-

concentración de la misma proteína diana en cuestión (el fundamento de esta técnica se explicó previamente).

El kit ELISA que se empleó fue “ChemiKine™ Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA Kit” (Ref. CYT306. Chemicon International. Millipore, Germany).

Figura III.16. Fases del ELISA para BDNF.



2.7.6.2. Reactivos.

Todos los reactivos que se muestran a continuación vienen incluidos en el kit ELISA utilizado (Ref. CYT306. Chemicon International. Millipore, Germany).

- Placa 96 pocillos pre-incubada con anticuerpo policlonal de conejo anti-BDNF humano.
- Tampón de lavado.
- Diluyente.
- BDNF para el patrón.
- Anticuerpo monoclonal biotinilado anti-BDNF humano de ratón.

- Estreptavidina conjugada con HRP.
- TMB.
- Solución de HCl.

2.7.6.3. Procedimiento.

El protocolo que se siguió para la realización del ELISA fue el descrito por el fabricante:

1. Se realizaron las diluciones de las muestras añadiendo el tampón diluyente incluido en el kit (Dilución 1/10 en plasma sanguíneo humano; 1/100 en sangre total y suero sanguíneo humano; y 1/20 en tejido cerebral previamente homogeneizado con el tampón específico).
2. Se hizo la recta patrón de BDNF. Se reconstituyó el BDNF liofilizado con 1.5 mL de tampón diluyente (10000 pg/mL). A continuación se hicieron diluciones seriadas tal como muestra la **Tabla III.3** manteniéndolas en hielo.

Tabla III.3. Diluciones del patrón de BDNF para el ELISA.

Número de muestra	Volumen inicial de diluyente	Volumen añadido del tubo anterior	Concentración
1	950 µL	50 µL (del original)	500 pg/mL
2	500 µL	500 µL	250 pg/mL
3	500 µL	500 µL	125 pg/mL
4	500 µL	500 µL	62.5 pg/mL
5	500 µL	500 µL	31.3 pg/mL
6	500 µL	500 µL	15.6 pg/mL
7	500 µL	500 µL	7.8 pg/mL

8	500 μL	0.0 pg/mL
---	-------------------	-----------

3. Se añadió en los pocillos 100 μL de muestras o de patrón. Todas fueron analizadas por duplicado.
4. Se selló la placa y se incubó a 4°C en agitación lenta durante 20 horas aproximadamente (hasta el día siguiente).
5. Al día siguiente la placa fue lavada 4 veces mediante el sistema automatizado de lavado de placas *HydroFlex* (Tecan) con 250 μL de tampón de lavado (previamente diluido 1/10 con agua Milli-Q). En el último lavado la placa se dejó sin líquido.
6. Se añadió 100 μL del anticuerpo anti-BDNF biotilado (previamente diluido 1/1000 con el diluyente incluido) en cada pocillo.
7. Se cubrió la placa con un sellador y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 3 horas.
8. Se añadió 100 μL de la solución estreptavidina-HRP (previamente diluida 1/1000 con el diluyente incluido) a cada pocillo.
9. Se selló nuevamente y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación.
10. Se realizaron 4 lavados adicionales.
11. Se añadió 100 μL de TMB a cada pocillo.
12. Se dejó incubar durante 15 minutos cubierto de la luz.
13. Se añadió 100 μL de la solución de HCl (frena la reacción).
14. Se midió en el espectrofotómetro a 450 nm.

2.7.6.4. Cálculos.

Los cálculos se realizaron, al igual que en la determinación de proteínas, restando a todos los valores de absorbancia el valor de la muestra número “0” de la recta patrón e interpolando la absorbancia de las muestras a la de la recta patrón de diluciones seriadas y concentración conocida de BDNF.

2.7.7. Determinación de β -amiloide (1-40) y (1-42) por ELISA.

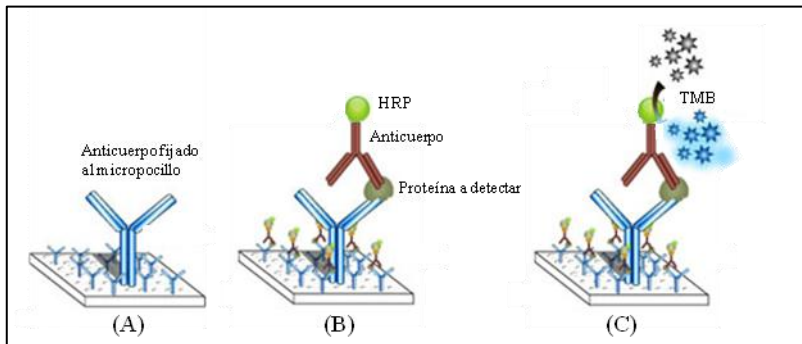
2.7.7.1. Fundamento.

El estudio de los niveles de β A (1-42) se llevó a cabo en el tejido cerebral de los ratones del *Objetivo 3* y *Objetivo 4* (2xTg, 3xTg y sus respectivos controles). El β A (1-40) soluble se analizó en los ratones del *Objetivo 4* (3xTg y sus controles).

Aunque el ELISA que se empleó en los dos casos (β A (1-42) y (1-40)) fue en su modalidad *sandwich* como el descrito anteriormente (ELISA BDNF), el fundamento de éstos varía sutilmente acortándose el proceso. Así, siguiendo la **Figura III.17**, un anticuerpo monoclonal específico para la región terminal NH₂ del β A humano está pre-incubado y fijado en cada pocillo de la placa (A). En este caso se añade la muestra a analizar (y diluciones seriadas del patrón) y seguidamente el anticuerpo de conejo específico para la secuencia COOH terminal del β A (1-42) marcado con HRP directamente dejándose incubar. Después, tras unos lavados para eliminar la enzima sobrante queda tan sólo la unión anticuerpo-antígeno-anticuerpo-HRP (B). Finalmente se añade el substrato TMB que producirá un cambio de color en HRP (C) de manera correlacionada con la concentración de la proteína diana a medir. Este cambio de color es medido espectrofotométricamente e interpolado a una recta patrón de absorbancia-concentración de la misma proteína diana en cuestión.

Los kits ELISA que se utilizaron fueron el *Human A β 2* y *Human A β 40* (KHB3442 and KHB3481, respectivamente, Invitrogen, Camarillo, CA).

Figura III.17. Fases del ELISA para β A.



2.7.7.2. Procedimiento.

El protocolo que se siguió para la realización de los ELISAs fue el descrito por el fabricante, siendo coincidente en ambos casos:

1. Se realizaron las diluciones de las muestras añadiendo el tampón diluyente incluido en el kit (previamente preparado) con una dilución 1/10 con el tejido cerebral previamente homogeneizado con el tampón específico.
2. Se hizo la recta patrón de β A (según ELISA, 1-42 y 1-40). Se reconstituyó la proteína liofilizada para dejarlo a una concentración de 1.0 μ g/mL. A continuación se hicieron diluciones seriadas tal como muestra la **Tabla III.4** y se mantuvieron en hielo.

Tabla III.4. Diluciones del patrón de β A (1-42 y 1-40) para el ELISA.

Número de muestra	Concentración final de β A (1-42 y 1-40)
1	500 pg/mL
2	250 pg/mL
3	125 pg/mL
4	62.5 pg/mL
5	31.3 pg/mL
6	15.6 pg/mL
7	7.8 pg/mL
8	0.0 pg/mL

3. Se añadió en los pocillos 50 μ L de muestras o de patrón. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

4. Seguidamente se añadió 50 μ L del anticuerpo anti- β A marcado con la enzima HRP.

5. Se selló la placa y se incubó a temperatura ambiente en agitación lenta durante 3 horas.

6. La placa fue lavada 4 veces mediante el sistema automatizado de lavado de placas *HydroFlex* (Tecan) con 400 μ L de tampón de lavado (previamente diluido 1/25 con agua Milli-Q). En el último lavado la placa se dejó sin líquido.

6. Se añadió 100 μ L de la solución TMB en cada pocillo.

7. Se cubrió la placa con un sellador y se incubó a temperatura ambiente con agitación lenta durante 30 minutos en oscuridad.

8. Se añadió 100 μ L de la solución de HCl (frena la reacción).

9. Se midió en el espectrofotómetro a 450 nm.

2.7.7.3. Cálculos.

Los cálculos se realizaron, al igual que en la determinación de proteínas, restando a todos los valores de absorbancia el valor de la muestra número “0” de la recta patrón e interpolando la absorbancia de las muestras a la de la recta patrón de diluciones seriadas y concentración conocida de β A correspondiente.

2.7.8. Determinación de los niveles de malondialdehído por HPLC.

2.7.8.1. Fundamento.

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés, *high performance liquid chromatography*) es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases: la fase móvil y la fase estacionaria. La separación se obtiene porque los componentes de la mezcla a estudiar son retenidos de distinta manera por la fase estacionaria. La cromatografía líquida se basa en el hecho de que la fase móvil arrastra las moléculas de la muestra hacia el lecho estacionario y durante el trayecto las distintas moléculas de la muestra son retardadas en mayor o menor grado por la fase estacionaria en función de la interacción entre los componentes de la muestra y las fases estacionaria y móvil. Así, si no existiera interacción, las moléculas de un soluto se desplazarían a lo largo de la columna a la misma velocidad que la fase móvil y por lo tanto el tiempo de retención sería bajo, sin embargo, un soluto que interaccione con la fase estacionaria tardará más en salir del lecho estacionario y su tiempo de retención será muy superior al de la fase móvil.

Se ha seguido el método descrito por Wong *et al.* basado en la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes en la muestra y posterior formación de un aducto entre el

ácido 2-tiobarbitúrico (TBA por sus siglas en inglés, *thiobarbituric acid*) y el malondialdehído liberado (TBA-MDA₂) (Wong *et al.* 1987).

Puesto que el ácido TBA reacciona con distintos grupos carbonilos presentes en la muestra, además de con el MDA proveniente de los lipoperóxidos, se realiza la separación por HPLC en fase reversa del aducto TBA-MDA del resto de las sustancias reaccionantes presentes en las muestras.

2.7.8.2. Preparación de los reactivos.

- Tampón acetato sódico anhidro 2 M, pH=3.5, con TBA 0.2%: Para preparar 1 L se tomaron 119 mL de ácido acético glacial (pureza 98%) y se le añadieron 600 mL de agua Milli-Q. Se ajustó el pH=3.5 con hidróxido de sodio (NaOH) 10 M. A continuación, se añadió 2 g de ácido tiobarbitúrico a la solución y se mantuvo en agitación a 50-60°C hasta la total disolución del TBA. Finalmente, se aforó el volumen a 1 L y se guardó a 4°C protegido de la luz.

- Tampón KH₂PO₄ 50 mM, pH=6.8: Para preparar 500 mL se pesaron 3.4 g de KH₂PO₄ y se añadieron 400 mL de agua destilada. A continuación, se ajustó el pH=6.8 con KOH (1 M) y se aforó con agua destilada hasta alcanzar el volumen final. Posteriormente, se guardó a 4°C.

- Tampón KH₂PO₄ 50 mM, pH 3.5: Para preparar 500 mL se pesaron 3.4 g de KH₂PO₄ y se añadieron 400 mL de agua destilada. Se ajustó el pH=3.5 con HCl (1 M) y se aforó con agua destilada hasta el volumen final. Se guardó a 4°C.

- Patrones: Dado que la identificación y cuantificación del MDA de las muestras analizadas se llevó a cabo a través de una curva patrón:

1. Partiendo de una solución comercial de MDA-bis (Merck) (12.2 M), se preparó a 10 mM diluyendo 410 µL de MDA 12.2 M en 500 mL de agua destilada.

2. Se realizó una recta patrón a través de diluciones seriadas obteniendo las siguientes concentraciones: 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6 y 0.8 nmol/mL aparte del “blanco” que contenía sólo agua destilada.

2.7.8.3. Procedimiento de derivatización.

1. A 500 μ L del tampón inicial (con TBA) se añadió 20 μ L de plasma o de tejido (previamente homogeneizado en un tampón kpi 0.1 M /EDTA 1 mM; pH=7.0) en un tubo Eppendorf.
2. La preparación se incubó durante 60 min a 95⁰C. En este paso se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de moléculas de MDA, que se conjugan con dos moléculas de TBA. Por tanto, lo que se determina es el aducto MDA-TBA₂ como índice de peroxidación lipídica.
3. Manteniéndolas en hielo, se añadió 500 μ L del tampón de KH₂PO₄ (pH=6.8) a cada muestra. Se agitó. En este paso el aducto MDA-TBA₂ es inestable en el rango de pH neutro-básico por lo que debe hacerse con rapidez.
4. Se centrifugó (13000 rpm, 5 min, 4⁰C).
5. A 200 μ L del sobrenadante se añadió 200 μ L del tampón KH₂PO₄ 50 mM, pH=3.5. Se agitó.
6. Se cogió 200 μ L para realizar el análisis por HPLC.

2.7.8.4. Preparación de las fases móviles para HPLC.

Este es un método isocrático y necesitaremos 2 fases diferentes: la “fase de lavado” y la “fase de elución”:

- Fase de lavado (Fase B). Acetonitrilo al 70% en agua Milli-Q.

- Fase de elución (Fase A). KH_2PO_4 50 mM, pH=6.8. La relación es de 83/17 (KH_2PO_4 50 mM (pH 6.8) / acetonitrilo).

2.7.8.5. Condiciones y método cromatográfico.

Las condiciones cromatográficas que se siguieron fueron las siguientes:

- Flujo de las fases: 1.0 mL/min
- Detección en HPLC: detector UV a 532 nm.
- Columna: *C18 Spherisorb* de 15 cm de longitud y 5 μm de partícula.

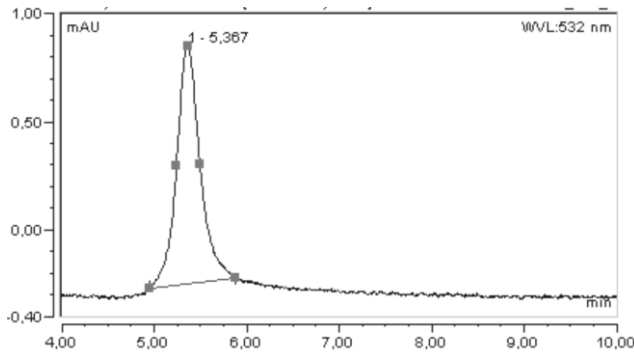
El método cromatográfico duró unos 30 minutos y la secuencia de las fases móviles a través del HPLC es la que se muestra en la **Tabla III.5**.

Tabla III.5. Programación del cromatograma de MDA.

Fase A	Fase B	Fase A
Elución de la muestra	Limpieza de la columna	Preparación de la columna
13 min	9 min	8 min

2.7.8.6. Cálculos.

El área del pico correspondiente al aducto TBA-MDA₂ (**Figura III.18**) se valoró frente a una recta patrón construida con MDA-bis.

Figura III.18. Cromatograma tipo en la medición de MDA por HPLC.

2.7.9. Determinación de los niveles de glutatión total por HPLC.

2.7.9.1. Fundamento.

El glutatión total se determina por HPLC siguiendo el método descrito por Reed *et al.* (Reed *et al.* 1980) basado en la separación de los S-carboximetildinitro derivados por cromatografía y posterior cuantificación a 365 nm. A todas las muestras se les añade una concentración conocida de γ -glutamil glutamato (patrón interno) el cual permite calcular la concentración de la sustancia problema de un modo exacto.

Con esta técnica cromatográfica, se pueden determinar las concentraciones tanto de GSH como de GSSG de una misma muestra. Sin embargo, el método de Reed *et al.* no debe utilizarse para determinar el estatus de glutatión, ya que la muestra sufre una auto-oxidación del GSH en el proceso de derivatización (Asensi *et al.* 1994). De este modo, parte del GSH se oxida a GSSG mostrándose falsos positivos en los resultados. Sin embargo, es un método idóneo para la determinación del glutatión total.

2.7.9.2. Derivatización de la muestra.

Tal como se detalló en el apartado “Procesamiento de la sangre murina”, en el momento del sacrificio se realizó una extracción de sangre en un tubo heparinizado que se mezcló con ácido perclórico al 12%, BPDS 2 mM. Tras centrifugar se consiguió un sobrenadante ácido, libre de proteínas. A partir de este punto:

1. Se pipetearon 40 μL de sobrenadante ácido y se añadió 4 μL de patrón interno (γ -glutamyl-glutamato 1 mM en PCA 0.3%). Seguidamente añadimos 4 μL de ácido iodoacético 1 M disuelto en púrpura de m-cresol 0.2 mM (indicador de pH que vira a color púrpura entre 8.5 y 9).
2. La mezcla se llevó a pH=8.5-9 usando un tampón KOH 3 M CHES 0.3 M y se incubó durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente.
3. Se añadió 400 μL de 1-fluor dinitrobenceno al 1% en etanol absoluto y se mantuvo a 4°C en oscuridad durante 24 horas. Llegado a este punto las muestras son estables a 4°C durante varias semanas.
4. Antes de preparar la dilución que fue inyectada en el cromatógrafo, las muestras se centrifugaron (15000xG, 5 min, 4°C).
5. 50 μL del sobrenadante fueron mezclados con 270 μL de una mezcla metanol - agua en proporción 800:200.

2.7.9.3. Técnica cromatográfica.

Se inyectaron 80 μL de la solución que contiene la muestra. La fase móvil estaba constituida por 2 solventes:

- Eluyente A: Solución de metanol al 80% en agua Milli-Q.
- Eluyente B: Solución tampón acético/acetato 0.5 M en metanol al 64%.

Todo el proceso se realizó a un flujo constante de 1 mL/min. La elusión se realizó aplicando el siguiente gradiente:

- La fase móvil se mantuvo durante 5 min a un 20% del eluyente B y un 80% del eluyente A.
- Tras esto comienza a aumentar la cantidad de eluyente B de manera lineal, hasta que a los 15 min del cromatograma se alcanzó 99% de B y 1% de A.
- Se mantuvieron estas concentraciones de cada solvente de 5 a 10 min, dependiendo del tiempo de elución del último compuesto (GSSG).
- Una vez eluido el último compuesto de interés, se procedió al reequilibrado de la columna. Para ello, se alcanzaron las condiciones iniciales (20% de B y 80 %de A) manteniéndose así durante 15 min.

2.7.9.4. Cálculos.

Las concentraciones de GSH y GSSG se calcularon en el cromatograma basándose en una concentración conocida de patrón interno, que es añadida a cada muestra en el proceso de derivatización. El patrón interno utilizado es γ -glutamyl-glutamato, que previamente ha sido calibrado frente a patrones de concentraciones conocidas de GSH y GSSG. Tanto los patrones de GSH como los de GSSG se calibran enzimáticamente previamente para conocer su concentración exacta. El GSH se calibra por medio de la reacción de la glutatión transferasa y el GSSG por medio de la reacción de la glutatión reductasa. El glutatión total lo expresamos como equivalentes de GSH, sumándole a la concentración de GSH 2 veces la de GSSG:

$$\text{Glutatión total} = [\text{GSH}] + (2 \times \text{GSSG})$$

2.7.10. Determinación del GSSG por HPLC.

2.7.10.1. Fundamento.

Para la determinación del GSSG se siguió el método cromatográfico descrito por Asensi *et al.* (Asensi *et al.* 1994) basado en la separación cromatográfica de los derivados de dinitrobenceno y su posterior detección a 365 nm.

Para que el GSH no sufra una auto-oxidación en el proceso, se bloquea el grupo tiol con N-etilmaleimida (NEM). Este bloqueo hace que este método sea idóneo para evitar el aumento de concentración de GSSG por oxidación del GSH durante el procesado de la muestra.

2.7.10.2. Derivatización.

Tal como se detalló en el apartado “Procesamiento de la sangre murina”, en el momento del sacrificio se realizó una extracción de sangre en un tubo heparinizado que se mezcló con ácido perclórico al 12%, BPDS 2 mM., NEM 40 mM. Tras centrifugar se consiguió un sobrenadante ácido, libre de proteínas. Desde este punto:

1. Se pipetearon 40 μ L de sobrenadante ácido y se mezclaron con 4 μ L de patrón interno (γ -glutamyl-glutamato 1 mM en PCA 0.3%) y 4 μ L de púrpura de m-cresol 0.2 mM.
2. Se llevó la muestra a pH=8.5-9 añadiendo KOH 3M CHES 0.3M.
3. Se centrifugó la muestra (15000xG, 15 min, 4°C).
4. Se pipetearon 20 μ L de sobrenadante y se mezclaron con 40 μ L de 1-fluor dinitrobenceno al 1% en etanol absoluto.

5. Se incubó la muestra 45 min en oscuridad y se desecó la disolución a vacío (las muestras desecadas pueden conservarse durante meses a -20°C hasta el momento de su inyección en el HPLC).

6. Justo antes de la inyección en el cromatógrafo, las muestras se resuspendieron en 150 µL del eluyente A.

2.7.10.3. Técnica cromatográfica.

Las muestras se procesaron en el mismo HPLC que el glutatión total (apartado anterior). Las condiciones aplicadas en este ensayo fueron las mismas, siendo el gradiente de eluyentes, fase estacionaria, fase móvil y detección, idénticas que en el caso anterior.

2.7.10.4. Cálculos.

El cálculo de la concentración de glutatión oxidado en la muestra biológica, se realizó en función de la calibración de soluciones patrón de concentraciones conocidas de GSSG respecto al patrón interno.

2.7.11. Determinación de distintas proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y posterior Western blotting.

2.7.11.1. Fundamento.

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida (electroforesis en poliacrilamida), se utiliza principalmente para la separación de proteínas. Concretamente se utilizó el PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) en condiciones desnaturizantes. En presencia de algunos compuestos químicos las

proteínas pierden su estructura nativa. Tales agentes desnaturalizantes producen el desplegamiento de la proteína que aparece así sin la organización tridimensional característica de su función biológica. En esta técnica se utilizó la combinación de un agente desnaturalizante con naturaleza detergente, el SDS, y un agente reductor, el β -mercaptoetanol que provoca la rotura de los puentes disulfuro.

Los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular siendo así posible estimar su masa molecular. En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas unen en la proporción de 1.4 g de SDS por gramo de proteínas, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Las cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas. Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (del grupo SO_4^-), los complejos proteína-SDS están cargados negativamente de forma uniforme. Por tanto la separación depende de un parámetro físico-químico, la masa molecular y la carga.

2.7.11.2. Condiciones del gel y la transferencia.

Para detectar las proteínas se cargó una concentración variable de proteína de extracto celular total (20-50 μg). Se utilizaron geles discontinuos con un porcentaje de acrilamida variable (10-12% de 29:1 acrilamida: bisacrilamida) con 0.1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante (100 voltios) durante el tiempo necesario para que las proteínas se distribuyeran por el gel en un tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0.1%, SDS, pH=8.3).

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético el gel fue transferido a una membrana (blotting) de polifluoruro de vinilideno (PVDF por sus siglas en inglés, *polyvinylidene fluoride*; Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad, USA). El proceso se desarrolló de forma que pasaran 170 mA por cada membrana, en

tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH=8.3).

2.7.11.3. Visualización, cuantificación y cálculos por densitometría.

1. Tras la transferencia, las membranas fueron incubadas durante 60 min a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo o en 5% BSA; 0.1% Tween-20 en TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6) (TBS-T).
2. Se realizaron 3 lavados de 5 min con 10 mL de TBS-T.
3. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con agitación orbital en “tampón de anticuerpo” (5% BSA o 5% leche desnatada, 0.1 % Tween-20 en TBS) y con las correspondientes diluciones de los anticuerpos primarios (**Tabla III.6**).
4. Se realizaron 3 lavados de 5 min con 10 mL de TBS-T.
5. Las membranas se incubaron 60 min con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con HRP (**Tabla III.7**). El anticuerpo fue diluido en tampón de bloqueo a la concentración específica según el anticuerpo.
6. Se realizaron 3 lavados de 5 min con 10 mL de TBS-T.
7. La membrana fue incubada 1 min con reactivo *ECL* (Amersham Pharmacia. GE Healthcare, USA) e inmediatamente revelada con un detector quimioluminiscente, mediante el programa *Image quant LAS 4000* (GE-Healthcare Bio-Sciences).

Tabla III.6. Relación de anticuerpos primarios utilizados y condiciones.

Anticuerpo	Dilución	P.M. (KDa)	Fuente	Marca comercial (Referencia)
CAT	1:5000	61	Ratón	Sigma (CO979)
Cu/Zn SOD	1:1000	19	Conejo	Assay Designs (SOD-101)
Mn SOD	1:5000	25	Conejo	Assay Designs (ADISOD-110)
GPx	1:1000	22	Conejo	Abcam (22604)
Cyt-C	1:500	15	Conejo	Santa Cruz (7159)
PGC-1 α	1:200	92	Conejo	Cayman (101707)
CREB	1:800	43	Conejo	Cell Signaling (4820)
pCREB	1:800	43	Conejo	Cell Signaling (9191)
LRP1	1:20000	85	Conejo	Epit-Mics (2703-1)
C99 APP	1:1000	10	Conejo	Covance (SIG-39150)
p-tau AT8	1:1000	79	Ratón	Pierce (MN1020)
TrkB	1:1000	40, 140	Conejo	Cell signaling (4603)
Actina	1:2000	42	Ratón	Sigma (A2172)
α -Tubulina	1:1000	55	Ratón	Santa Cruz (8035)

Tabla III.7. Relación de anticuerpos secundarios utilizados y condiciones.

Anticuerpo	Dilución	Marca comercial (Referencia)
Anti-mouse	1:10000	Calbiochem (401215)
Anti-rabbit IgG	1:2000	Cell signaling (7074)

2.7.11.4. Cálculos.

Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato digital “.tif” para poder realizar la densitometría utilizando el programa informático *Image Gauge V4.0*.

Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en relación a los valores obtenidos de la α -tubulina o actina total en las mismas muestras. Estas proteínas forman parte de los microtúbulos de las células eucariotas, sin que haya cambios importantes en los distintos organismos (Little & Seehaus 1988; Doolittle 1992). Ambas proteínas son marcadores ampliamente utilizados como referencia de carga y concentración total de proteínas.

2.7.12. Determinación de los niveles de proteínas carboniladas en geles de poliacrilamida-SDS y posterior Western blotting.

2.7.12.1. Fundamento.

La determinación de los niveles de carbonilación proteica fue medida en la corteza cerebral de los ratones del *Objetivo 3* (2xTg y NTg).

El estrés oxidativo modifica la actividad de las proteínas, lo cual produce alteraciones en su función y las hace más susceptibles a la degradación. Los ROS afectan a las proteínas modificando algunos aminoácidos, formando puentes disulfuro en cisteína o introduciendo grupos carbonilo (aldehídos y cetonas). Estos grupos carbonilo se pueden detectar mediante Western blotting. Al derivatizar las muestras con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) se marcan los grupos quedando 2,4-dinitrofenilhidrazona la cual puede ser detectada mediante anticuerpos específicos.

2.7.12.2. Reactivos.

Se ha utilizado el kit comercial *OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit* (Ref. s750, Millipore, Germany).

2.7.12.3. Procedimiento.

Excepto por los pasos iniciales de derivatización de las muestras, se procedió de la misma forma que en el apartado anterior sobre Western blotting. La derivatización de las muestras y la incubación de las membranas se llevaron a cabo mediante el siguiente procedimiento:

1. Tal como se describió en apartados anteriores, los fragmentos de tejido cerebral se homogeneizaron en una solución amortiguadora de lisis (Kpi 0.05 M / EDTA 0.1 mM, pH=7.4). Las muestras se centrifugaron y se recogió el sobrenadante que fue congelado a -20°C.
2. Se añadió el volumen necesario de cada muestra para tener 20 µg de proteína (cuya concentración total había sido medida previamente mediante el método Lowry).
3. Se añadió 5 µL de SDS 12%.
4. Se añadió 10 µL de DNPH a cada muestra. También se prepararán muestras como controles negativos, a los que se añade solución de derivatización control.
5. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 min.
6. Se mezcló la muestra con 7.5 µL de la solución de neutralización (7.5 µl de solución de neutralización con 1.4 µl de β-mercaptoetanol).
7. Las muestras fueron cargadas en el gel de poliacrilamida siguiéndose el mismo proceso que en el Western blotting.
8. Una vez realizada la electrotransferencia tal como indicó el apartado anterior, las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora con 10 mL de solución de BSA 1% en PBS-Tween (PBS-T).
9. A continuación se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche en oscilación a 4°C en una solución de BSA 1% en PBS-T con una dilución 1:100.

10. Al día siguiente se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de BSA 1% en PBS-T con una dilución 1:200.

2.7.12.4. Revelado

La membrana fue incubada 1 min con reactivo *ECL* (Amersham Pharmacia. GE Healthcare, USA) e inmediatamente revelada con un detector quimioluminiscente, mediante el programa *Image quant LAS 4000* (GE-Healthcare Bio-Sciences). Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato digital “.tif” para poder realizar la densitometría utilizando el programa informático *Image Gauge V4.0*.

Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en relación a los valores obtenidos del escaneo de la misma membrana incubada con rojo Ponceau.

2.7.13. Retrotranscripción de una copia del ADN (cADN).

2.7.13.1. Fundamento.

En la actualidad existen varios métodos de determinación de la expresión del ARNm, como el *Northern Blotting*, la hibridación *in situ*, los ensayos basados en la protección frente a las ARNasas, arrays de ADNc y retrotranscripción-amplificación (RT-PCR) del ARNm.

En la presente Tesis Doctoral empleamos la RT-PCR para determinar la expresión del ARNm, que consta básicamente de dos pasos: Síntesis de ADNc (Retrotranscripción, RT) y amplificación cuantitativa del ARN (RT-PCR a tiempo real).

La RT o síntesis de ADNc consiste en la obtención de una copia de ADN a partir de un ARNm (proceso inverso de la transcripción). Para ello son necesarias unas

ADN polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan ARN como genoma, en vez de ADN. Para poder expresar sus proteínas, han de pasar la información a ADN. La transcriptasa inversa utilizada en esta tesis es *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems).

Para la obtención del ADNc se lleva a cabo una transcripción reversa usando el kit de *High-Capacity ADNc Reverse Transcription* (Applied Biosystems, CA) y las condiciones recomendadas por el fabricante.

2.7.13.2. Reactivos.

- Tampón específico de enzima (permite ser activa y llevar a cabo su función).
- Deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs por sus siglas en inglés, *deoxynucleotide triphosphates*). Solución de desoxinucleotidos trifosfato necesarios para la síntesis de ADNc.
- Cebadores al azar (puntos de anclaje que servirán a la retrotranscriptasa para iniciar la síntesis).
- Enzima MsRT (reconoce el ARN molde y tiene la actividad ADN polimerasa).
- Inhibidor de ARNasas.
- Agua DEPC.

2.7.13.3. Procedimiento.

1. Se preparó 2x RT *Master Mix*.

2. Se mezcló suavemente manteniéndose en hielo.
3. Se preparó la reacción de la retrotranscripción pipeteando 10 μL de 2x RT *Master Mix* y 10 μL de ARN (1 μg) en cada pocillo y se mezcló suavemente.
4. Se centrifugó la placa para eliminar las posibles burbujas de aire que puedan quedar en los pocillos.
5. Se llevó al termociclador donde el perfil de temperaturas fue: 25°C, 10 min; 37°C, 120 min; 85°C, 5 min; 4°C, ∞ .

2.7.14. Amplificación cuantitativa del ARN (RT-PCR en tiempo real).

2.7.14.1. Fundamento.

Una vez sintetizado el ADNc (mediante la RT), lo amplificamos por medio de la PCR a tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés, *quantitative polymerase chain reaction*). Este método permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de ADN.

El método de PCR está basado en la síntesis de una hebra complementaria de ADN, utilizando una cadena simple como molde. La PCR utiliza dos fragmentos cortos de ADN (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o *primers* se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del ADN.

Los requerimientos de la reacción parten de dNTPs que proporcionan tanto la energía como las unidades de la síntesis, de una polimerasa de ADN, cebadores, el ADN molde y un tampón con magnesio.

El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivas veces, según el gen a amplificar:

- Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del ADN.

- Unión o *annealing*: unión de los *primers* específicos a sus secuencias complementarias. La temperatura de unión es característica de cada pareja de *primers*.
- Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del *primer* respectivo.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del ADN, que viene dado por la expresión 2^n (siendo “n” el número de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial.

2.7.14.2. Procedimiento.

La cuantificación de los niveles de ARNm se realizó mediante qPCR cuantitativa con *ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, CA). Los oligonucleótidos específicos utilizados fueron obtenidos de *Qiagen* (Applied Biosystems, CA, EEUU):

- Catalasa (Mm00437992_m1)
- GPx (Mm00656767_g1)
- Mn-SOD (Mm01313000_m1)
- GAPDH (Mm99999915_g1)

Las condiciones de la PCR fueron: 95°C, 10 min; 60°C, 1 min. Los niveles de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se midieron en todas las muestras con el objetivo de normalizar la expresión de cada uno de los genes, la calidad de ARN y la eficiencia de la transcripción reversa. Cada muestra se analizó por triplicado y la expresión se calculó de acuerdo con el método: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct, ciclo umbral por sus siglas en inglés, *cycle threshold*).

2.7.14.3. Cálculos.

Se realizó una curva estándar de ARNm de concentración conocida. Este método permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen en función de la expresión de otro gen de expresión constitutiva, es decir, que no varía según diferentes condiciones. La cuantificación absoluta supone el conocimiento del número exacto de copias de ARNm de partida empleado para la realización de la curva estándar.

Otro método para determinar la expresión a partir de las curvas de amplificación obtenidas consiste en la comparación de Ct . Como hemos señalado, cuanto más ARNm de partida hay, menor es el Ct obtenido. Este método se asemeja al método de la curva estándar, pero utiliza fórmulas aritméticas cuya resolución conduce a la cuantificación relativa de la expresión de un determinado gen.

IV. RESULTS AND DISCUSSION

1. Study of the basal levels of neurotrophic factors (BDNF and IGF-1) in healthy adolescent cyclist and their respective controls (Objective 1).

As described in the *Materiales y Métodos* section, all the participants were healthy adolescents. The subjects of one group were members of an elite cyclist team, and then highly trained (trained group, n=9). The other group was formed by sedentary controls (sedentary group, n=7). There were two different moments of analysis within the year. The first one was concurred with the pre-season of the trained group; i.e. with a moderate intensity of sport training. The second one was performed after the competitive period of the trained group; i.e. after a high intensity of sport requirement (Pareja-Galeano *et al.* 2013a).

1.1. Results.

1.1.1. Anthropometric, metabolic and hematological data of the sedentary and trained adolescents.

The characteristics of the participants, exposed in **Table IV.1**, show that there were not differences between the experimental groups (sedentary vs. trained) regarding the age, weight, BMI, percentage of body fat (%Fat), percentage of body lean mass (%Lean mass), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG), fasting blood glucose (FBG), hemoglobin (Hb), and iron. However, we found that trained participants were taller and showed lower resting heart rate (RHR) than the sedentary ones ($P < 0.05$ in both cases).

Table IV.1. Characteristics of the sedentary and trained adolescents.

	Sedentary (n=7)	Trained (n=9)
Age (years)	13.4 ± 2.2	14.4 ± 2.1
Weight (kg)	47.4 ± 16.7	62.0 ± 8.5
Height (z-score)	0.3 ± 0.4	1.2 ± 1.0*
BMI (z-score)	-0.3 ± 1.2	0.7 ± 0.9
%Fat	18.1 ± 9.5	10.6 ± 1.8
%Lean mass	81.9 ± 9.5	89.4 ± 1.8
RHR (bpm)	70.7 ± 10.1	57.5 ± 6.4*
TC (mg/dl)	172.9 ± 29.4	145.1 ± 25.9
HDL-C (mg/dL)	68.6 ± 12.1	57.4 ± 8.4
LDL-C (mg/dL)	93.6 ± 27.6	86.1 ± 22.3
TG (mg/dL)	84.7 ± 52.8	61.8 ± 20.2
FBG (mg/dL)	90.7 ± 13.4	92.3 ± 8.3
Hb (g/dL)	14.0 ± 1.5	14.1 ± 1.0
Iron (µg/dL)	94.0 ± 32.6	95.6 ± 24.2

Table IV.1. Basal biochemical and anthropometrical variables of the sedentary (n=7) and trained (n=9) adolescents. Results of age, weight, height, BMI, %Fat (percentage of body fat), %Lean mass (percentage of body lean mass), RHR (resting heart rate), TC (total cholesterol), HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol), LDL-C (low density lipoprotein cholesterol), TG (triglycerides), FBG (fasting blood glucose), Hb (hemoglobin) and iron. Values are presented as mean ± SD. *P<0.05.

1.1.2. Daily energy expenditure of the sedentary and trained adolescents.

We used a calorimeter combined with an accelerometer to study the daily energy expenditure of both groups in the pre-season analysis (without including the training sessions). From this analysis we obtained two variables: total energy expenditure (TEE); and those developed over 3 METs, also known as physical

activity energy expenditure (PAEE). The mean TEE of the sedentary group was lower compared with the trained one (1951.7 ± 539.2 and 2745.0 ± 411.0 kcal/day respectively; $P < 0.05$). We found similar differences with the PAEE (590.5 ± 122.1 and 945.3 ± 286.9 kcal/day respectively; $P < 0.05$).

1.1.3. IGF-1 levels of sedentary and trained adolescents analyzed in two different moments of the season.

The peripheral blood levels of IGF-1 were measured in the sedentary and trained groups at two different moments: pre-season (moderate intensity of sport training) and post-competition (after a high intensity of sport requirement). The **Figure IV.1** shows lower levels of this growth factor in the sedentary group compared with the trained group in the pre-season analysis ($P < 0.05$). When we analyzed the trained group at post-competition period, they demonstrated similar levels of IGF-1 than the sedentary group. In addition, the IGF-1 levels of the trained group were significantly lower in the post-competition period compared with themselves in the pre-season period ($P < 0.05$).

Figure IV.1. IGF-1 levels by chemiluminescent assay in peripheral blood of sedentary and trained adolescents.

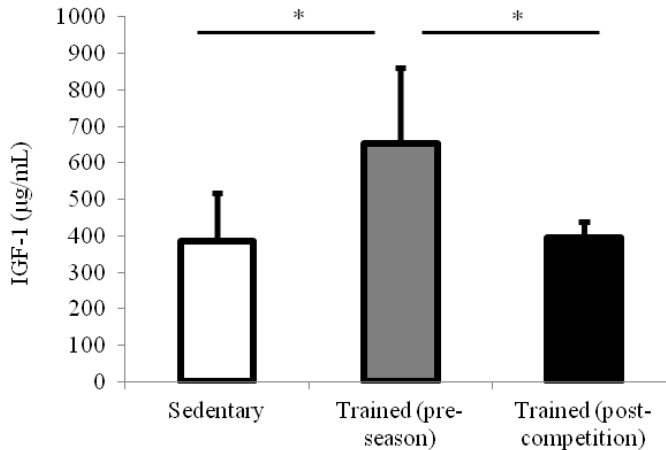


Figure IV.1. Serum IGF-1 levels by chemiluminescent assay in sedentary ($n=7$) and trained ($n=9$) adolescents at two different moments of season: pre-season and post-competition period. Values are presented as mean \pm SD. * $P<0.05$.

1.1.4. BDNF levels of sedentary and trained adolescents analyzed in two different moments of the season.

As described for the IGF-1 levels, we studied the plasma BDNF levels of two experimental groups. When we analyzed the pre-season period, the trained group showed higher BDNF levels than the sedentary one ($P<0.01$). Interestingly, the plasma BDNF concentration of the trained group during the post-competition period decreased reaching at similar levels than the sedentary group, and thereby showed a significant difference compared with themselves in the pre-season period ($P<0.01$). (**Figure IV.2**).

Thus, BDNF and IGF-1 showed a similar profile during the sport season within the trained group and compared with the sedentary group. In addition, we found a positive correlation between the BDNF levels and the percentage of lean mass, and

thereby inverse correlation with fat mass, of all the participants in the pre-season period ($r^2=0.688$; $P<0.05$). We did not find any correlations with others anthropometric variables (e.g. weight, height or BMI)

Figure IV.2. Plasma BDNF levels by ELISA in peripheral blood of sedentary and trained adolescents.

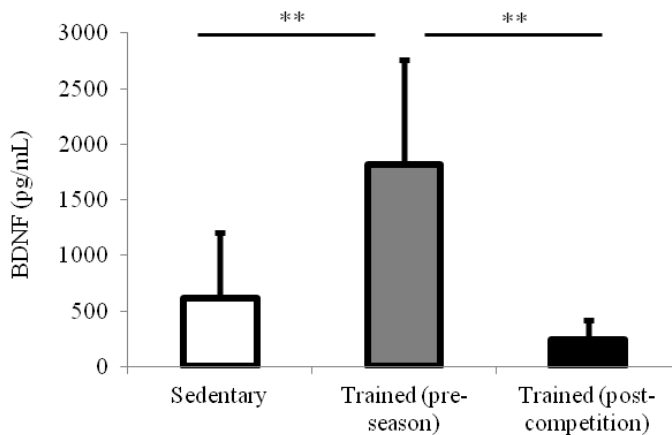


Figure IV.2. ELISA for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in blood plasma of sedentary ($n=7$) and trained ($n=9$) adolescents at two different moments of the season (pre-season and post-competition period). Values are presented as mean \pm SD. ** $P<0.01$.

1.1.5. CREB activation levels in PBMCs of sedentary and trained adolescents analyzed in two different moments of the season.

The CREB activation levels (pCREB/total CREB) were measured in the PBMCs of both groups. Trained group was analyzed both in pre-season and post-competition period. We did not find any difference in the CREB activation between the experimental groups (**Figure IV.3**).

Figure IV.3. CREB activation levels by Western blotting in PBMCs of sedentary and trained adolescents.

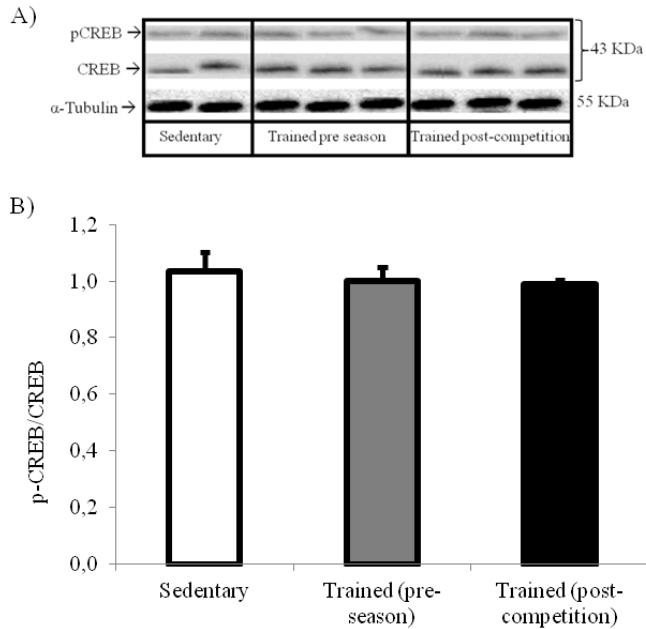


Figure IV.3. Western blotting for cAMP response element-binding protein (*CREB*) activation (*pCREB/CREB*) in PBMCs of sedentary ($n=7$) and trained ($n=9$) adolescents at two different moments of the season (pre-season and post-competition period). A) Representative bands of *CREB*, *pCREB* and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD.

1.2. Discussion.

Adolescence is a stage in which deep brain changes occur that affecting behavior, emotions, and even the future development of neuropsychiatric diseases (Costello *et al.* 2006). Although at six years old the human brain has reached 90-95% of its final size, in adolescence the brain volume, neuroplasticity and myelination continue for some years more. The studies by Giedd *et al.* have analyzed the brain developmental changes through image techniques during childhood and adolescence and they have shown that several structural changes occur after puberty mainly in the gray substance (Giedd *et al.* 1999; Giedd 2004). Based on these investigations, we know that there is a second neuronal proliferation and pruning cycle that coincides with the final stage of adolescence and is responsible for high mental faculties. This process affects the neuroplasticity through altering the number of synapses (Giedd *et al.* 1999; Giedd 2004). In a longitudinal study with 161 subjects, Giedd *et al.* found that the grey mass volume increases in childhood, reaches its maximum in adolescence and decreases from this stage. However the development is different across the diverse brain regions. The parietal lobes reach its gray mass volume at 11 years old; the frontal lobes at 12.5 years old; and the temporal lobes around 16.5 years old (Giedd *et al.* 1999; Giedd 2004). In addition, the dorsolateral region of the frontal lobe, associated with the executive function, is the last area to mature. Also the lateral parts of the left temporal lobe mature late compared with other regions and they are related to the semantic storage and management (Sowell *et al.* 2003).

The classical dilemma between genetics and/or environment is especially interesting in neurobiology since the cerebral development is regulated by a multitude of factors. Some structural and functional aspects of the brain development are modulated genetically and thereby unrelated to the personal experiences and education. However, there are several aspects of the architecture and design of the brain affected by the experience and then may be completely

different between diverse subjects, even monozygotic twins (White *et al.* 2002). In conclusion, both aspects, genetics and experience, are causative in the brain development (Pascual-Leone *et al.* 2005). Learning, diet or physical exercise are examples by which the environment regulate the development of several tissues like the brain, thereby modulating different molecular trophic pathways (Gomez-Pinilla 2008) and epigenetic pathways (Alegria-Torres *et al.* 2011; Ntanasis-Stathopoulos *et al.* 2013; Pareja-Galeano *et al.* 2013b; Pareja-Galeano *et al.* 2014). The concept of physical exercise as a beneficial behavior for the brain may seem like common sense, but it has only begun to be supported by research some years ago (Cotman & Engesser-Cesar 2002; Dishman *et al.* 2006; Cotman *et al.* 2007).

The meta-analysis by Knaepen *et al.* shows all the studies developed until 2010 in which they relate exercise and BDNF modulation (Knaepen *et al.* 2010). They concluded that the mean age of participants in all the included studies ranged from 21 to 70 years old (Baker *et al.* 2010; Goekint *et al.* 2010) and thereby no study included children or adolescents. Most of these studies with adult and aged persons showed high levels of BDNF due to higher physical activity levels (Gold *et al.* 2003; Rojas Vega *et al.* 2006; Ferris *et al.* 2007; Winter *et al.* 2007; Chan *et al.* 2008; Goekint *et al.* 2008; Tang *et al.* 2008; Rasmussen *et al.* 2009; Griffin *et al.* 2011; Heyman *et al.* 2012; Rojas Vega *et al.* 2012). Several studies have demonstrated also that acute and chronic exercise interventions, especially resistance training regimes, augments the IGF-1 levels in adults (Kraemer *et al.* 1995; Schwarz *et al.* 1996; Nguyen *et al.* 1998; Koziris *et al.* 1999; Cassilhas *et al.* 2007; Sillanpaa *et al.* 2010) which plays an important role in the mediation of hippocampal neurogenesis (Trejo *et al.* 2001).

Nevertheless, not all the studies show the same gains in neurotrophic factors due to exercise training (Chan *et al.* 2008; Nofuji *et al.* 2008; Zoladz *et al.* 2008). The discrepant findings between the different studies may be related to the chronicity and intensity of the exercise training as well as other methodological discrepancies,

e.g., timing of the measurements or type of sample among others (Knaepen *et al.* 2010). For example, most studies regarding the acute effects of exercise on cognition measured the level of neurotrophic factors immediately after exercise, whereas other studies examined the effects of regular exercise on cognition by measuring the neurotrophic factor levels when the subjects were at rest (Lee *et al.* 2014). Cho *et al.* have reported a dynamic relationship between exercise and circulating neurotrophic factors in human adults. In individuals with higher levels of cardio-respiratory fitness, the relationship between the cardio-respiratory fitness and BDNF was positive when BDNF was measured immediately after exercise, but the relationship was negative if BDNF was measured at rest (Cho *et al.* 2012).

The neurobiological modulation due to exercise in younger brains remains much less demonstrated. The clear ethical and logistic difficulties in child and adolescent studies and the different developmental patterns at neural, hormonal and psychological levels in this population make these studies more complex and thereby less frequent (Knaepen *et al.* 2010). Thus, recent reviews have raised concerns regarding the paucity of studies that have examined the effect of regular exercise on adolescent cognitive functions (Guiney & Machado 2013; Verburch *et al.* 2014) and even fewer regarding the neurotrophic factor induction due to exercise in this stage. Nevertheless, the lack of studies does not imply a lack in importance. Any factors able to promote brain growth or prevent its deterioration in this critical period may provide valuable information to both academia and the health community.

To our knowledge, the results achieved in the present study are the first showing that exercise training increasing the peripheral neurotrophic factors BDNF and IGF-1 in healthy adolescents (Knaepen *et al.* 2010; Huang *et al.* 2014). Although levels of BDNF and IGF-1 change according to age, body weight, and BMI (Lommatzsch *et al.* 2005), in the current study there were no significant differences in age and body composition parameters between the two groups. It has been

shown that peripheral BDNF levels can also be decreased in psychiatric and neurological disorders (Balaratnasingam & Janca 2012) but the clinicians involved in this study did not detect any disorder in any of the boys studied. Thus, the changes reported in neurotrophic factors can be attributed to the exercise training itself.

In a recent study, regular exercise was associated with better performance on the neuropsychological assessment of frontal and medial temporal lobe function in adolescents. However, they found a negative correlation between BDNF and VEGF and the neuropsychological assessments related to cognitive functions studied (Lee *et al.* 2014). On the other hand studies in pre-adolescent children have demonstrated through MRI techniques that higher-fit children showed greater bilateral hippocampal and dorsal striatum volume compared to lower-fit pre-adolescents. In addition, these structural changes were associated with relational memory and cognitive control (Chaddock *et al.* 2010a; Chaddock *et al.* 2010b).

The higher plasma levels of BDNF induced by exercise did not modify the CREB activation in PBMCs in our study. One limitation of this work was the missing assessment of CREB activation in specific PBMCs sub-populations, because it is known that the percentage of individual cell populations may vary in response to exercise (Brunelli *et al.* 2012). Therefore, although there is a release of BDNF in the different subtypes of PBMCs (Kerschensteiner *et al.* 1999; Edling *et al.* 2004) the mechanism by which mononuclear cells activate CREB remains unclear. Even though *in vitro* experiments have demonstrated that exogenous BDNF is a potent inducer of CREB activation in T lymphocytes (Koch *et al.* 2009), we did not observe this phenomenon *in vivo* in PBMCs.

Other important limitation of this study was the low sample size as well as the impossibility to recruit the control group in the post-competition period. We used platelets-free plasma according to Nofuji *et al.* (Nofuji *et al.* 2008) and, in contrast

to them, we found increased BDNF levels in the trained participants compared to controls at the pre-season measurement.

In summary, there is clear evidence regarding the importance of brain development in adolescence. In this stage several brain regions mature leading to important emotional and cognitive changes. This brain development is regulated by several mechanisms that are in turn mediated by the biological age. Most of neurotrophic factors induced by exercise have protective effects on neurons as well as stimulating the adult hippocampal neurogenesis. Moreover, reduced levels of neurotrophic factors, chiefly BDNF, are related with several neuropsychiatric diseases that may present in childhood and adolescence period such as depression, autism disorders, attention deficit–hyperactivity disorder, bipolar disorder and schizophrenia among others (Nagahara & Tuszynski 2011; Autry & Monteggia 2012).

Although several studies have demonstrated that exercise training, as well as some types of acute exercise, are able to up-regulate neurotrophic factors, almost all have been developed in adult and aged populations. Thus, taking into account the importance of the brain development in childhood and adolescence, more studies are needed to clarify the mechanisms by which exercise modulate its neurobiology. We have demonstrated for the first time the increase of these neuroplasticity-related proteins due to exercise training during adolescence. Overall, our results emphasize the significance and impact of exercise in adolescence, where many neural programs that shape behavior become established. Moreover, to know the effect of different types of exercise, intensities and frequency in this younger population will help to establish effective exercise programs that lead to higher benefits in the adolescent brains and thereby to the prevention of many neuropsychiatric diseases.

2. Study of BDNF levels measured in peripheral blood, under different processing conditions, after its induction by acute physical exercise in healthy young adults (Objective 2).

The results achieved to answer the *Objective 2* were obtained through an analytic longitudinal study in which twelve healthy male students (age, 24.7 ± 5.6 years; height, 1.77 ± 0.06 m; weight, 74.5 ± 5.7 kg; and BMI, 23.7 ± 0.9) from the University of Valencia performed an acute bout of exercise. We analyzed BDNF levels in a time-course approach: basal (Pre), post-exercise (Post), 30 and 60 minutes after exercise (30' and 60' respectively) in five different processing blood conditions. The five different conditions were selected according to the most used methodologies described in the literature (Knaepen *et al.* 2010); i.e. whole blood (WB), serum coagulated during 10 minutes (S10m), serum coagulated during 24 hours (S24h), platelet-free plasma (PFP), and total plasma (TP).

2.1. Results.

2.1.1. Daily physical activity performed by the healthy young adults.

The analysis of the IPAQ-S questionnaire, based on the information taken of different daily spheres (work, transport, housework and sport and free-time), shows that the major METs expended weekly was at high intensity (**Table IV.2**). On average, participants expended 6947 ± 2039 MET x (min/week), of which 57% at high intensity, 24% at moderate intensity and 19% at low intensity. The categorical score proposed by the IPAQ scoring protocol determines three levels: low (1), moderate (2), and high (3). The calculations performed with our data classify the participants in the high level (2.78).

Table IV.2. Weekly energy expenditure obtained by the IPAQ-S.

Low intensity	Moderate intensity	High Intensity
1305 ± 1507	1695 ± 1268	3947 ± 1446

Table IV.2. Weekly METs developed at different intensities. Values are presented as mean ± SD (n=12).

2.1.2. Performance reached on the acute exercise protocol by the healthy young adults.

The average duration of the exercise was 34 ± 1 minutes and that of the maximal heart rate reached by the participants was 184 ± 8 beats per minute. To determine the metabolic intensity of physical exercise, capillary blood lactate was assessed at different time points. The lactate concentration was higher immediately after exercise compared with baseline conditions (11.8 ± 2.6 and 3.1 ± 2.3 mmol/L respectively, $P < 0.001$) reaching baseline levels 60 minutes after the exercise (2.8 ± 1.1 mmol/L).

2.1.3. Hematological changes induced by exercise in the healthy young adults.

The hematological variables measured before and after the cyclo-ergometer exercise protocol are included in the **Table IV.3** Taking into account the Hc and Hb values before and after exercise we used the calculations described by Dill and Costill (Dill & Costill 1974) to determine the hemoconcentration. Exercise resulted in a hemoconcentration of $5.3 \pm 2.6\%$ in whole blood and $9.7 \pm 3.8\%$ in plasma volume.

We found a significant increment after the acute exercise in platelets ($26.39 \pm 6.55\%$), leukocytes ($69.09 \pm 21.35\%$), lymphocytes ($126.84 \pm 38.96\%$), monocytes

($72.75 \pm 31.96\%$), and basophils ($64.63 \pm 37.88\%$). However, after adjust to plasma hemoconcentration caused by exercise, we did not find a statistical significant difference in platelets.

Table IV.3. Hematological changes induced by an acute bout of exercise in healthy young adults.

	Pre-exercise	Post-exercise
Hemoglobin (g/dL)	15.19 ± 1.11	16.04 ± 1.09
Hematocrit (%)	42.81 ± 2.81	45.30 ± 2.77
Platelets (G/L)	187.10 ± 43.50	$236.40 \pm 56.70^{***}$
Erythrocytes (T/L)	4.95 ± 0.39	5.23 ± 0.40
Leukocytes (G/L)	7.54 ± 1.78	$12.64 \pm 2.76^{***}$
Lymphocytes (G/L)	2.02 ± 0.53	$4.55 \pm 1.10^{***}$
Monocytes (G/L)	0.64 ± 0.19	$1.09 \pm 0.41^{***}$
Basophils (G/L)	0.03 ± 0.01	$0.05 \pm 0.02^{**}$
Eosinophils (G/L)	0.19 ± 0.13	0.29 ± 0.25

Table IV.3. Hematological changes induced by acute exercise (pre-exercise vs. post-exercise). Values are presented as mean \pm SD ($n=12$). G, gigas; T, teras. $**P<0.01$; $***P<0.001$.

2.1.4. Time course of the BDNF levels found after an acute bout of exercise, in different processing blood conditions, in healthy young adults.

The individual profile of BDNF changes in the different blood conditions showed the homogeneity of each type of sample when comparing inter-individually over time. WB and S24h conditions demonstrated higher homogeneity changes compared with the other conditions. Despite the BDNF levels were different within the same moments in an inter-individual analysis, we found that both blood sample

conditions (WB and S24h) showed similar change profiles over time. Conversely, the S10m, PFP and TP sample conditions showed a high variability of change over time comparing the different subjects.

It existed a high variability of BDNF levels between subjects independently of the type of blood sample. When the BDNF concentrations were analyzed as medians we found that WB, S10m and S24h samples showed a change of more than 70-fold compared with PFP and TP (**Figure IV.4**). Exercise exerts a significant stimulatory effect on BDNF levels corrected by hemoconcentration, only in WB ($F(3,24)=4.915$, $P=0.008$, $n=9$, $\eta^2_{\text{partial}}=0.447$) and S24h ($F(3,27)=5.846$, $P=0.003$, $n=10$, $\eta^2_{\text{partial}}=0.394$) biological matrices (**Figure IV.4.A**). In S10m ($F(3,27)=0.375$, $P=0.772$, $n=10$, $\eta^2_{\text{partial}}=0.040$) and both all plasma (PFP: $F(3,27)=2.643$, $P=0.070$, $n=10$, $\eta^2_{\text{partial}}=0.227$; and TP: $F(3,27)=2.008$, $P=0.137$, $n=10$, $\eta^2_{\text{partial}}=0.182$) exercise did not cause any effect (**Figure IV.4.B**). Identical results were observed when data were non corrected by hemoconcentration (data not shown).

Figure IV.5 shows the BDNF concentrations in serum and plasma matrices, in relation to WB values. It could be observed that, at every sampling time, S24h values were higher than WB values (122%), while S10m approximately yielded a 36% of WB BDNF. Both BDNF plasma values were about a 4% in relation to WB values.

Correlation analyses between BDNF values in WB and in the other biological matrices showed that both serum data were closely related to whole blood BDNF content, while in plasma did not occur the same (**Figure IV.6**).

Figure IV.4. BDNF concentration changes before and over time after acute exercise in different blood conditions.

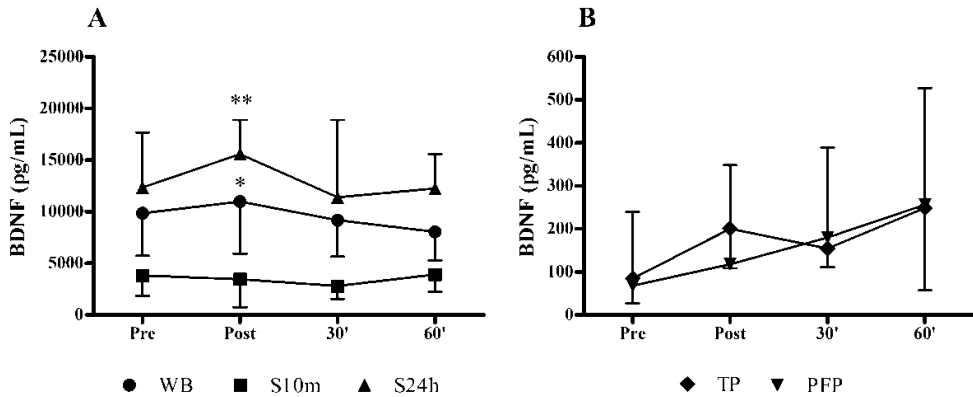


Figure IV.4. BDNF concentration changes before (Pre) and over time after acute exercise (immediately after exercise (Post), 30 minutes after (30'), and 60 minutes after (60')) in different blood conditions. A) whole blood (WB), serum coagulated during 10 minutes (S10m), and serum coagulated during 24 hours (S24h); and B) platelets-free plasma (PFP), and total plasma (TP). Values at post-exercise are corrected by hemoconcentration. Points represent median value and error bars 25th and 75th quartiles. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. pre-exercise values.

Figure IV.5. Percentage of BDNF concentration in relation to whole blood before and over time after acute exercise in different blood conditions.

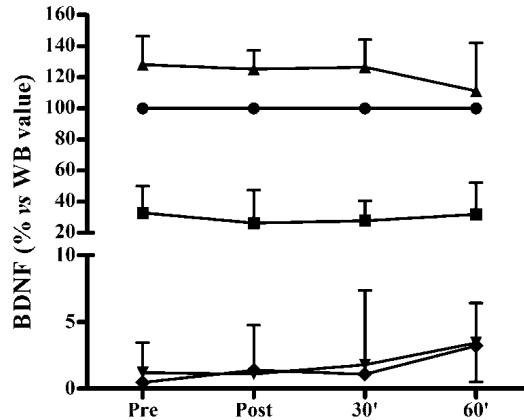


Figure IV.5. BDNF concentrations at pre-exercise, post-exercise, after 30' recovery and after 60' recovery expressed as the percentage in relation to whole blood (WB) samples (circles), serum coagulated during 10 minutes (S10m) samples (squares), serum coagulated during 24 hours (S24h) samples (triangles), platelets-free plasma (PFP) samples (inverted triangles) and total plasma (TP) samples (diamonds). Points represent median value and error bars 25th and 75th quartiles.

Figure IV.6. Correlations between BDNF values in the different blood conditions.

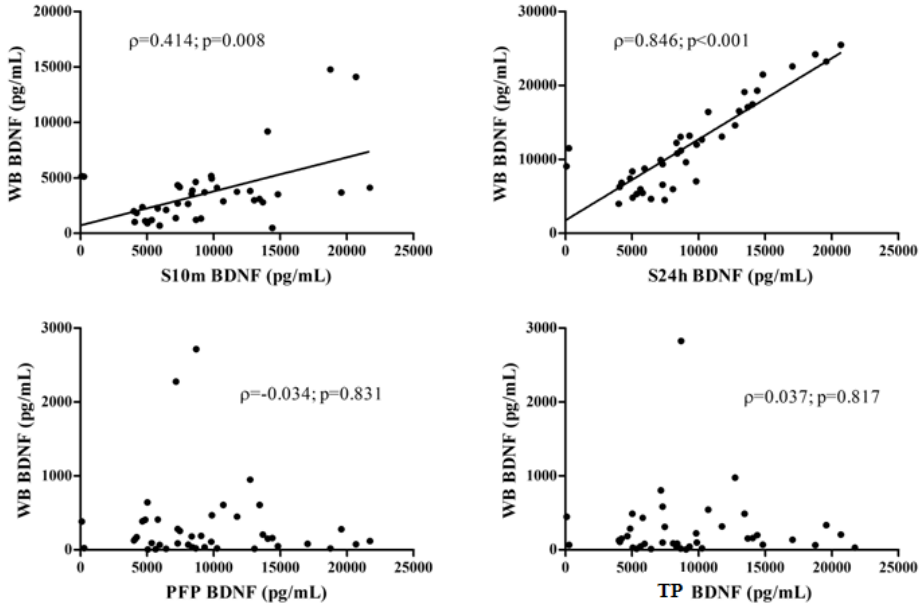


Figure IV.6. Correlations between BDNF values in whole blood (WB) and BDNF values in the other biological matrices: serum coagulated during 10 minutes (S10m), serum coagulated during 24 hours (S24h), platelets-free plasma (PFP), and total plasma (TP).

2.2. Discussion.

Research in the area of neurotrophic factors induced by exercise has mushroomed (Knaepen *et al.* 2010; Huang *et al.* 2014). However, despite the large number of studies demonstrating that exercise induces higher circulating BDNF levels (Huang *et al.* 2014), the methodology of sampling process has not been yet standardized (Knaepen *et al.* 2010). Blood BDNF concentration shows enormous variability due to several factors such as plasma volume changes (hemoconcentration), type of sample processing, number of platelets, type of anticoagulant, and coagulation time, among others (Trajkovska *et al.* 2007; Knaepen *et al.* 2010; Sanchis-Gomar & Lippi 2014).

In 2010, Knaepen *et al.* reviewed the methods that have been used to study the effects of exercise on peripheral BDNF concentrations (Knaepen *et al.* 2010). Of the twenty four studies analyzed only two performed a correction of BDNF concentrations for blood volume changes following exercise (Winter *et al.* 2007; Yarrow *et al.* 2010). In our opinion this is an important methodological drawback. The classical calculations described by Dill and Costill allow us to estimate the changes in blood and plasma volume through the determination of the hemoglobin and hematocrit values before and after exercise (Dill & Costill 1974). Changes in whole blood ($5.3 \pm 2.6\%$) and in plasma volume ($9.7 \pm 3.8\%$) that we found in this study are in accordance with those previously reported in the literature (Dill & Costill 1974; Huang *et al.* 2002). We have found that the changes in blood volume after an acute bout of exercise affect the peripheral BDNF concentrations without a modification in its rate of synthesis. Our results emphasize the importance of correcting BDNF results with the changes in blood volume in studies including acute bouts of exercise protocols.

In the vast majority of exercise studies in humans, the main type of sample used to determine BDNF has been serum followed by plasma and platelets (Knaepen *et al.*

2010). The results of these studies show controversial results with regard to basal BDNF concentrations and to the exercise effect (Knaepen *et al.* 2010). For instance, Cho *et al.* found that after a maximal treadmill test BDNF concentrations in serum, plasma, and platelets were significantly increased immediately after exercise (Cho *et al.* 2012). Based on their results the authors suggest an association between circulating and platelets (stored) BDNF levels and cardiorespiratory fitness (VO_{2max}). More recently, Huang *et al.* (Huang *et al.* 2014) reviewed that an acute bout of exercise results in a significant increase in the peripheral blood BDNF concentration in healthy individuals (Rojas Vega *et al.* 2006; Ferris *et al.* 2007; Winter *et al.* 2007; Goekint *et al.* 2008; Nofuji *et al.* 2008; Tang *et al.* 2008; Rasmussen *et al.* 2009; Bos *et al.* 2011; Goekint *et al.* 2011; Griffin *et al.* 2011; Vega *et al.* 2011; Cho *et al.* 2012; Heyman *et al.* 2012; Rojas Vega *et al.* 2012).

We only found an exercise-induced increase in BDNF in WB and S24h samples but not in S10m or in plasma. In our opinion several methodological aspects can explain these contradictory results. For instance, we have found that serum collection procedure is very important when determining free circulating peripheral BDNF concentrations. The clotting time is a vital step to standardize this determination (Knaepen *et al.* 2010). We have found that BDNF is gradually increased in the serum samples from platelets with a maximum concentration at 24 hours after blood collection accordingly to Katoh-Semba *et al.* (Katoh-Semba *et al.* 2007). Clotting temperature is also very important. Serum samples must be kept at 4°C or BDNF will be degraded. Thus, our data support the idea that serum samples do not only reflect the BDNF released from the central nervous system but also those stored in platelets. Thereby, although most studies do not mention the temperature or clotting time, to maintain the sample at 4°C for a minimum of 24 hours is important to obtain the maximum concentration of BDNF (Knaepen *et al.* 2010). S10m is widely used (Knaepen *et al.* 2010) but is an unreliable procedure since it shows a high inter-subject heterogeneity.

In our study, we did not find an exercise-induced increase in BDNF levels in the plasma but only in WB and S24h. This increment has been previously reported by several research groups (Knaepen *et al.* 2010). Rasmussen *et al.* found that approximately 70% of the plasma BDNF comes from the brain both at rest and during exercise (Rasmussen *et al.* 2009). In this study the subjects performed a 4 hours bout of ergometer rowing to a workload 10-15% below the lactate threshold. We performed a shorter, but more intensive, exercise test (34 ± 1 minutes with the warm-up included). We think that the differences in exercise duration could account for this contradictory result. Regarding the plasma samples several investigators recommend the elimination of the platelets from the plasma to avoid artifacts when determining BDNF in this type of samples (Rasmussen *et al.* 2009; Seifert *et al.* 2010). We have found that both TP and PFP samples have the same BDNF levels. Thus, in our opinion, this procedure is not necessary.

In addition, we should take into account other limitations of this study including the limited sample size which may be responsible, at least in part, of the high heterogeneity found in the BDNF levels. Moreover we did not measure the BDNF platelet content directly although it can be calculated removing the plasma BDNF levels to those in S24h. Another limitation of the study rises from the existence of higher levels of BDNF in the S24h than in WB. We suggest that the Triton X-100 used to process the platelets of the WB samples did not lysate completely them.

Several authors have proposed different methodological approaches to measure BDNF blood concentration changes due to a single bout of exercise (Knaepen *et al.* 2010). However, to the best of our knowledge this is the first study in which all variables have been controlled and measured in the same subjects and following the same exercise protocol.

3. Study of the effects of exercise training (12 weeks) on cognitive, performance and neurobiological variables related to oxidative stress, mitochondriogenesis, neurotrophic and pathophysiological pathways in a 2xTg model of Alzheimer's disease, and their respective controls (Objective 3).

A group of ten double transgenic (2xTg) and eight wild types (NTg, non transgenic) female mice, aged 10 months, were divided into two groups: exercise and sedentary. The intervention was maintained for 12 weeks. A total of four groups were analyzed:

- Non transgenic sedentary (NTg+Sed)
- Non transgenic exercised (NTg+Ex)
- Double transgenic sedentary (2xTg+Sed)
- Double transgenic exercised (2xTg+Ex)

3.1. Results.

3.1.1. Performance of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease allowed to run freely in the running-wheel.

The average running distance and time per mouse was calculated from the total counts for each wheel per week (**Figure IV.7**). The 2xTg+Ex mice increased significantly the running distance (**Figure IV.7.A**) and time (**Figure IV.7.B**) compared with the NTg+Ex animals in the fifth week and after eight week of training.

Figure IV.7. Distance covered and time spent daily on the running wheel of NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

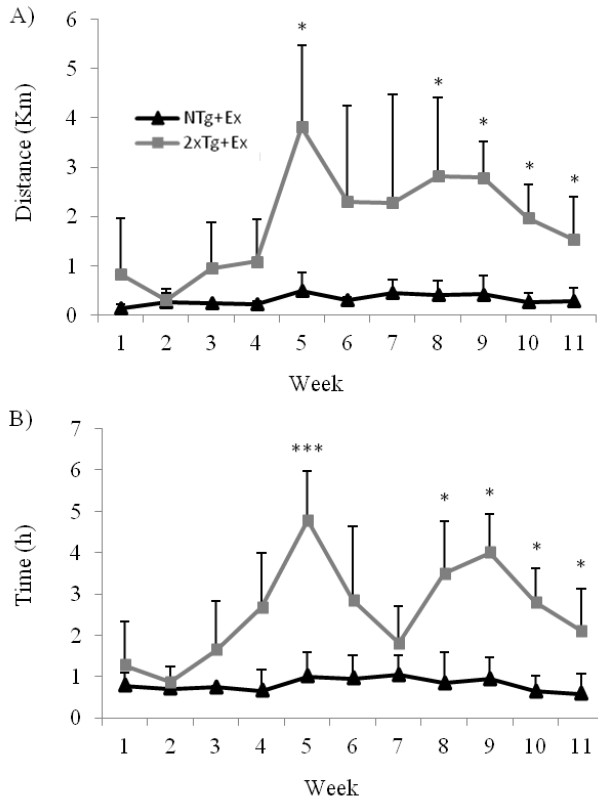


Figure IV. 7. Performance on the running wheel. A) Distance covered; and B) Time spent daily on the running wheel by non transgenic exercised mice (black line, $n=4$) and double transgenic exercised mice (grey line, $n=5$). Values are presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

3.1.2. Physical testing in the NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

The effects of exercise training on physical performance were analyzed by measuring the maximal aerobic velocity and the forelimb grip strength before and after training.

We found a significant decrease in the forelimb grip strength of 2xTg mice, both the 2xTg+Sed ($p<0.01$) and the 2xTg+Ex ($p<0.05$). However, exercise training reverted significantly this strength loss in the 2xTg+Ex mice ($p<0.01$) (**Figure IV.8**). The results of the maximal aerobic velocity test showed that the 2xTg groups reached lower velocities compared with NTg groups in the pre-training period ($P<0.01$). Nevertheless, training reverted the lower levels of maximal aerobic velocity in 2xTg+Ex while the 2xTg+Sed remained low ($P<0.05$) (**Figure IV.9**).

Figure IV.8. Forelimb grip strength of NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

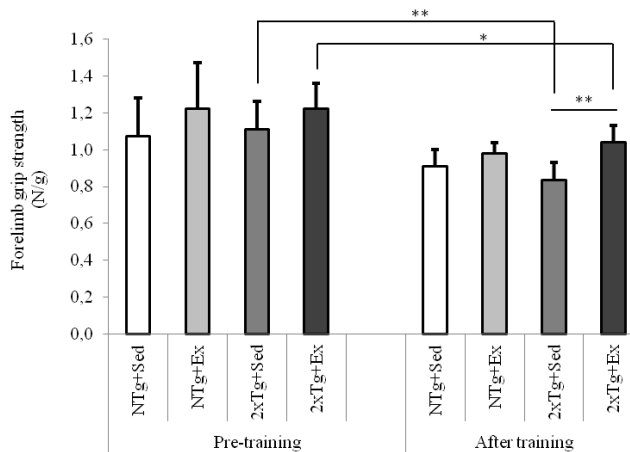


Figure IV.8. Forelimb grip strength of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary

mice ($2xTg+Sed$, $n=5$), and double transgenic exercised mice ($2xTg+Ex$, $n=5$). Values are presented as mean \pm SD. N/g, Newton/grams of weight. * $P<0.05$; ** $P<0.01$

Figure IV.9. Maximal aerobic velocity of NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

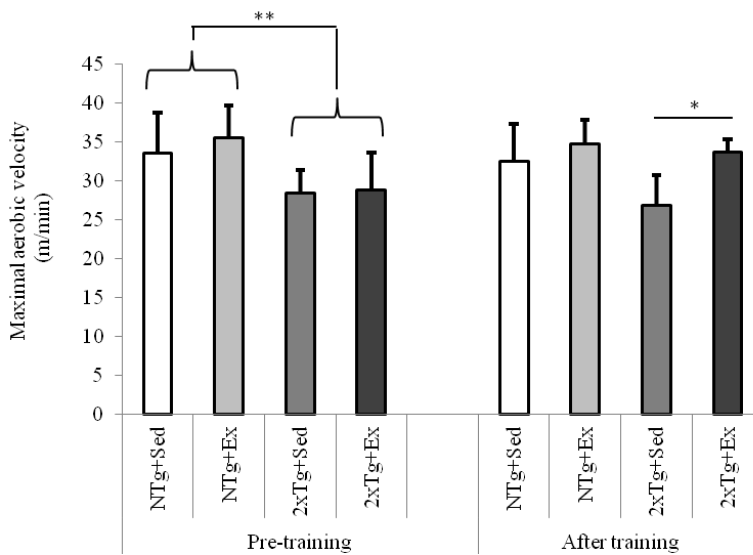


Figure IV.9. Maximal aerobic velocity of non transgenic sedentary mice ($NTg+Sed$, $n=4$), non transgenic exercised mice ($NTg+Ex$, $n=4$), double transgenic sedentary mice ($2xTg+Sed$, $n=5$), and double transgenic exercised mice ($2xTg+Ex$, $n=5$). Values are presented as mean \pm SD. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

3.1.3. Behavioral and cognitive testing in the NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

We performed two different tests to measure the behavioral and cognitive features in our mice: the corner test and the open field test.

Corner test. The analysis of this test was carried out considering two parameters: the number of corners explored and the number of rearings done. Both variables

were similar between groups at the beginning of the experiment. However, after training period the number of corners explored were high in both exercised groups compared with its respective homologous in genotype remained at rest ($P < 0.05$ for both) (**Figure IV.10.A**). On the other hand, the number of rearings was higher in the NTg groups compared with the 2xTg ones ($P < 0.01$). Moreover, we found a tendency by which 2xTg+Ex performed more rearings than the 2xTg+Sed (**Figure IV.10.B**). In addition, we found a significant increase of both parameters after training compared with the pre-training when we analyzed all groups together ($P < 0.001$ for both).

Figure IV.10. Corner test in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

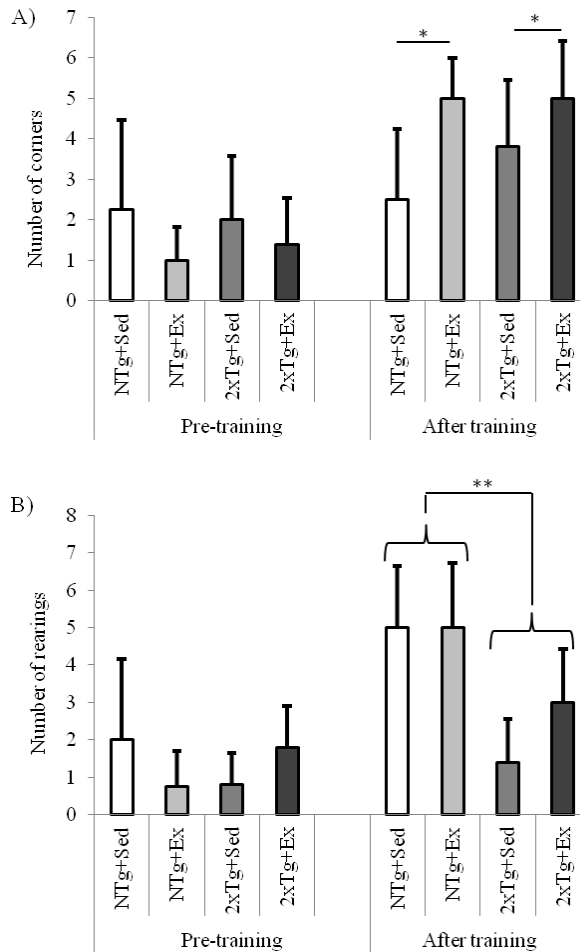


Figure IV.10. Number of corners (A) and rearings (B) performed in the corner test of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$); in a pre-training and after training conditions. Values are presented as mean \pm SD. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

Open field test. The analysis of this test was performed considering different parameters based on the motor behavior of the mice; i.e. latency in the central square, latency to reach to the periphery, number of rearings, total time of grooming and number of defecations. In the test performed before training period we found any difference between groups for all variables analyzed. All groups started the experiment at similar behavioral profile. After training period, the latency in the central square (freezing behavior) did not change statistically between groups. However we found a clear tendency of 2xTg+Sed to remain immobile in the center compared with the rest of groups (**Figure IV.11.A**). When we analyzed the time spent to reach to the periphery of the box we found that 2xTg+Sed group spent more time than the rest of groups ($P<0.05$) (**Figure IV.11.B**). The number of rearings did not change between groups because its high variability. However, rearings increased in the 2xTg+Ex group when compared the pre-training and after training test ($P<0.05$) (**Figure IV.11.C**). In addition, despite the clear tendency of NTg+Ex group to spend more time grooming, there were not statistical differences between groups (**Figure IV.11.D**). Finally, the number of defecations counted showed no differences between groups (**Figure IV.11.E**).

Figure IV.11. Open field test in NTg and 2xTg mice for Alzheimer’s disease subjected to exercise training or rest.

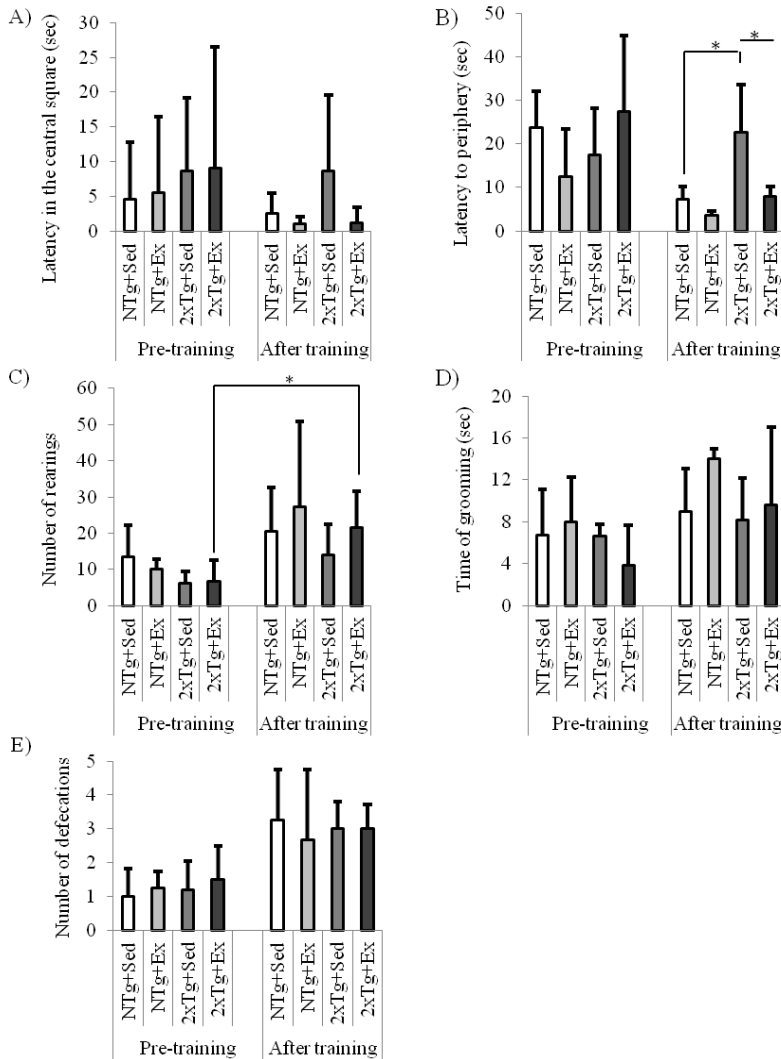


Figure IV.11. Latency spent in the central square (A); latency to reach to the periphery (B); number of rearings (C); time of grooming (D) and; number of defecations (E) in the open field test of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, n=4), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, n=4), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, n=5), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, n=5); in a pre-training and after training conditions. Values are presented as mean ± SD. *P<0.05.

3.1.4. Metabolic profile over time of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

Mice metabolic profile was measured throughout the experiment by different variables; i.e. weight, glycemia and cholesterolemia levels. As shown in **Figure IV.12**, the weight of the animals did not change over time in any group. The glycemia levels did not show differences between groups. However, it decreased in the 2xTg groups, trained and sedentary ($P<0.01$) (**Figure IV.13**). Cholesterolemia levels did not change over time in any experimental groups (**Figure IV.14**).

Figure IV.12. Body weight over time in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

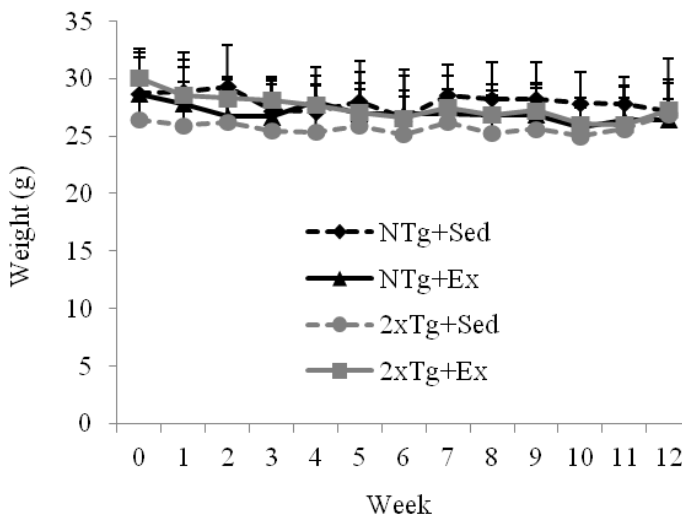


Figure IV.12. Body weight over time of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). Values are presented as mean \pm SD.

Figure IV.13. Glycemia levels over time in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

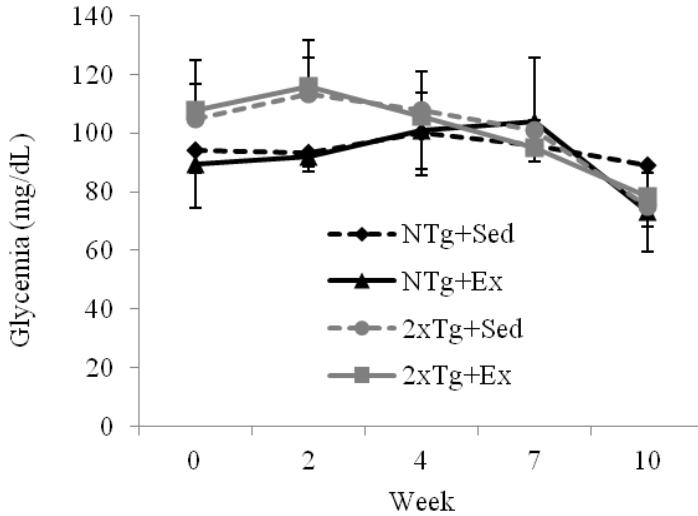


Figure IV.13. Glycemia levels over time of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). Values are presented as mean \pm SD. $P < 0.01$ in 2xTg+Sed and 2xTg+Ex comparing week 0 (before intervention) with week 10.

Figure IV.14. Cholesterolemia levels over time in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

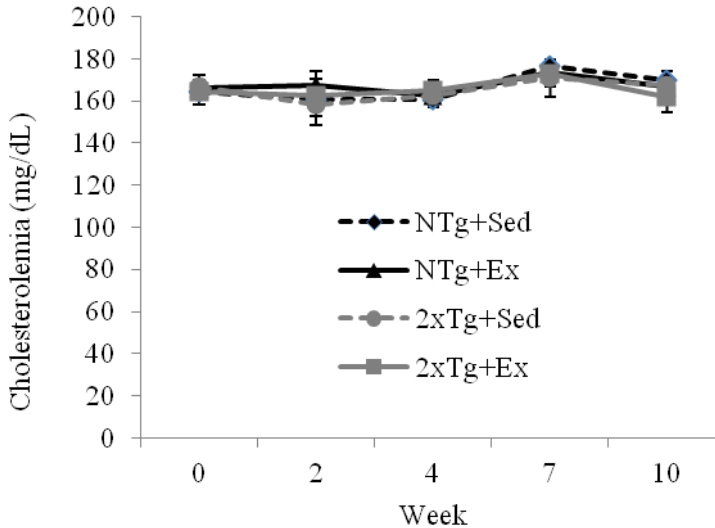


Figure IV.14. Cholesterolemia levels over time of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). Values are presented as mean \pm SD.

3.1.5. Hippocampal A β (1-42) levels in the 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

As expected, the measurement of A β (1-42) in hippocampus showed very few levels in the NTg groups whereas these levels were high in the 2xTg groups. In addition, exercise training resulted in a reduction of the accumulation of A β (1-42) in the 2xTg+Ex group compared with the 2xTg+Sed ($P<0.05$) (**Figure IV.15**).

Figure IV.15. Hippocampal A β (1-42) levels in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

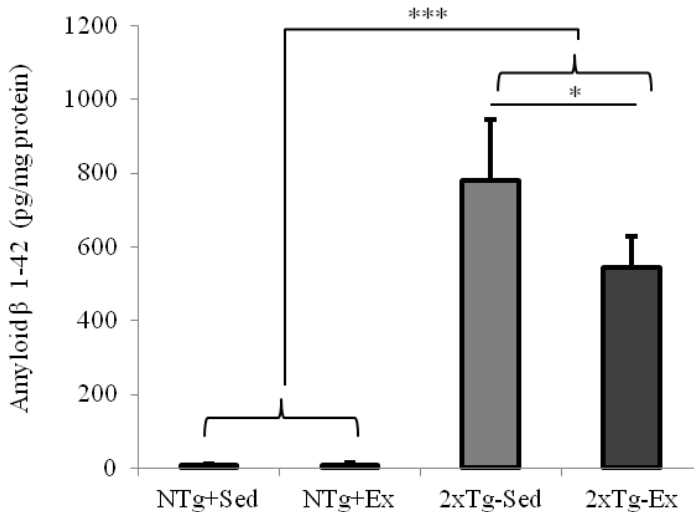


Figure IV.15. Hippocampal amyloid- β ($A\beta$) (1-42) levels by ELISA of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). * $P<0.05$; *** $P<0.001$

3.1.6. Brain cortex and blood oxidative damage of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

The oxidative damage was evaluated in brain and in blood. MDA levels were analyzed in both, blood plasma and cerebral cortical tissue whereas protein carbonylation was measured in cerebral cortical tissue. Finally, the GSSG/GSH ratio was determined in blood.

MDA levels did not show significant differences between groups neither in plasma nor in brain cortex (**Figure IV.16.A** and **Figure IV.16.B** respectively). An estimation of the protein oxidation was evaluated by the carbonylation of proteins in the brain cortex. The only difference we found showed lower levels of protein

carbonylation in the 2xTg+Sed compared with the NTg+Sed group ($P<0.05$) (**Figure IV.17**). The oxidation status was also measured by the couple oxidized / reduced glutathione in blood. These results showed no differences in the GSSG (oxidized form) (**Figure IV.18.A**). However, 2xTg groups showed higher levels of GSH (reduced form) than the NTg groups ($P<0.05$) (**Figure IV.18.B**). This difference was confirmed when calculated the ratio $(\text{GSSG}/\text{GSH})\times 100$ in which 2xTg groups showed lower levels of this quotient compared with the NTg groups ($P<0.05$) (**Figure IV.18.C**). In conclusion, taking into account all the results regarding the oxidative damage, the only differences that we found were due to genotype and not to treatment.

Figure IV.16. Blood and brain cortex MDA levels in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

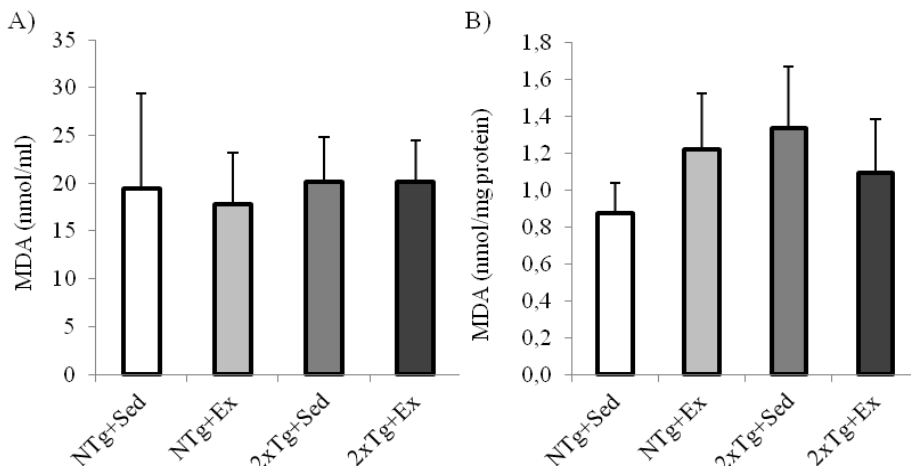


Figure IV.16. MDA levels by HPLC of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). A) Plasma MDA levels; B) Brain cortex MDA levels. Values are presented as mean \pm SD.

Figure IV.17. Brain cortex protein carbonylation levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

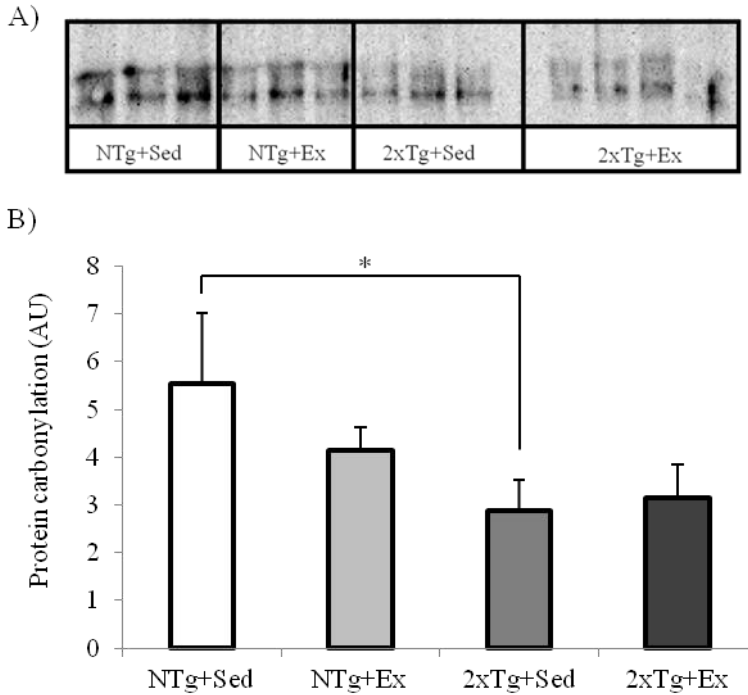


Figure IV.17. Western blotting for carbonylated proteins (Oxyblot (TM) in brain cortex homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). A) Representative bands of carbonylated proteins. B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. * $P<0.05$. AU (arbitrary units).

Figure IV.18. Blood GSSG, GSH and GSSG/GSH ratio in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

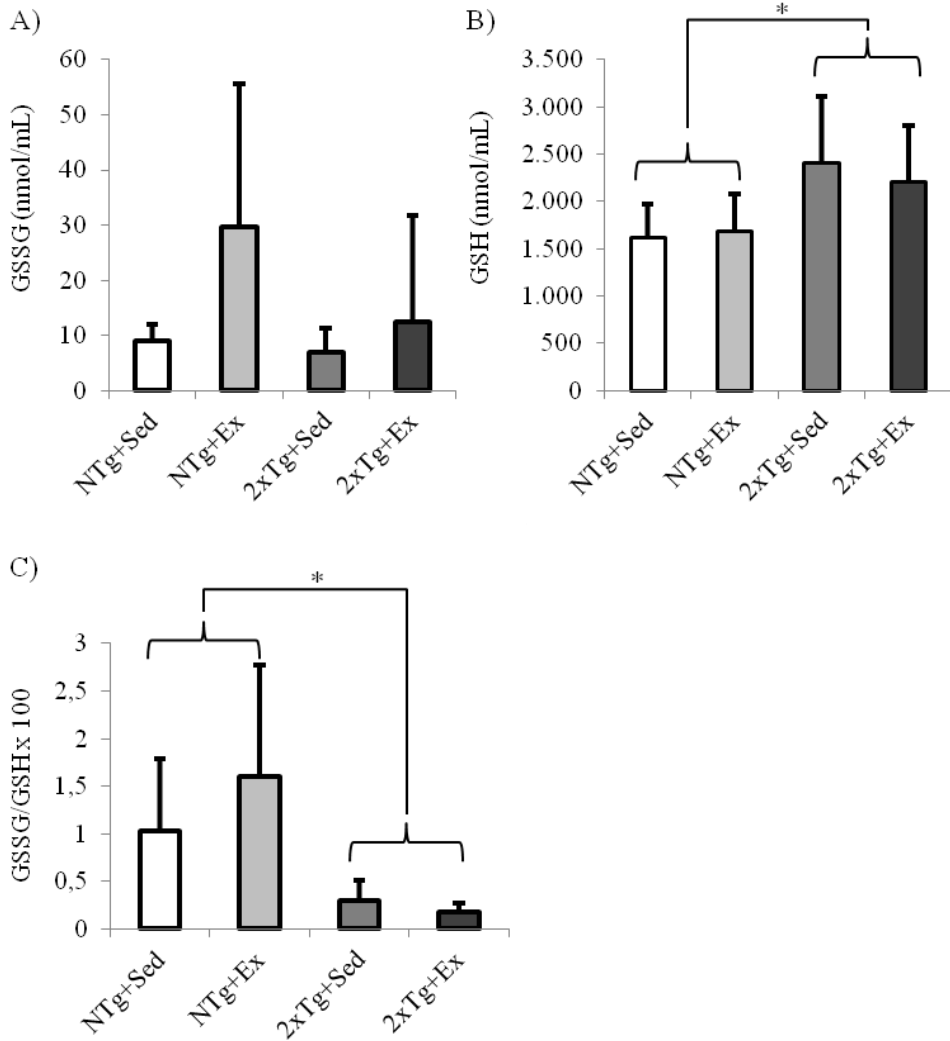


Figure IV.18. GSSG, GSH and (GSSG/GSH)x100 by HPLC in blood of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, n=4), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, n=4), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, n=5), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, n=5). A) GSSG levels; B) GSH levels; C) (GSSG/GSH)x100. Values are presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$.

3.1.7. Brain cortex antioxidant defense of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

We studied the effect of the exercise training and the 2xTg genotype in the brain cortex antioxidant defense by Western blotting. Thus, we study the protein levels of catalase (CAT), Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), Mn superoxide dismutase (Mn-SOD), and glutathione peroxidase (GPx). **Figure IV.19** shows that both sedentary groups, NTg+Sed and 2xTg+Sed, showed similar levels of CAT. Interestingly, exercise training did not increase the levels of this antioxidant enzyme in the NTg+Ex group but it did in the 2xTg+Ex compared with the NTg+Ex ($P<0.05$). Cu/Zn-SOD, however, increased due to exercise training in the NTg+Ex mice compared with its homologous sedentary (NTg+Sed) ($P<0.05$). This antioxidant enzyme did not change due to genotype (**Figure IV.20**). Finally, the results of Mn-SOD and GPx enzymes did not show difference due to genotype nor exercise training (**Figure IV.21** and **Figure IV.22** respectively).

Figure IV.19. Brain cortex catalase levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

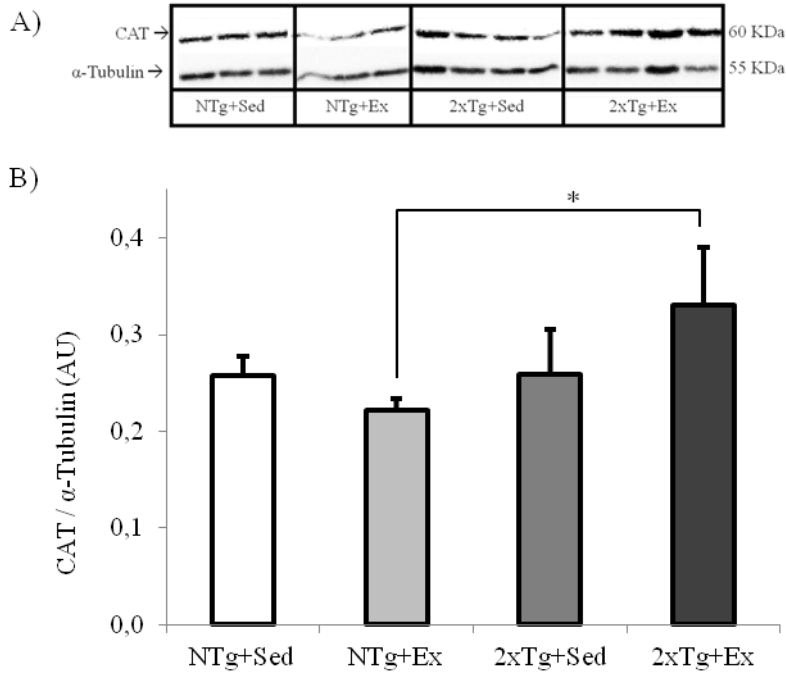


Figure IV.19. Western blotting for catalase (CAT) in brain cortex homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). A) Representative bands of CAT and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. * $P<0.05$. AU (arbitrary units).

Figure IV.20. Brain cortex Cu/Zn-SOD levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

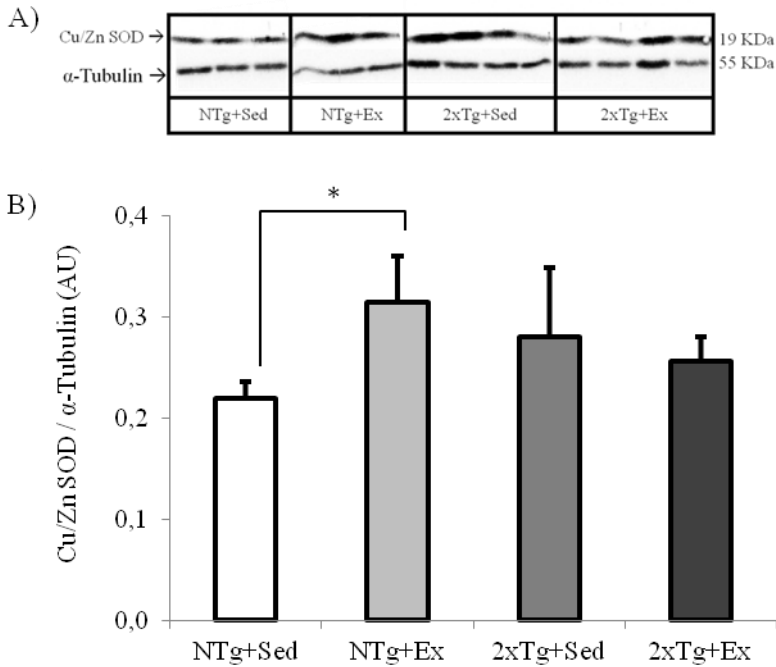


Figure IV.20. Western blotting for Cooper Zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) in brain cortex homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). A) Representative bands of Cu/Zn SOD and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. * $P<0.05$. AU (arbitrary units).

Figure IV.21. Brain cortex Mn-SOD levels by Western blotting in 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

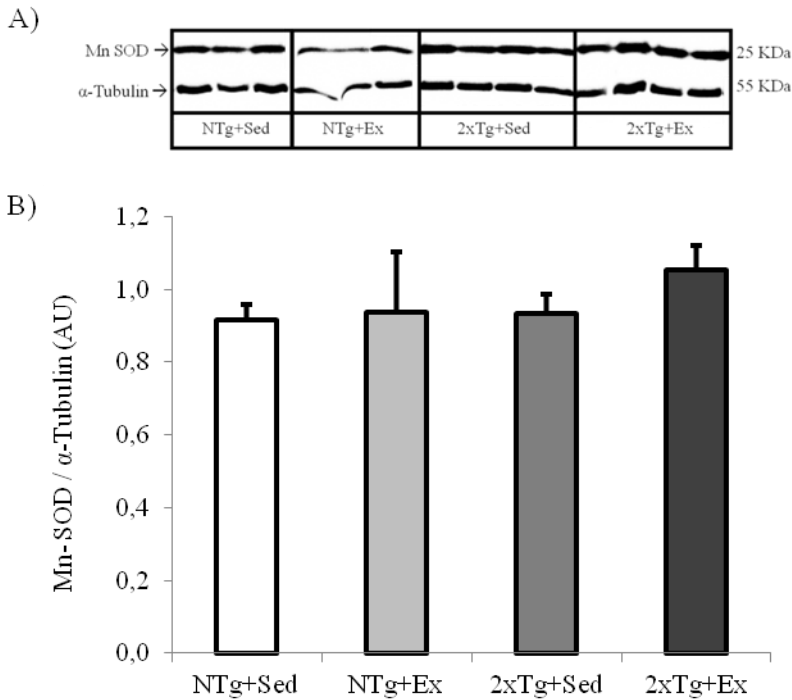


Figure IV.21. Western blotting for Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) in brain cortex homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). A) Representative bands of Mn-SOD and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. AU (arbitrary units).

Figure IV.22. Brain cortex GPx levels by Western blotting in 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

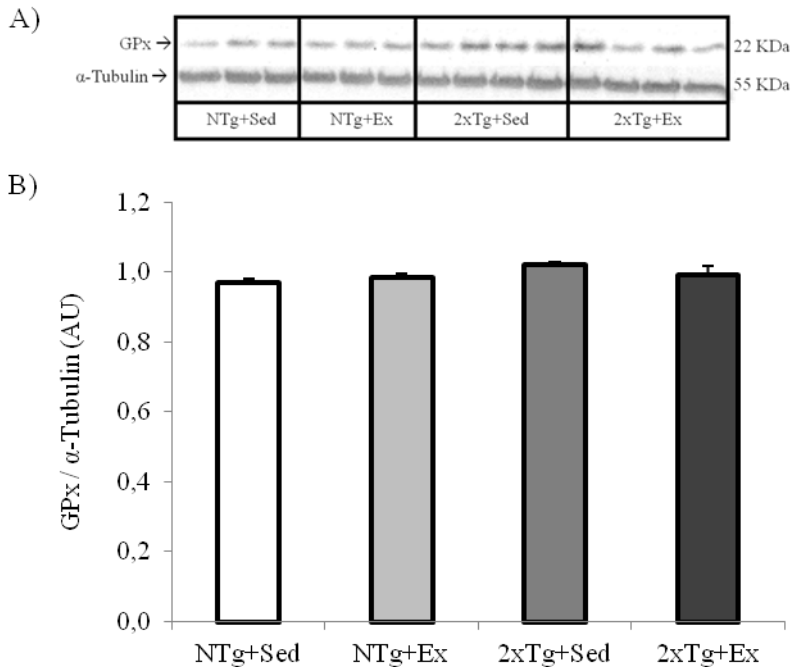


Figure IV.22. Western blotting for glutathione peroxidase (GPx) in brain cortex homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). A) Representative bands of GPx and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. AU (arbitrary units).

3.1.8. Brain BDNF levels and its signaling-related proteins in the NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

The neurotrophic pathway was evaluated in brain cortical tissue through the analysis of BDNF levels and in hippocampus through the measurement of BDNF and CREB activation levels. When we measured BDNF levels in brain cortex we

did not find differences due to genotype or exercise treatment (**Figure IV.23**). However, in hippocampus the levels of this neurotrophin were higher in the NTg compared with those in the 2xTg groups ($P<0.01$). Moreover, exercise training increased the BDNF levels in the NTg+Ex group ($P<0.05$) but it did not in 2xTg+Ex (**Figure IV.24**). To check if these differences affect to the downstream pathway we measured the CREB activation levels (phosphorylated CREB (pCREB) divided by the total CREB (CREB)). Nevertheless we did not find any difference between groups (**Figure IV.25**)

Figure IV.23. Brain cortex BDNF levels by ELISA in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

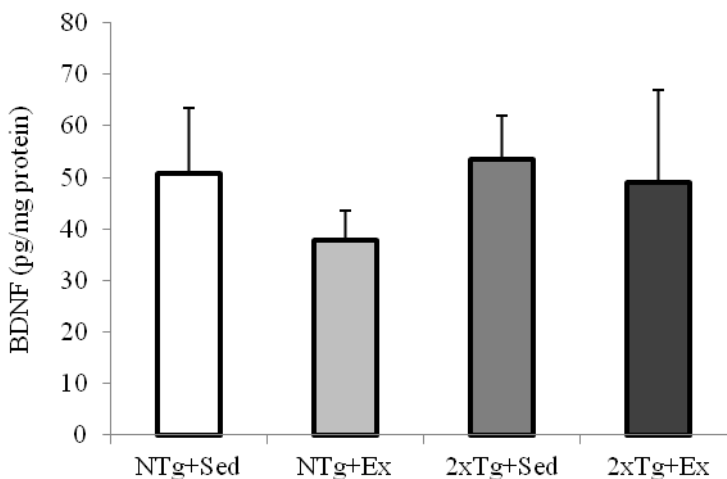


Figure IV.23. ELISA for BDNF in brain cortex homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, n=4), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, n=4), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, n=5), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, n=5). Values are presented as mean \pm SD.

Figure IV.24. Hippocampal BDNF levels by ELISA in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

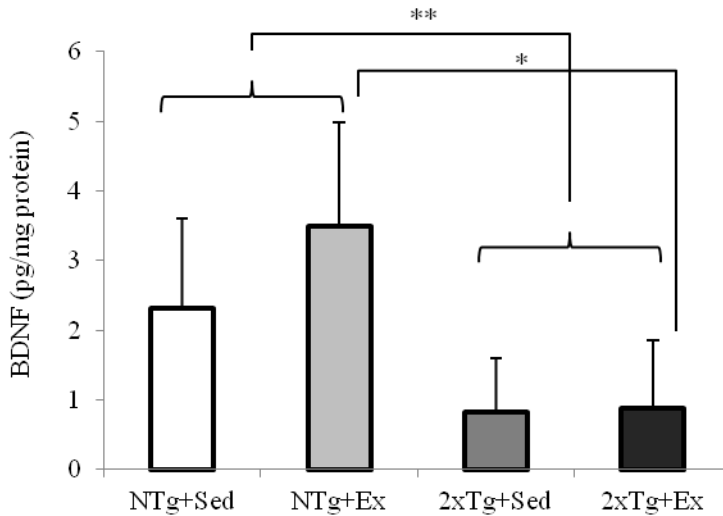


Figure IV.24. ELISA for BDNF in hippocampus homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, n=4), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, n=4), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, n=5), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, n=5). Values are presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Figure IV.25. Hippocampal CREB activation by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

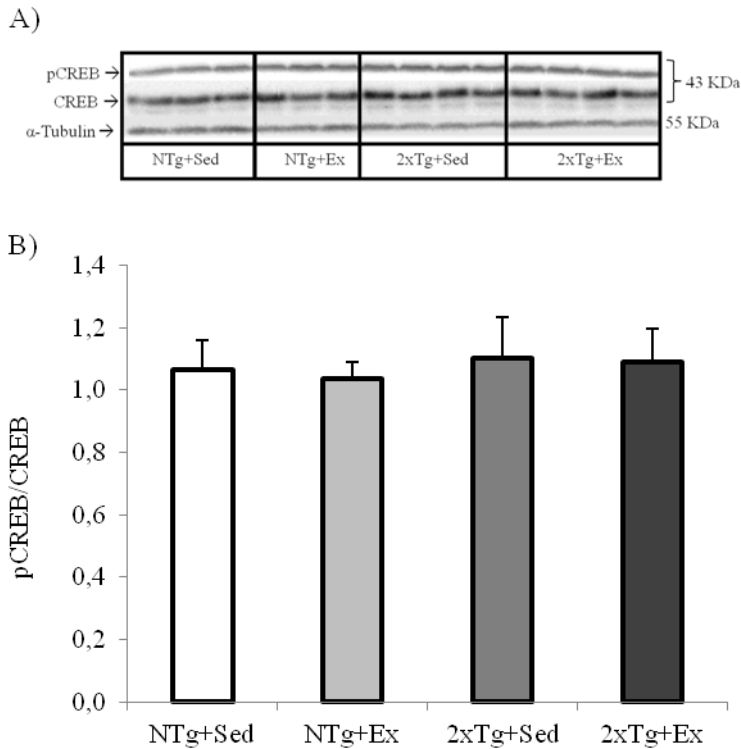


Figure IV.25. Western blotting for cAMP response element-binding protein (CREB) activation (pCREB/CREB) in hippocampus homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, n=4), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, n=4), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, n=5), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, n=5). A) Representative bands of CREB, pCREB and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD.

3.1.9. Brain cortex mitochondrial content and biogenesis of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

We studied the mitochondria content by Cyt-C, and its biogenesis by PGC-1 α in brain cortical tissue of all mice by Western blotting. As shows the **Figure IV.26** no differences were found in Cyt-C between any group. Alike, PGC-1 α did not change due to genotype or exercise training (**Figure IV.27**).

Figure IV.26. Brain cortex Cyt-C levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

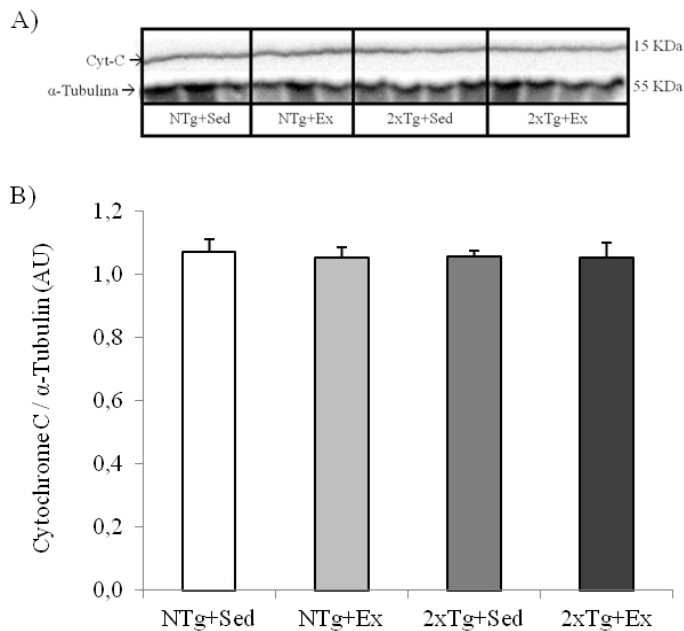


Figure IV.26. Western blotting for cytochrome-C (Cyt-C) in brain cortex homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, n=4), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, n=4), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, n=5), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, n=5). A) Representative bands of Cyt-C and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. AU (arbitrary units).

Figure IV.27. Brain cortex PGC-1 α levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

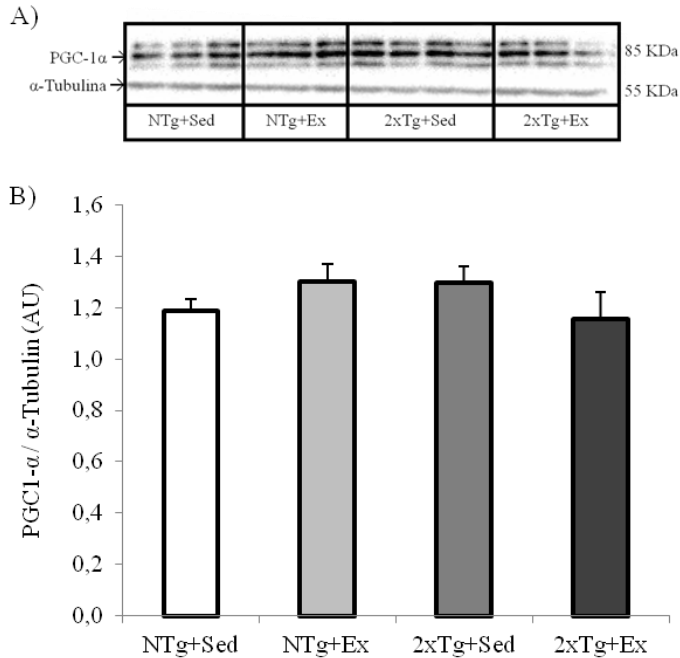


Figure IV.27. Western blotting for peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC)-1 α in brain cortex homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, n=4), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, n=4), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, n=5), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, n=5). A) Representative bands of PGC-1 α and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. AU (arbitrary units).

3.1.10. Brain cortex LRP1 levels of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

We analyzed the LRP1 in brain cortex and we found that exercise training decreased the levels in the NTg+Ex compared with NTg+Sed ($P < 0.05$). In

addition, genotype affect LRP1 showing lower levels the 2xTg+Sed mice compared with those in NTg+Sed mice ($P<0.05$) (**Figure IV.28**).

Figure IV.28. Brain cortex LRP1 levels by Western blotting in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

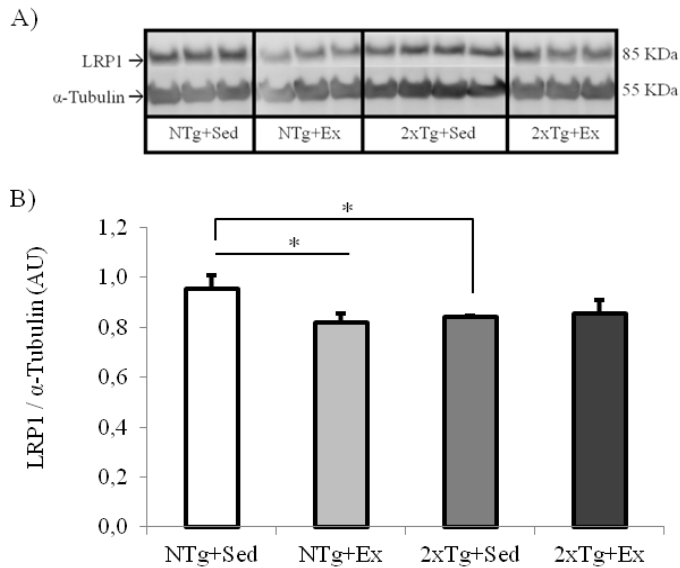


Figure IV.28. Western blotting for low density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) in brain cortex homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). A) Representative bands of LRP1 and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. AU (arbitrary units). $*P<0.05$.

3.1.11. Brain glucose uptake of the NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training.

Brain glucose uptake, measured by PET, showed no differences by exercise training. However, both 2xTg groups analyzed together showed higher standardized uptake value (SUV) levels than both NTg groups (**Figure IV.29**).

Figure IV.29. Brain glucose uptake by PET in NTg and 2xTg mice for Alzheimer's disease subjected to exercise training or rest.

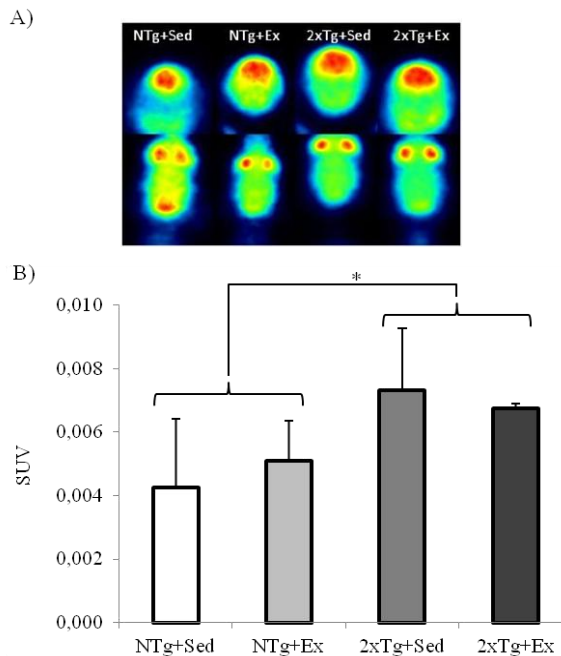


Figure IV.29. PET for brain glucose uptake of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=4$), double transgenic sedentary mice (2xTg+Sed, $n=5$), and double transgenic exercised mice (2xTg+Ex, $n=5$). A) Representative PET images of each group. B) Results of the PET analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$. SUV (Standardized Uptake Value).

3.2. Discussion.

During the last decades, a huge number of investigators have studied the potential therapeutic role of exercise training to counteract the neuropathophysiologic processes of the Alzheimer's disease (Radak *et al.* 2010). Midlife physical activity may contribute to brain health in later life (Rovio *et al.* 2005; Andel *et al.* 2008). Studies in mice have been developed through applying different exercise training designs (forced or voluntary) in different mouse strains (Adlard *et al.* 2005; Wolf *et al.* 2006; Nichol *et al.* 2007; Nichol *et al.* 2008; Parachikova *et al.* 2008; Nichol *et al.* 2009; Gimenez-Llort *et al.* 2010). Several authors have demonstrated that exercise has a systemic effect (Shing *et al.* 2007; Radak *et al.* 2008a) whereas a sedentary lifestyle is an important risk factor to suffer dementia (Middleton *et al.* 2008) including Alzheimer's disease (Cotman *et al.* 2007; Kivipelto & Solomon 2008; Larson 2008). Nowadays the mechanisms by which exercise helps to prevent or treat Alzheimer's disease remain unclear. The main pathways postulated include neprilysin (Radak *et al.* 2007; Maesako *et al.* 2012), IGF-1 (Carro *et al.* 2002), BDNF (Nagahara *et al.* 2009) and oxidative stress (Radak *et al.* 2008a; Radak *et al.* 2010) among others.

In this study we analyzed the protective effect of three months of physical exercise by means of forced and spontaneous running in a 2xTg model of Alzheimer's disease (APP/PSEN1). We used a combination of both types of training in order to subject to all exercised animals to a minimum intensity and duration of exercise (Lazarov *et al.* 2005; Um *et al.* 2008). The treatment was initiated at ten months old, when the pathophysiology of this model was already initiated (Jankowsky *et al.* 2004). We studied the brain function and the levels of selected markers of neuroprotection and brain plasticity.

Voluntary and forced exercise independently induces similar benefits on proliferation and synaptic plasticity pathways in the brain (Liu *et al.* 2009; Alomari

et al. 2013). We found that 2xTg mice ran higher distance and time than NTg mice. This running activity pattern has been described in previous studies with Alzheimer's disease transgenic models such as the 3xTg mice (Garcia-Mesa *et al.* 2011b) and TgCRND8, and justified by a stereotypic behavior presented as hyperactivity in Alzheimer models (Richter *et al.* 2008). Interestingly, although long-term exercise training has demonstrated to induce numerous benefits on brain function (van Praag *et al.* 2005; Radak *et al.* 2006; O'Callaghan *et al.* 2007), even short-term training is considered beneficial (Vaynman *et al.* 2004b; Vaynman *et al.* 2004a; Vaynman *et al.* 2007).

The physical performance, and more especially VO_{2max} , is an important predictor of death. An increment of 1 MET in the VO_{2max} improves 12% the survival in humans (Myers *et al.* 2002; Myers *et al.* 2004). We measured the maximal aerobic velocity, an indirect measure of VO_{2max} , and we found that 2xTg mice showed lower performance than the NTg at the beginning of the study. After the training period, those 2xTg exercised recovered the maximal aerobic velocity at NTg levels. However, the lack of significance between NTg exercised mice and the sedentary ones suggests that the training was enough to improve the worsened performance of 2xTg but not to enhance it in the healthy animals. These results are important taking into account the study of Buchman *et al.* in which they analyzed different parameters of frailty. They also examined neurite plaques and neurofibrillary tangles in 165 *post-mortem* brains and they concluded that frailty in older people is associate with the risk of suffer Alzheimer's disease (Buchman *et al.* 2008). On the other hand, we found that 2xTg mice lost grip strength over time and exercise training prevented it. This is an important finding since muscle strength and risk of Alzheimer and other dementia have been associated in older persons (Rogers & Jarrot 2008; Boyle *et al.* 2009; Gray *et al.* 2013).

The behavioral alterations in the Alzheimer's disease have been suggested to be caused due to the neuronal death and the hippocampal, cortical and amygdala

dysfunctions. These regions suffer synapses degeneration associated with the A β deposition (Selkoe 2000) as well as neurofibrillary tangles (Mattson 2004). In order to evaluate the behavioral and psychological symptoms of dementia we subjected to all mice to two different tests at the beginning and at the end of the experiment: the corner test and the open field test. These tests are designed to assess spontaneous motor activity and anxiety (Gimenez-Llort *et al.* 2007b).

In this study we did not find differences in any psychological variable between groups before the training period. After training we found that both trained groups, NTg and 2xTg, increased the number of corners explored in the corner test showing therefore less neophobia than the sedentary groups. In the same test we found that the NTg mice did more rearings than the 2xTg mice. Moreover, there was a trend of 2xTg trained mice to increase the rearing number when compared with their matched sedentary controls. It suggests that the NTg strain showed an increased curiosity behavior and that the exercise in 2xTg reverts partially the lack of exploratory behavior. The open field test examines the locomotor and explorative behavior of an animal placed into an unknown open arena (Fuss *et al.* 2010). The results achieved in this test showed a light worsened behavioral and psychological symptoms of dementia in the 2xTg and a partially prevention due to exercise training. 2xTg mice showed a neophobic behavior compared with the NTg mice that was reverted by exercise training. Moreover, exercise training led to an increase in exploration in 2xTg.

There are several controversial data showing how exercise decrease or has no effect on anxiety (Greenwood *et al.* 2003; Pietropaolo *et al.* 2006; Duman *et al.* 2008). The APPSwe and the Tg7526 transgenic mice of Alzheimer's disease have demonstrated hyperactivity through the open field test (King *et al.* 1999; King & Arendash 2002). Moreover, investigations by Greenwood *et al.* and Duman *et al.* demonstrated an anxiolytic effect of exercise training (Greenwood *et al.* 2003; Duman *et al.* 2008). According to our results, the 3xTg mice have also shown

similar behavioral phenotype (Gimenez-Llort *et al.* 2007a). In addition, the cognition of the 2xTg is worsened due to the A β deposition since it disrupts cognitive circuits related with memory (Savonenko *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2011). According to our findings, Ke *et al.* demonstrated in the 2xTg model that exercise training increased exploratory activity and reduced anxiety. It was associated with a reduction in A β levels (Ke *et al.* 2011). Interestingly, Alzheimer's patients have behavioral alterations such as a reduced curiosity and an increased apathy (Daffner *et al.* 1992). Moreover, apathy is one of the alterations hampered in the progression of the disease being considered as a critical symptom (Spalletta *et al.* 2004).

The complex association between metabolism (chiefly glucose, cholesterol and insulin) and Alzheimer's disease has been extensively studied (Nelson & Alkon 2005). Higher levels of cholesterol and insulin may affect the A β formation since cholesterol modulates the γ -secretase activity (Cole *et al.* 2005). Thus, hyperglycemia has been proposed as a risk factor of cognitive impairment and A β accumulation in transgenic models (Um *et al.* 2008). Paradoxically in our study, whereas the food intake, body weight and the cholesterolemia did not change over time in any group; we found a decrease in glycemia of the 2xTg mice over time. This result has been previously reported in other transgenic Alzheimer's disease models (Cho *et al.* 2003; Um *et al.* 2008).

The hippocampal A β (1-42) levels of 2xTg mice were reduced due to exercise. As we expected, NTg mice had no A β . The pathophysiological importance of A β has been related to mitochondrial dysfunction (Querfurth & LaFerla 2010), reactive oxygen species production (Pratico 2008; Vina & Lloret 2010), and synaptic alterations (Naylor *et al.* 2008) among others. Regular exercise decreases the incidence of Alzheimer's disease (Scarmeas *et al.* 2009). As stated by Radak *et al.*, despite the widely demonstrated modulation of neurotrophic factors and oxidative stress due to exercise, none of them directly cause A β accumulation (Radak *et al.* 2010). Exercise has demonstrated to reduce the A β (1-42) deposition in the

NSE/APPSwe-transgenic model (Um *et al.* 2008) and in the TgCRND8 model of Alzheimer's disease probably mediated by APP degradation (Adlard *et al.* 2005). In 3xTg mice we found that chronic exercise did not reduce the A β levels but reduce the C99/APP ratio, a biological indicator of the amyloidogenic pathway (Garcia-Mesa *et al.* 2014). Results reported in our same model, environmental enrichment (exercise included) increased neprilysin activity (an A β -degrading endopeptidase), thereby leading to a reduction of A β (1-42) deposition (Lazarov *et al.* 2005). In contrast to our study, Jankowsky *et al.* reported that environmental enrichment enhanced A β deposition in the 2xTg strain (Jankowsky *et al.* 2003). However, this can be explained by the several critical dissimilarities including sex differences and a diverse running wheels/mice ratio between the studies. The 8:1 ratio of Jankowsky *et al.* study is significantly higher compared with the ratio used in our study, 1:1, and the 2:1 ratio in the Lazarov *et al.* one (Jankowsky *et al.* 2003; Lazarov *et al.* 2005). It is well known that this situation generates hierarchical competition and stress for access to wheels, potentially blunting the salutary effects of enrichment (Lazarov *et al.* 2005). Other study by Ke *et al.* reported that non-shock treadmill exercise in the 2xTg model reduced A β levels but not the plaque loading in the hippocampus (Ke *et al.* 2011).

There is mounting evidence demonstrating a high oxidative damage in the brain of Alzheimer's disease patients (Balazs & Leon 1994; Lovell *et al.* 1995; Markesbery 1997; Sayre *et al.* 1997; Ramassamy *et al.* 1999). Reactive oxygen species production is associated with A β and neurofibrillary tangles deposition (Vitek *et al.* 1994; Smith *et al.* 1996). These evidences have been also described in different transgenic models for Alzheimer's disease (Li *et al.* 2004; Schuessel *et al.* 2005; Esposito *et al.* 2006; Dumont *et al.* 2009; Gimenez-Llort *et al.* 2010; Xu *et al.* 2013). All these findings are against to our results that indicate an overall slightly reduced status in the 2xTg mice. The endogenous antioxidant defense was measured to analyze the possible effect of genotype and exercise training on the

compensatory mechanisms to oxidative stress produced by A β accumulation (Lloret *et al.* 2008; Radak *et al.* 2008a). 2xTg demonstrated higher levels of cortical CAT and blood GSH, which leads to a reduced GSSG/GSH ratio. Glutathione metabolism is altered in the Alzheimer's disease since the analysis of patient brains showed increased levels of GPx (Brigelius-Flohe 1999). We also found lower levels of cortical carbonylated proteins; and no changes in cortical Mn-SOD, Cu/Zn-SOD and MDA.

On the other hand, exercise therapy affects to the antioxidant enzymes increasing the levels of cortical CAT in 2xTg and Mn-SOD in NTg mice. According to these findings, exercise has demonstrated to exert an antioxidant effects at systemic level (Gomez-Cabrera *et al.* 2008) and mainly in the brain (Radak *et al.* 2008a; Radak *et al.* 2014). The increased levels of brain antioxidant enzyme levels or activity due to exercise training have been previously described (Somani & Husain 1996; Radak *et al.* 2001a; Radak *et al.* 2001b; Devi & Kiran 2004) and recently reviewed by Radak *et al.* (Radak *et al.* 2014). We hypothesize that the higher levels of CAT found in the 2xTg, but not in NTg, are caused as response to the oxidative stress due to A β added to those produced by exercise, i.e., through a hormetic adaptation (Radak *et al.* 2008b). It could partially explain also the lower levels of protein oxidation of 2xTg mice. The rodent brain reductive effect of exercise has been studied by several authors (Radak *et al.* 2001a; Radak *et al.* 2001b; Ogonovszky *et al.* 2005; Gimenez-Llort *et al.* 2010; Radak *et al.* 2010). The "reductive stress" occurred due to the Alzheimer's pathology has been described by our research group in humans (Badia *et al.* 2013). Schuessel *et al.* used two transgenic models for Alzheimer's disease (PDGF-APP695(SDL) and Thy1-APP751(SL)) to analyze the antioxidant defense through Cu/Zn-SOD levels and concluded that a lower activity of this antioxidant enzyme leads to a higher oxidative stress that carry out, in turn, to a higher formation of A β (Schuessel *et al.* 2005).

The vast majority of studies describe lower BDNF levels in patients with Alzheimer's disease (Holtzman & Mobley 1994; Connor *et al.* 1997; Nagahara *et al.* 2009; Weinstein *et al.* 2014) whereas few studies do not find differences (O'Bryant *et al.* 2009). In this study we measured the brain cortex and hippocampal BDNF levels. We found no differences between the experimental groups in the cortical tissue. However, the hippocampal BDNF was lower in 2xTg mice compared with NTg. The lack of changes in cortical BDNF levels is supported by human investigations in which *post-mortem* brain cortex tissue of Alzheimer's patients did not show differences in the BDNF expression and amount of protein compared with healthy patients (Hock *et al.* 1998; Hock *et al.* 2000; Savaskan *et al.* 2000). An explanation is that the A β toxicity is associated to lower levels of BDNF in the hippocampus of different transgenic models for Alzheimer's disease (Phillips *et al.* 1991; Connor *et al.* 1997; Hock *et al.* 2000; Devi & Ohno 2012) including our 2xTg strain (Peng *et al.* 2009).

In our study we found a trend to increase the BDNF levels in NTg exercised mice compared with its sedentary controls. The lack of significance could be explained by the stress caused by the forced training (Chourbaji *et al.* 2011). Most of the studies that report an increase of BDNF after exercise used only voluntary running (Vaynman *et al.* 2004b; Vaynman *et al.* 2004a; Ploughman *et al.* 2005; Gomez-Pinilla *et al.* 2008). This explanation is supported also by our results in the study with 3xTg mice in which voluntary running increased the BDNF levels (see next section).

In a recent systematic review, Coelho *et al.* studied how physical exercise modulates BDNF levels in the elderly. They found a significant increase in BDNF levels even after an acute bout of exercise both in healthy and in Alzheimer's disease old individuals (Coelho *et al.* 2013; Coelho *et al.* 2014).

Our results are supported by other investigations in which Alzheimer patient's brains showed decreased levels of BDNF that contribute to the brain atrophy and cognitive dysfunctions (Holsinger *et al.* 2000). Furthermore, there is a decrease in peripheral BDNF with aging and Alzheimer's disease, and plasma levels of this neurotrophic factor are proposed as a biomarker for impaired memory and general cognitive function in ageing women (Komulainen *et al.* 2008). As previously mentioned, BDNF levels are also decreased in behavioral and psychological symptoms of dementia, such as depression and anxiety, and BDNF may be a target of antidepressant treatments (Martinowich *et al.* 2007).

The transcription factor CREB is the responsible for the neurotrophic actions of BDNF (Vaynman *et al.* 2003; Carlezon *et al.* 2005). The study of the CREB activation is based on its phosphorylated levels. We found no effect of Alzheimer-like phenotype of treatment with exercise between any experimental group. The lack of effect of exercise on CREB activation can be explained by the lack of effect of the treatment on hippocampal BDNF levels. CREB activation is responsible for the PGC-1 α induction in neurons (Cheng *et al.* 2012) and it can be the reason for the no effect on mitochondrial biogenesis and content. CREB activation mediates synaptic plasticity (Barco & Marie 2011) and memory related proteins (Yin *et al.* 1995; Carlezon *et al.* 2005). In Alzheimer's disease CREB has been suggested to be a main responsible for the memory fails (Wang & Bibb 2011). A β peptide alters hippocampal-dependent synaptic plasticity and memory and mediates synapse loss through the CREB signaling pathway (Saura & Valero 2011). This event has been also demonstrated *in vitro* treating neurons with A β (Tong *et al.* 2001; Pugazhenthii *et al.* 2011).

In order to study the down-regulation of brain A β -42 due to physical exercise, we evaluated the brain levels of *LRP1*. LRP1 is a receptor implicated on the transport of several proteins including A β and apoE across the blood brain barrier to the liver (Sagare *et al.* 2012). Our results indicate that 2xTg sedentary mice have lower

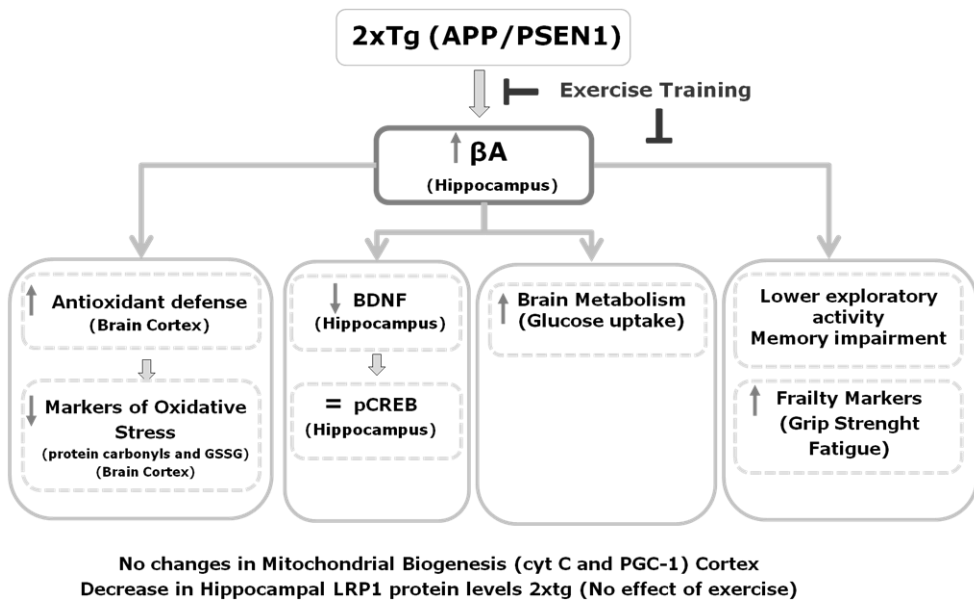
levels than the control group and that exercise decreased LRP1 in the NTg mice. However, exercise did not exert any effect in the 2xTg mice. To our knowledge this is the first study that investigates the effect of exercise on the LRP1 levels.

At baseline the level of cerebral glucose metabolism is considered as a reliable index of neural activity (Petit-Taboue *et al.* 1998). Cerebral glucose metabolism, measured by PET, is one of the most sensitive functional biomarkers of Alzheimer's disease (Silverman *et al.* 2001; Herholz *et al.* 2007). Alzheimer's disease patients display early and progressive reductions of glucose metabolism in cortical and hippocampal regions (Nestor *et al.* 2004; Mosconi *et al.* 2005).

In this study we found that 2xTg mice have higher brain glucose uptake measured by PET compared with the NTg mice. This finding is supported by other studies with Alzheimer's transgenic models. A brain hypermetabolism in 7- and 19-month-old APP(Tg2576) mice has been described (Luo *et al.* 2012). Poisnel *et al.* described a higher [18F]-FDG uptake in the cortex and the hippocampus of 12-month-old 2xTg mice. They also evaluated glucose uptake at the level of A β plaques and showed an increased glucose uptake close to the plaques rather than in amyloid-free cerebral tissues (Poisnel *et al.* 2012). These results are in contrast to the normal hypometabolism found in Alzheimer's patients (Mosconi *et al.* 2005). A reorganization of glucose uptake in the vicinity of A β plaques could explain this contradiction finding (Poisnel *et al.* 2012). Accordingly, in prodromal stages of Alzheimer's disease, an increased cerebral metabolism (Cohen *et al.* 2009) or a reorganization of brain metabolism (Vlassenko *et al.* 2010) have recently been described. Moreover, perturbations of the brain vascular regulation, leading to altered cerebral blood flow in different transgenic models have also been reported (Niwa *et al.* 2002; Meyer *et al.* 2008; Bell & Zlokovic 2009). Several studies have also shown enhanced cerebral metabolism in the cortex, the hippocampus, and the striatum of transgenic mouse models of Alzheimer's disease, including the 2xTg strain (Reiman *et al.* 2000; Valla *et al.* 2006; Valla *et al.* 2008)

Figure IV.30 summarizes the results found in this study. Briefly, the 2xTg phenotype leads to an increased A β levels which might modulate a “reduced status”, a decrease of BDNF, an elevated brain metabolism, and altered behavioral profile. Exercise reverses the behavioral disorders as well as the final consequence of the genotype, the A β accumulation.

Figure IV.30. Holistic representation of the results found in the *Objective 3*.



4. Study of the effects of voluntary physical exercise (12 weeks) on neurobiological variables related to oxidative stress, mitochondriogenesis, neurotrophic and pathophysiological pathways in a 3xTg model of Alzheimer's disease subjected to ovariectomy, and their respective controls (Objective 4).

A group of triple transgenic (3xTg) and wild types (NTg, non transgenic), aged 4 months, were randomly divided into two groups: ovariectomized (Ov) or subjected to a simulated surgery (S, sham-operated). When mice aged 6 months were subdivided into two groups: exercise (Ex) and sedentary (Sed). The intervention was maintained for 12 additional weeks. A total of eight groups were analyzed:

- Non transgenic sham exercised (NTgS+Ex)
- Non transgenic ovariectomized exercised (NTgOv+Ex)
- Triple transgenic sham exercised (TgS+Ex)
- Triple transgenic ovariectomized exercised (TgOv+Ex)
- Non transgenic sham sedentary (NTgS+Sed)
- Non transgenic ovariectomized sedentary (NTgOv+ Sed)
- Triple transgenic sham sedentary (TgS+ Sed)
- Triple transgenic ovariectomized sedentary (TgOv+ Sed)

4.1. Results.

4.1.1. Brain cortex A β (1-40 and 1-42) and C99/APP levels in the NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

The levels of soluble A β (1-40) were higher in all 3xTg groups compared with NTg mice ($P < 0.001$ in all cases) but showed no statistical differences between the diverse 3xTg groups (**Figure IV.31**). The A β (1-42) levels also showed no differences between the diverse 3xTg groups whereas all of them showed higher levels than the NTg mice ($P < 0.01$ for 3xTgS+Sed group and $P < 0.01$ for the rest of groups) (**Figure IV.32**). Finally, the C99/APP ratio showed an increase in 3xTg sedentary mice, sham and ovariectomized, compared with NTgS+Sed ($P < 0.05$). Exercise training exerted a protective effect in both cases. (**Figure IV.33**).

Figure IV.31. Brain cortex A β (1-40) levels by ELISA in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

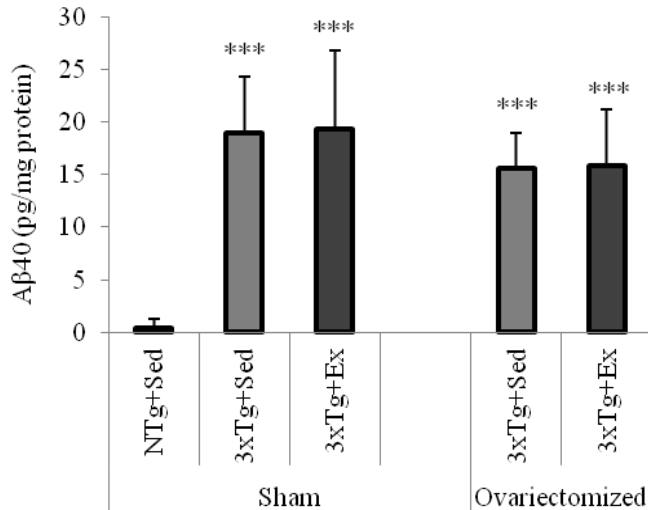


Figure IV.31. ELISA for amyloid- β (A β) (1-40) in cerebral cortical tissue homogenates of non transgenic sham-operated sedentary mice (NTg+Sed, $n=6$), triple transgenic sham-operated mice (sedentary, 3xTg+Sed, $n=8$; and exercised, 3xTg+Ex, $n=7$), and triple transgenic ovariectomized mice (sedentary, 3xTg+Sed, $n=7$; and exercised, 3xTg+Ex, $n=5$). Values are presented as mean \pm SD. *** $P < 0.001$ compared with NTg+Sed.

Figure IV.32. Brain cortex A β (1-42) levels by ELISA in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

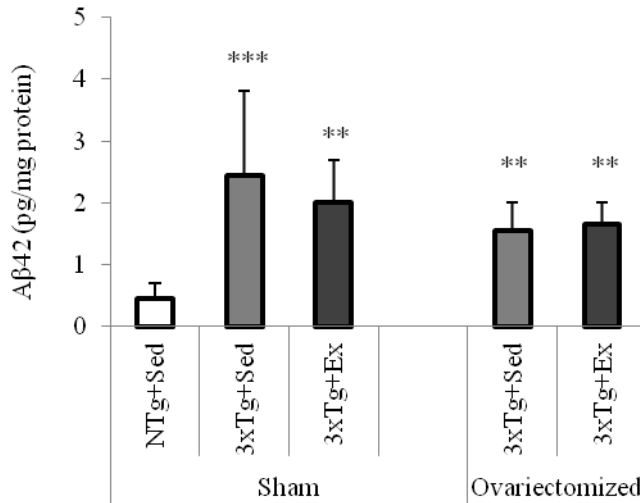


Figure IV.32. ELISA for amyloid- β (A β) (1-42) in cerebral cortical tissue homogenates of non transgenic sham-operated sedentary mice (NTg+Sed, n=6), triple transgenic sham-operated mice (sedentary, 3xTg+Sed, n=8; and exercised, 3xTg+Ex, n=7), and triple transgenic ovariectomized mice (sedentary, 3xTg+Sed, n=7; and exercised, 3xTg+Ex, n=5). Values are presented as mean \pm SD. ** P <0.01; *** P <0.001 compared with NTg+Sed.

Figure IV.33. Brain cortex C99/APP levels by Western blotting in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

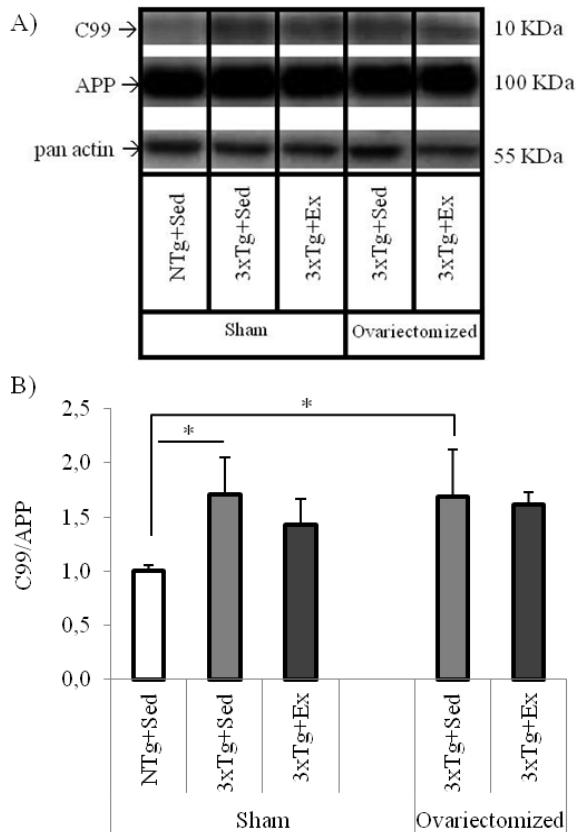


Figure IV.33. Western blotting for amyloid- β ($A\beta$) precursor protein carboxyl-terminal fragment C99 (C99/APP) in cerebral cortical tissue homogenates of non transgenic sham-operated sedentary mice (NTg+Sed, $n=4$), triple transgenic sham-operated mice (sedentary, 3xTg+Sed, $n=4$; and exercised, 3xTg+Ex, $n=4$), and triple transgenic ovariectomized mice (sedentary, 3xTg+Sed, $n=4$; and exercised, 3xTg+Ex, $n=4$). A) Representative bands of C99, APP and pan actin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. * $P<0.05$.

4.1.2. Brain cortex hiperphosphorylated tau levels of the NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

The hiperphosphorylated tau (p-tau) (Ser202/Thr205) levels did not change between the diverse groups because the high variability obtained in the cerebral cortex of the different experimental mice groups (**Figure IV.34**).

Figure IV.34. Brain cortex p-tau levels by Western blotting in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

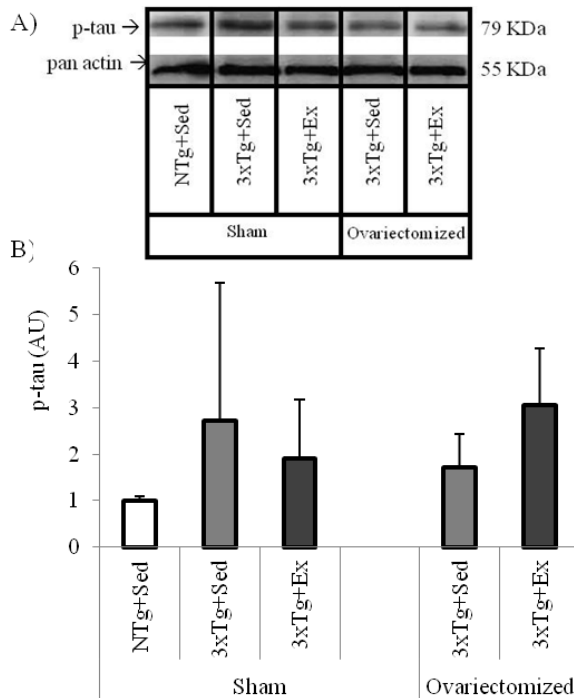


Figure IV.34. Western blotting for anti-hyperphosphorylated tau clone AT8 (p-tau) in cerebral cortex tissue homogenates of non transgenic sham-operated sedentary mice (NTg+Sed, n=4), triple transgenic sham-operated mice (sedentary, 3xTg+Sed, n=4; and exercised, 3xTg+Ex, n=4), and triple transgenic ovariectomized mice (sedentary, 3xTg+Sed, n=4; and exercised, 3xTg+Ex, n=4). A) Representative bands of p-tau (Ser202/Thr205) and pan actin (as housekeeping

protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. AU (arbitrary units).

4.1.3. Hippocampal BDNF levels and its signaling-related proteins in the NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

We studied the BDNF levels in the hippocampus as well as its signaling through the analysis of its specific receptor, TrkB, and the activation of the transcription factor mediated by BDNF, CREB. The results shown that BDNF levels, obtained by ELISA, increased in response to exercise training in both, in sham-operated and ovariectomized 3xTg groups ($P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively). The increase in BDNF levels found in the NTgOv+Ex mice did not reach significance. There were no effects of ovariectomy neither in the exercised nor in the NTg groups (**Figure IV.35**). On the other hand, protein levels of TrkB determined by Western blotting showed no consistent differences induced by ovariectomy or exercise training. There exists a tendency of towards lower TrkB in the diverse groups of 3xTg mice than in the NTg mice but it is not significant (**Figure IV.36**). The results obtained for the CREB activation (pCREB/CREB) showed that exercise training induced an increase of this transcription factor activation in the sham-operated mice, NTgS+Ex ($P < 0.05$) and 3xTgS+Ex ($P < 0.05$) with their respective homologous sedentary, but not in the ovariectomized ones (**Figure IV.37**).

Figure IV.35. Hippocampal BDNF levels by ELISA in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

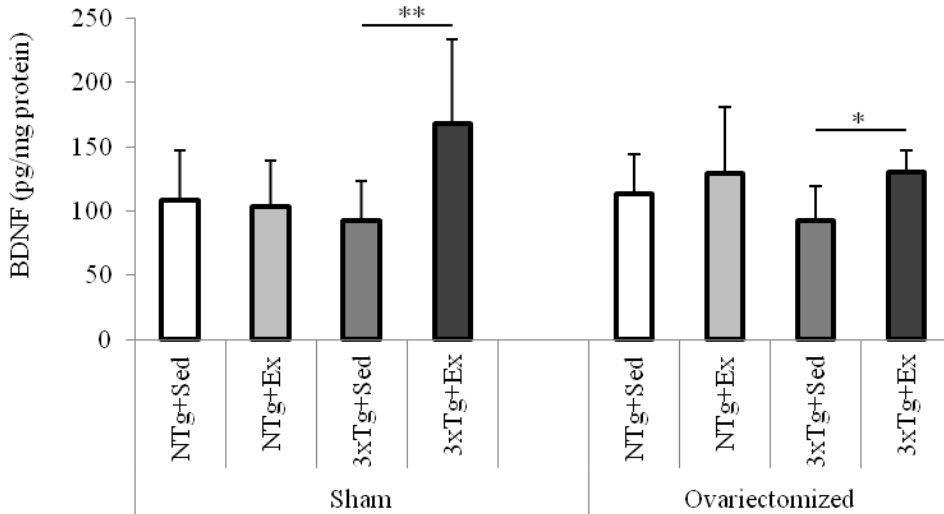


Figure IV.35. ELISA for BDNF in hippocampus homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=6$ in sham-operated and in ovariectomized animals), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), triple transgenic sedentary mice (3xTg+Sed, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), and triple transgenic exercised mice (3xTg+Ex, $n=7$ in sham-operated and $n=5$ in ovariectomized animals). Values are presented as mean \pm SD. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

Figure IV.36. Hippocampal TrkB levels by Western blotting in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

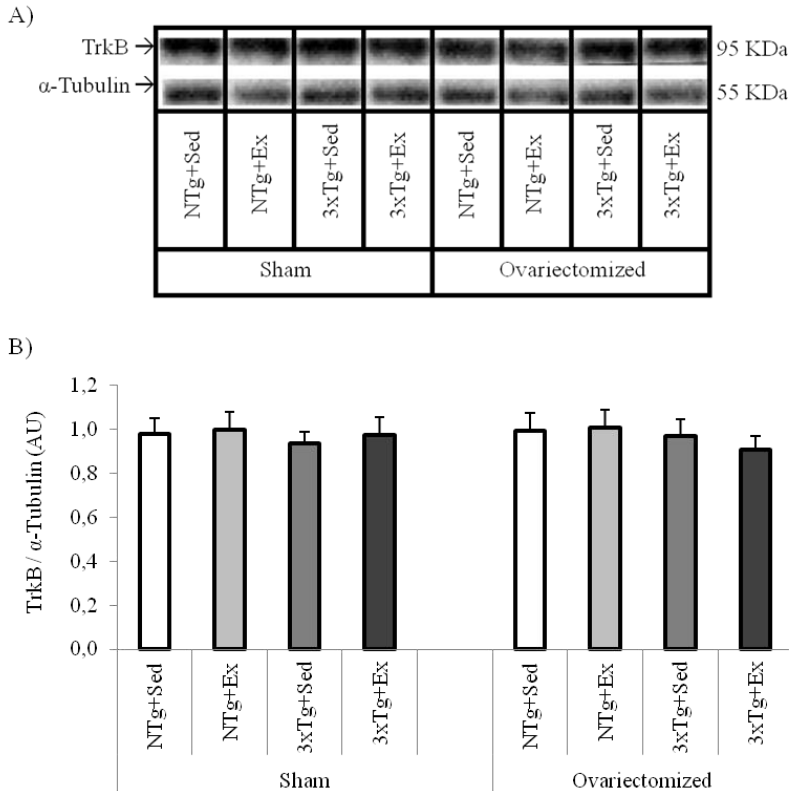


Figure IV.36. Western blotting for tyrosine kinase B (TrkB) in hippocampus homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=6$ in sham-operated and in ovariectomized animals), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), triple transgenic sedentary mice (3xTg+Sed, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), and triple transgenic exercised mice (3xTg+Ex, $n=7$ in sham-operated and $n=5$ in ovariectomized animals). A) Representative bands of TrkB and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. AU (arbitrary units).

Figure IV.37. Hippocampal CREB activation by Western blotting in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

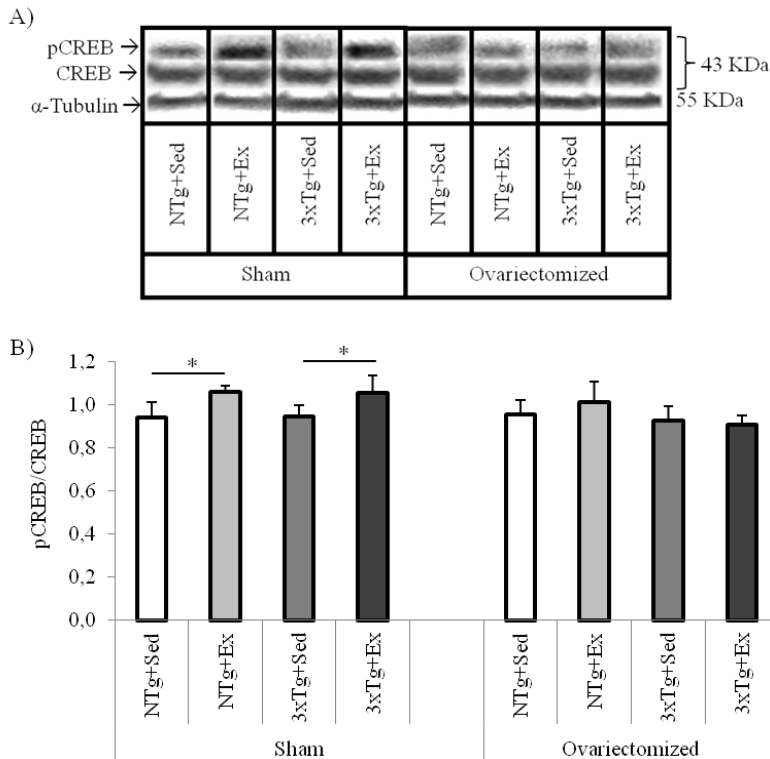


Figure IV.37. Western blotting for cAMP response element-binding protein (CREB) activation (pCREB/CREB) in hippocampus homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=6$ in sham-operated and in ovariectomized animals), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), triple transgenic sedentary mice (3xTg+Sed, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), and triple transgenic exercised mice (3xTg+Ex, $n=7$ in sham-operated and $n=5$ in ovariectomized animals). A) Representative bands of CREB, pCREB and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. * $P<0.05$.

4.1.4. Hippocampal mitochondrial biogenesis of the NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

The analysis of PGC-1 α showed a different response to exercise training between sham-operated and ovariectomized mice and between NTg and 3xTg mice. Only NTgS+Ex mice showed a slight but statistically significant increase in PGC-1 α after the exercise protocol ($P < 0.05$) (**Figure IV.38**). Correlation studies showed that PGC-1 α , CREB activation and TrkB were inter-correlated (all Pearson correlations: $r > 0.549$, $P < 0.001$, $n = 41$).

Figure IV.38. Hippocampal PGC-1 α levels by Western blotting in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

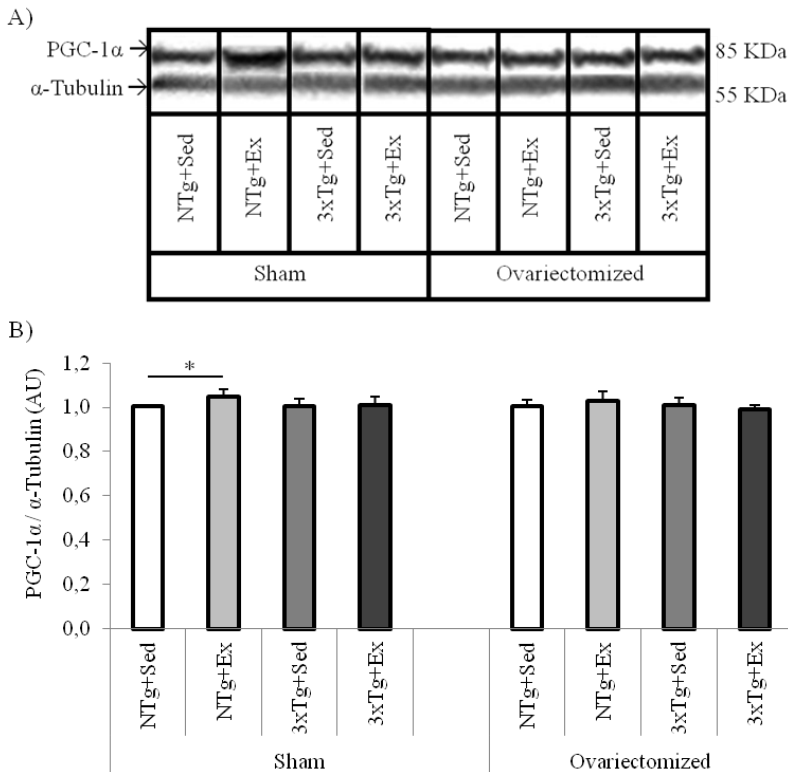


Figure IV.38. Western blotting for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator (PGC)-1 α in hippocampus homogenates of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=6$ in sham-operated and in ovariectomized animals), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), triple transgenic sedentary mice (3xTg+Sed, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), and triple transgenic exercised mice (3xTg+Ex, $n=7$ in sham-operated and $n=5$ in ovariectomized animals). A) Representative bands of PGC-1 α and α -tubulin (as housekeeping protein marker). B) Results of the Western blotting analyzed by densitometry and represented by histogram. Values are presented as mean \pm SD. AU (arbitrary units).

4.1.5. Hippocampal mRNA expression of antioxidant enzymes in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

We studied the mRNA expression of the antioxidant enzymes CAT, GPx, and Mn-SOD. 3xTgS mice showed significant increase in CAT mRNA levels compared to its respective controls NTg mice ($P < 0.01$ for 3xTgS+Sed vs. NTgS+Sed and $P < 0.05$ for 2xTgS+Ex vs. NTgS+Ex) but no effect due to exercise training. These changes were partially abolished in the ovariectomized group since 3xTgOv+Sed mice showed lower levels than 3xTgS+Sed mice ($P < 0.01$). However, in ovariectomized mice we found that exercise training increased the CAT levels in the 3xTgOv+Ex compared with 3xTgOv+Sed ($P < 0.05$) (**Figure IV.39**). Analysis of the mRNA levels of GPx (**Figure IV.40**) and Mn-SOD (**Figure IV.41**) indicated a lack of effect of ovariectomy in the induction of both enzymes. No statistical differences were detected between the diverse treatment groups. However, both enzymes showed the same pattern of changes and were found to be functionally related (Pearson correlation coefficient, $r = 0.472$, $P < 0.001$). GPx and Mn-SOD showed a tendency towards lower gene expression values in the 3xTg group, which increased to control values in the exercised 3xTg group, and a tendency towards decreased expression in the exercised NTg animals.

Figure IV.39. Hippocampal CAT mRNA levels by RT-PCR in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

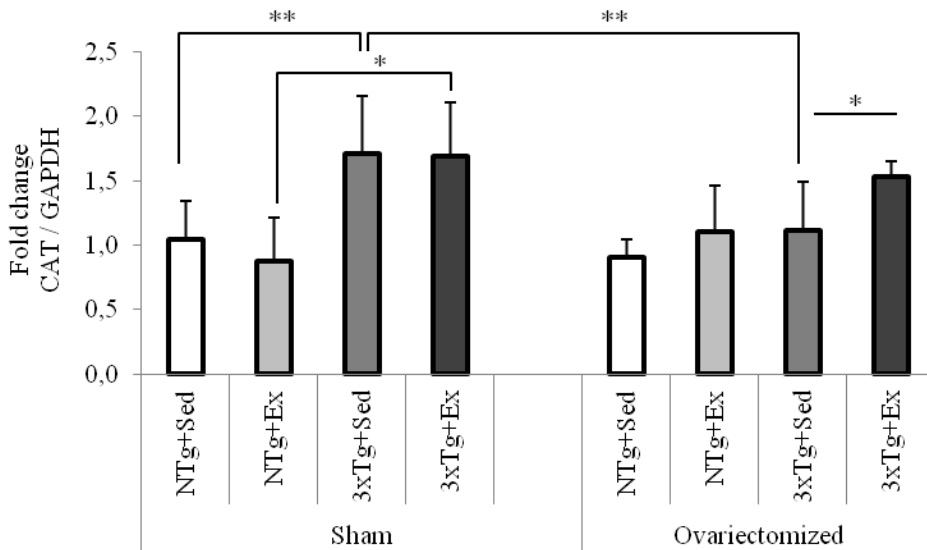


Figure IV.39. PCR for catalase (CAT) mRNA in hippocampus mRNA of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=6$ in sham-operated and in ovariectomized animals), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), triple transgenic sedentary mice (3xTg+Sed, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), and triple transgenic exercised mice (3xTg+Ex, $n=7$ in sham-operated and $n=5$ in ovariectomized animals). GAPDH mRNA was determined as a housekeeping gene. Values are presented as mean \pm SD. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

Figure IV.40. Hippocampal GPx mRNA levels by RT-PCR in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

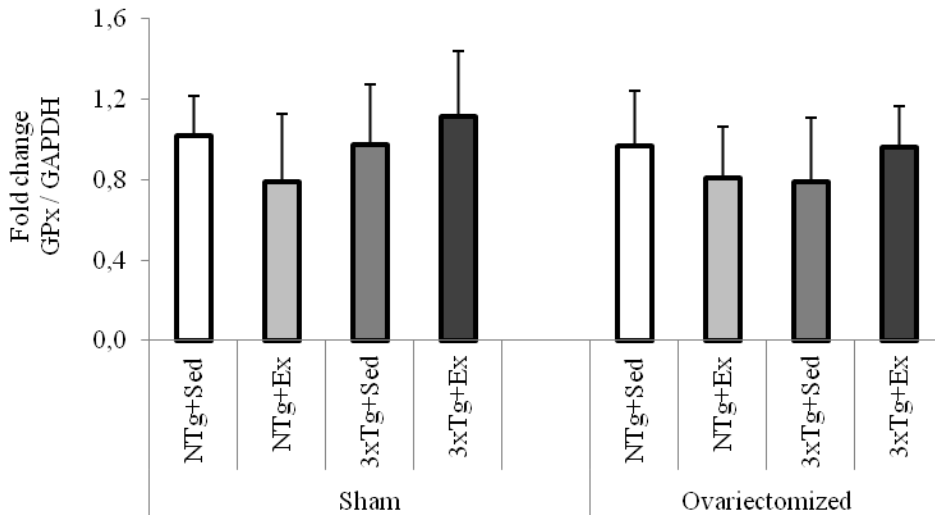


Figure IV.40. PCR for glutathione peroxidase (GPx) mRNA in hippocampus mRNA of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=6$ in sham-operated and in ovariectomized animals), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), triple transgenic sedentary mice (3xTg+Sed, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), and triple transgenic exercised mice (3xTg+Ex, $n=7$ in sham-operated and $n=5$ in ovariectomized animals). GAPDH mRNA was determined as a housekeeping gene. Values are presented as mean \pm SD.

Figure IV.41. Hippocampal Mn-SOD mRNA levels by RT-PCR in NTg and 3xTg mice for Alzheimer's disease ovariectomized and subjected to exercise training.

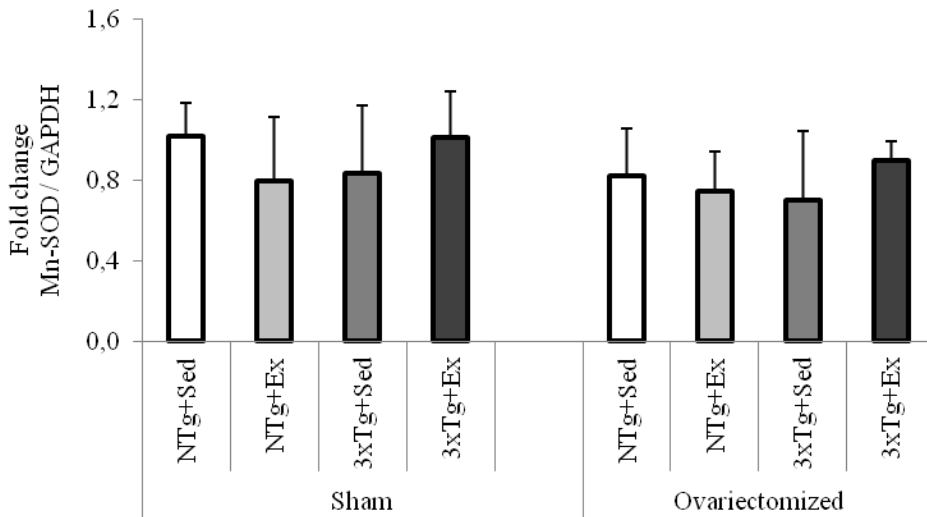


Figure IV.41. PCR for Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) mRNA in hippocampus mRNA of non transgenic sedentary mice (NTg+Sed, $n=6$ in sham-operated and in ovariectomized animals), non transgenic exercised mice (NTg+Ex, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), triple transgenic sedentary mice (3xTg+Sed, $n=8$ in sham-operated and $n=7$ in ovariectomized animals), and triple transgenic exercised mice (3xTg+Ex, $n=7$ in sham-operated and $n=5$ in ovariectomized animals). GAPDH mRNA was determined as a housekeeping gene. Values are presented as mean \pm SD.

4.2. Discussion.

In this study we aimed to investigate the effects of voluntary physical exercise therapy along a progressive neurodegeneration in 3xTg ovariectomized mice. For this purpose, we submitted mice to three months of exercise training by way of free access to a running wheel whereas sedentary groups were not trained. We studied the mechanisms underlying physical exercise-mediated neuroprotection in ovariectomized and sham-operated NTg and 3xTg mice. This was done by way of characterizing brain pathology, and the levels of selected markers of neuroprotection and plasticity in the hippocampus and brain cortex.

The experimental design of this investigation was performed in collaboration with the research group headed by the Dr. Sanfeliu (Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona –IIBB) and it has been partially included in the doctoral thesis presented by Yoelvis Garcia-Mesa (Garcia-Mesa *et al.* 2011a). Since Garcia-Mesa described the brain functional changes induced by the exercise training in the same animals (behavioral and cognitive), we have not included this data as original results in the present doctoral thesis. However, in the discussion of our results we will briefly describe and discuss these functional changes in order to support the biological and physiological findings described in the present thesis.

We found that 3xTg mice showed a pattern of running activity similar to that seen in previous studies with younger female mice of the same 3xTg strains (Garcia-Mesa *et al.* 2011b), with 3xTg mice being more active than NTg ones (data not shown). This pattern have been described in other transgenic mice such as TgCRND8 (Richter *et al.* 2008) and 2xTg (Pareja-Galeano *et al.* 2012) as we have discussed previously. Ovariectomy induced a decrease in running activity in both strains, which concurs with previous results in rats (Berchtold *et al.* 2001). This reduced physical activity paralleled a decrease in muscular force demonstrated through the grip strength test which was significantly lower in 3xTg mice. In

addition, ovariectomy generally reduced body weight. The increase of white abdominal fat (WAT) after ovariectomy was more important in NTg sedentary mice than those exercised and 3xTg ones. Ovariectomized animals had clearly reduced uterine weights, which is indicative of the deficiency in ovarian hormones (Garcia-Mesa *et al.* 2014). Thus, ovariectomy induced changes that indicate a lower fitness level of the animals in the control NTg group. Fewer changes were induced in the ovariectomized 3xTg animals than in the NTg group, due to the fact that 3xTg genes were already inducing a low-fitness phenotype. The combination of increased weakness (grip strength), decreased physical activity (running) and weight loss (Garcia-Mesa *et al.* 2014) fulfilled the criteria for frailty in the ovariectomized mice, and the frailty status is associated with dementia (Gray *et al.* 2013). However, physical exercise maintained a moderate level of body fitness and prevented the mice from entering into a state of frailty induced by ovariectomy surgery and 3xTg genes (Garcia-Mesa *et al.* 2014). A decrease in peripheral risk factors through exercise contributes to maintaining brain health (Cotman *et al.* 2007). Accordingly, a positive association between fitness and cognitive function was reported in postmenopausal and older women (Kerwin *et al.* 2010).

According to our results, A β and tau pathology were not significantly reduced by physical exercise in either sham-operated or ovariectomized 3xTg mice. We did not find an exacerbation of the A β and p-tau parameters by ovariectomy, as has been reported by other authors in this mouse model at the younger age of 6 months (Carroll *et al.* 2010; Yao *et al.* 2012). There was not a decrease of both A β forms (1-40) and (1-42) due to exercise training in contrast to the investigation performed with 2xTg mice and exposed previously in which exercise reduced A β (1-42) levels. However, increased levels of the fragment C99 in both sedentary 3xTg mice, ovariectomized and sham, indicated a reduced activity of the amyloidogenic pathway following exercise. C99 has been described as the most important catabolite of APP in the 3xTg mouse model and the initiator of its cognitive

alterations (Lauritzen *et al.* 2012). This result corroborates the protection against A β pathology seen in 12-month-old male 3xTg mice after 6 months of exercise (Garcia-Mesa *et al.* 2012) and in other strains such as 2xTg. With respect to tau pathology, protection through physical exercise was not conclusive due to the variability in phosphorylated tau levels that was found in the cerebral cortex. Therefore, the protective effects of exercise in these mice were apparently unrelated to A β accumulation and tau phosphorylation-induced pathology and would be mainly triggered by pro-survival pathways involving antioxidant signaling and neurotrophic factors. Estradiol was reported to rescue cultured neurons from A β toxicity by preventing oxidative stress (Vallés *et al.*, 2008).

In elderly humans, an increase in BDNF peripheral levels in plasma after different physical exercise training programs was associated with an improvement of cognitive functions, in both cognitively healthy and mildly impaired elders (Coelho *et al.* 2013). Effects of exercise differed among brain areas, with the hippocampus being the most robust. Moderate-intensity aerobic exercise, which appears the most effective exercise training to increase cognitive functions, is able to reverse age-related hippocampal volume loss and to improve memory function in late adulthood (Erickson *et al.* 2010). The increase in hippocampal size by way of exercise was detected in the anterior hippocampus that would lead to the improvement seen in spatial memory. This clinical study also demonstrated an association between the increase in hippocampal volume and greater serum levels of BDNF (Erickson *et al.* 2010). Experimental studies in rodents have shown that the brain levels of BDNF increase with physical exercise in a more robust way in the hippocampus, and have suggested that BDNF works in concert with IGF-1 to mediate the effects of exercise on hippocampal plasticity and learning (Cotman *et al.* 2007; Llorens-Martin *et al.* 2008). Neurogenesis is another potential candidate for the brain functional improvement induced by exercise (van Praag *et al.* 1999; van Praag *et al.* 2005). In humans, increasing BDNF through aerobic exercise was

reported to ameliorate age-related hippocampal atrophy and memory dysfunction and reduce depression (Erickson *et al.* 2012). In our study a two-way ANOVA showed that BDNF levels were generally increased by exercise, in 3xTg and ovariectomized mice (Garcia-Mesa *et al.* 2014). However, as we described in the results section, BDNF increased significantly only in 3xTg groups subjected to exercise training, sham-operated and ovariectomized. NTg mice showed an unexpected lack of response. Moreover we did not find a significant decrease of BDNF in the hippocampus of 3xTg mice as previously reported in different strains (Caccamo *et al.* 2010) (and in 2xTg as showed in the *Objective 3*). Activation of TrkB receptors by BDNF induces several signaling pathways (Santos *et al.* 2010) that would converge in the synaptic plasticity and neurotransmission improvements required for the mood-related and memory improvements. Therefore, it appears that BDNF was increased through exercise when the hippocampal signaling was disturbed. Alternatively, middle-aged NTg mice submitted to chronic exercise training exhibited a lesser degree of BDNF increase than expected for young mice (Adlard *et al.* 2005). Furthermore, differential induction of BDNF could be influenced by the complex interactions that occur between ovarian steroids and BDNF in the hippocampus (Franklin & Perrot-Sinal 2006; Scharfman & MacLusky 2014). Studies in humans have found either positive or negative correlations between physical exercise and BDNF levels in blood (Nofuji *et al.* 2008; Knaepen *et al.* 2010; Vega *et al.* 2011; Lee *et al.* 2014), thus highlighting the complexity of BDNF regulation. On the other hand, no changes of the BDNF specific receptor, TrkB, have been reported in Alzheimer's disease patient brains (Wong *et al.* 2012). In accordance, we observed no differences of TrkB protein expression in the hippocampus in any group although 3xTg groups showed a tendency to decrease the receptor protein levels.

It is known that physical exercise enhances brain plasticity and improves neuronal survival through the triggering of numerous signaling cascades (Cotman &

Berchtold 2002; Gomez-Pinilla *et al.* 2002; Cotman *et al.* 2007). Ovariectomy and partially 3xTg genotype reduced the plasticity responses induced by exercise as demonstrated by the abolition of the activation of the key signaling molecules PGC-1 α and p-CREB in the hippocampus. PGC-1 α , the transcriptional coactivator that modulates mitochondrial function and biogenesis, was activated by physical exercise in NTg mice but not in ovariectomized or 3xTg mice. PGC-1 α was reported to mediate BACE1 degradation, followed by a consequent A β reduction, in Tg2576 (Gong *et al.* 2013). Transcription dysregulation of PGC-1 α may contribute to mitochondrial dysfunction in ovariectomized and 3xTg mice. Indeed, the 3xTg mice have shown mitochondrial complex deficiencies (Garcia-Mesa *et al.* 2012) and decreased respiration (Yao *et al.* 2009). A novel role recently attributed to PGC-1 α is the formation and maintenance of dendritic spines and maturation of synapses in hippocampal neurons (Cheng *et al.* 2012). There would be a cross-talk between PGC-1 α and BDNF, where BDNF stimulates PGC-1 α -dependent mitochondrial biogenesis and PGC-1 α modulates BDNF-induced dendritic spine formation without affecting the neurotrophic factor itself (Cheng *et al.* 2012). The increased expression of PGC-1 α by exercise training was originally highlighted in peripheral tissues such as muscle, where its activation through exercise in rats is lost with aging (Derbre *et al.* 2012). Accordingly, we found that the increase of PGC-1 α expression in hippocampus by physical exercise was lost after senescence changes induced by ovariectomy and by the 3xTg phenotype. CREB signaling has been implicated in memory deficits associated with aging and Alzheimer's disease (Saura & Valero 2011). CREB phosphorylation (i.e., activation) triggers a cascade of genes that mediate neuronal responses of synaptic plasticity and long-term memory formation (Carlezon *et al.* 2005; Barco & Marie 2011). CREB activation is essential for BDNF-increased transduction after exercise (Chen & Russo-Neustadt 2009). As expected, chronic wheel-running activity increased phosphorylated CREB in the sham-operated NTg and 3xTg mice (Shen *et al.*

2001). Nonetheless we did not observe basal changes of phosphorylated CREB, whereas other authors have reported either a decrease (Caccamo *et al.* 2010) or an early increase in this mouse model (Muller *et al.* 2011). The impairment of this plasticity pathway following ovariectomy supported previously reported decreases of hippocampal CREB activation in ovariectomized rats (Sharma *et al.* 2007). Thus, deficient signaling of this transduction factor is probably implicated in the cognitive deficits of 3xTg and ovariectomized mice

Brain oxidative stress increases with older age and it is a proposed link between aging and Alzheimer's disease (Vina *et al.* 2004). Ovarian hormone loss induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in ovariectomized mice (Yao *et al.* 2012), in line with the above mentioned induction of premature aging. The 3xTg female mice have been reported to suffer brain oxidative stress 3-4 months of age (Resende *et al.* 2008). The oxidative imbalance increases with age and with pathology severity (Resende *et al.* 2008; Yao *et al.* 2009; Garcia-Mesa *et al.* 2011b; Garcia-Mesa *et al.* 2012; Yao *et al.* 2012). One of the functional mechanisms of physical exercise is an increase in the antioxidant response that restores redox homeostasis in the brain (Radak *et al.* 2001a). Previous findings have shown that the activation of the enzymes involved in glutathione cycle decrease at 7 months of age followed by an increase at 12-15 months, whereas the activity of the mitochondrial Mn-SOD enzyme remained unchanged at 7 months and then decreased at 12 months and 15 months of age (Garcia-Mesa *et al.* 2011b; Garcia-Mesa *et al.* 2012). This would indicate an initial activation, and thereafter a depletion of the antioxidant defense in the 3xTg mice model. In the present study at 9 months of age, an increase in gene expression of CAT in the hippocampus of the sedentary and exercised 3xTg sham groups would indicate an active defense against oxidative stress. Moreover ovariectomy decreased CAT levels in the sedentary 3xTg group whereas exercise training reversed this decline. Furthermore,

the low level of changes of GPx and Mn-SOD would be in accordance with an intermediate stage of oxidative stress at this age.

As we stated at the beginning of the discussion, the present doctoral thesis describe the molecular results of a more complex investigation (Garcia-Mesa *et al.* 2014). In order to interpret and contextualize the results of this thesis we further describe briefly some findings regarding behavioral and cognitive changes induced by exercise in our study.

Exercise training impeded most signs of neophobia, anxiety, decreased activity and apathetic behavior in ovariectomized 3xTg mice similarly to the protection afforded to control 3xTg mice (Garcia-Mesa *et al.* 2011b; Garcia-Mesa *et al.* 2012). Moreover, physical exercise improved the behavior of NTg mice (sham-operated or ovariectomized), as shown by their improved performance in the corner test, dark-light box test and hole-board test. These results confirm the general mood improvement induced by physical exercise, and confirms the effects reported in postmenopausal women (Villaverde Gutierrez *et al.* 2012) and Alzheimer's disease patients (Knochel *et al.* 2012).

Ovariectomy induced a trend towards a decrease capacity of learning acquisition in the NTg mice, whereas ovariectomized 3xTg mice showed a similar acquisition curve as the sham-operated ones. Retention of learning was impaired in ovariectomized NTg and 3xTg and sham-operated 3xTg mice. Females of the 3xTg strain have previously shown a consistent lack of learning and memory in the Morris Water Maze (MWM) test from early ages (Garcia-Mesa *et al.* 2011a) that may worsened by ovariectomy (Baeza *et al.* 2010; Ben *et al.* 2010). In humans it has long been known that sex steroids influence behavior and cognition, including visual-spatial abilities (Hampson 1995). Menopause induces a rapid loss of estrogens in the brain, that will pave the way to the deterioration of cognitive functions (Pompili *et al.* 2012). Physical exercise protected 3xTg mice and both

groups of ovariectomized mice from cognitive loss. These results support those reported in previous studies (Garcia-Mesa *et al.* 2011b; Intlekofer & Cotman 2013) and demonstrate the protective effect of exercise on spatial learning and memory in the ovariectomized 3xTg mice. A variety of patterns of aerobic physical exercise have been shown to induce cognitive benefits in older women. Only long-term strenuous activity prior to menopause was reported to decrease cognitive outcome in later stages of life (Tierney *et al.* 2010). Aerobic exercise improves executive performance, and decreases cognitive decline and Alzheimer's disease risk in elder women (Yaffe *et al.* 2001; Bixby *et al.* 2007). Furthermore, some meta-analyses have suggested that exercise interventions improve cognition in Alzheimer's disease patients (Heyn *et al.* 2004).

Interestingly, in this study the exercise-induced increase of BDNF strongly correlated with behavioral responses of decreased anxiety, increased active exploration, and improved learning (Garcia-Mesa *et al.* 2014). Therefore, hippocampal levels of BDNF increased coordinately with the behavioral and cognitive improvement in ovariectomized and 3xTg groups, thus reinforcing the mediation of BDNF in the neuroprotective changes induced by physical exercise (Cotman & Engesser-Cesar 2002; Adlard *et al.* 2005; Cotman *et al.* 2007).

In summary, ovariectomy induced a deterioration of fitness and cognition in NTg mice and a worsening of apathy responses in the 3xTg mice. However, ovariectomy did not induce a significant exacerbation of Alzheimer's pathology. Three months of physical exercise in a freely available running wheel protected 9-month old 3xTg and NTg female mice submitted to ovariectomy against brain alterations and loss of brain plasticity. Physical exercise induced a recovery of behavioral and psychological symptoms of dementia-like changes in 3xTg animals, and cognitive loss as seen in 3xTg mice and in ovariectomized 3xTg and NTg mice. Neuroprotection in 3xTg mice did not appear mediated through a reduction of A β or tau pathology, but rather through the enhancement of mechanisms of

neuroprotection and plasticity, such as those involving CAT, CREB activation and BDNF. Remarkably, there was a positive correlation between BDNF levels and amelioration of behavior and cognition. These results confirm the value of moderate aerobic exercise training as a lifestyle factor that effectively induces neuroprotection in postmenopausal women and reinforce the role of BDNF as a molecular effector of physical exercise neuroprotection.

5. Study of the potential synergic effect of chronic physical exercise and the TrkB agonist (7,8-dihydroxyflavone) administration (6 weeks) on cognitive and psychological variables in healthy rats (Objective 5).

A group of young male rats aged 4 months old were randomly divided in four groups to receive different treatments during 6 weeks:

- Rats exercised (Ex)
- Rats treated with 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF)
- Rats exercised and treated with 7,8-dihydroxyflavone (Ex+7,8-DHF)
- Sedentary and untreated rats (Control)

5.1. Results.

5.1.1. Weight over time in rats treated with 7,8-dihydroxyflavone and/or exercise training.

Body weight was measured at three different times of the experiment, i.e. before, at third week and before sacrifice. We found no differences between diverse groups in any moment. However, it was observed an increase of weight in the control ($P<0.001$), Ex ($P<0.05$), and 7,8-DHF ($P<0.01$) groups whereas it increase was not find in the Ex+7,8-DHF group (**Figure IV.42**).

Figure IV.42. Body weight over time in the rats treated with 7,8-DHF and/or exercise training.

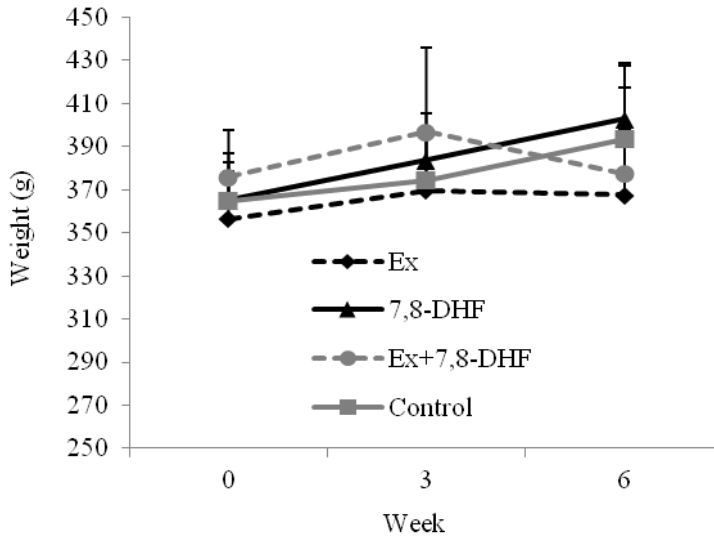


Figure IV.42. Body weight over time of rats subjected to exercise training (Ex, $n=10$), treated with 7,8-DHF (7,8-DHF, $n=8$), subjected to exercise training and treated with 7,8-DHF (7,8-DHF, $n=8$), and controls (control, $n=10$). Values are presented as mean \pm SD.

5.1.2. Behavioral and cognitive testing in rats treated with 7,8-dihydroxyflavone and/or exercise training.

We performed two different tests to evaluate the behavioral and cognitive changes of mice, i.e. object recognition and open field test.

Object recognition. The analysis of this test is based on the study of different parameters that measure the time spent exploring the environment but mainly the preference of the animal to explore a unknown object *vs.* a familiar one. **Figure IV.43** shows the time spent by the mice exploring **A**) the familiar of sample object (TS); and **B**) the unknown or new object (TN). The results indicated a lack of effect of any treatment because the high variability showed within the groups. This

consequence is noticeable also when calculated the Index $((TN-TS) / (TN + TS))$ (**Figure IV.43.C**). Thus, we did not find differences between groups when evaluated the preference of the new object in the mice. Ex, 7,8-DHF, and Ex+7,8-DHF groups decreased the time necessary to explore the environment during 20 seconds (Time 1) compared with the control group ($P < 0.05$ in all cases) (**Figure IV.43.D**).

Figure IV.43. Object recognition test in the rats treated with 7,8-DHF and/or exercise training.

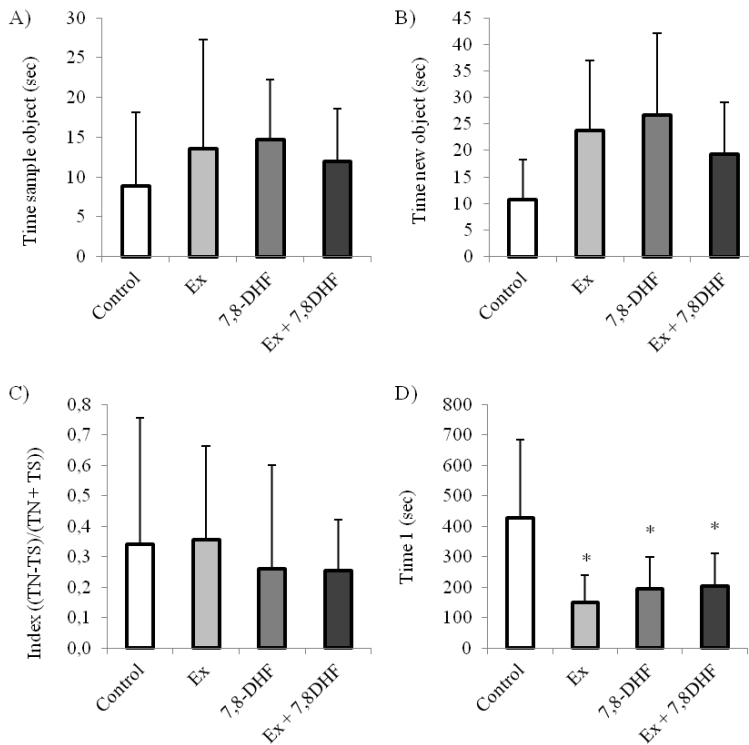


Figure IV.43. Time spent exploring A) the familiar, and B) the unknown object; C) index calculated by the time spent exploring the familiar and the unknown object $(T(TN-TS)/(TN+TS))$; and D) time spent exploring the environment during 20 seconds (Time 1). Rats subjected to exercise training (Ex, $n=10$), treated with 7,8-DHF (7,8-DHF, $n=8$), subjected to exercise training and treated with 7,8-DHF (7,8-DHF, $n=8$), and controls (control, $n=10$). Values are presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$.

Open field test. As described in the results of the *Objective 3*, the analysis of this test was performed considering different parameters based on the motor behavior of the mice. In this experiment we only have been able to analyze the number of rearings, the total time of grooming and number of defecations. Most of the mice did not defecated and then we did not consider this parameter. The number of rearings were higher in the Ex group compared with the control and 7,8-DHF groups ($P < 0.05$ in both cases) (**Figure IV.44.A**). Considering the time of grooming, despite the clear tendency of Ex+7,8-DHF group to spent more time grooming, there were not statistical differences between groups (**Figure IV.44.B**).

Figure IV.44. Open field test in the rats treated with 7,8-DHF and/or exercise training.

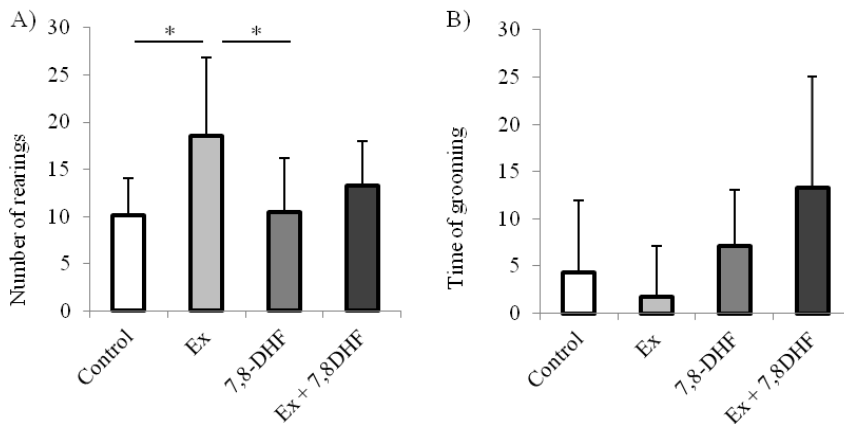


Figure IV.44. A) Number of rearings; and B) time of grooming in the open field test of rats subjected to exercise training (Ex, $n=10$), treated with 7,8-DHF (7,8-DHF, $n=8$), subjected to exercise training and treated with 7,8-DHF (7,8-DHF, $n=8$), and controls (control, $n=10$). Values are presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$.

5.2. Discussion.

The studies that use 7,8-DHF as an agonist of TrkB, and consequently as a virtual mimetic of BDNF (Jang *et al.* 2010), are growing in the last years. This flavone evokes antidepressant effects in mice (Liu *et al.* 2012) and rats (Blugeot *et al.* 2011); regulates fear extinction (Andero & Ressler 2012); and improves learning and memory (Andero *et al.* 2011; Andero *et al.* 2012). It has antioxidant (Kim *et al.* 2013; Han *et al.* 2014) and even antihypertensive effects (Huai *et al.* 2014).

In the transgenic CaM/Tet-DTA mice, an inducible model of severe neuronal loss in the hippocampus and cortex, 7,8-DHF has shown to improve spatial memory and increase thin spine density (Castello *et al.* 2014). In the fivefold mouse model of Alzheimer's disease (5XFAD or B6SJL-Tg(APP^SwF^{ILon},PSEN1^{*M146L}*L286V)6799Vas/J), 7,8-DHF reverted memory deficits and downregulated the BACE activity that was increased in the transgenic model. The treatment decreased the C99 fragment, as marker of amyloidogenic pathway, and A β in the brain (Devi & Ohno 2012). In the same transgenic strain, Zhang *et al.* found that the treatment with 7,8-DHF prevented synaptic loss and the associated memory deficits (Zhang *et al.* 2014). In the 2xTg strain 7,8-DHF also improved spatial memory (Bollen *et al.* 2013).

In this study we aimed to test the effect of 7,8-DHF on cognitive and psychological features in healthy young rats and the possible synergic effect of the co-treatment with exercise. The dosage was based in those reported in previous studies (Andero *et al.* 2011; Devi & Ohno 2012; Zeng *et al.* 2012b). Regarding the object recognition test, we found no significant differences between groups when we analyzed the time of exploration of the new object. However, a marked tendency shows that the three treated groups (exercised, 7,8-DHF and the combination of both) explored more time the new object than the control mice. We found that all treated groups needed significant less time to reach the "time to criteria" or "time

1” than the control group. Thus, all treated mice showed better exploratory behavior. We did not find synergic effects of both treatments. On the other hand, the open field test showed that only the exercised mice showed an improved exploratory behavior when compared with the other groups.

Recently, Bollen *et al.* evaluated the enhancing properties of 7,8-DHF in learning of healthy rats. They concluded that 7,8-DHF improved object memory formation in the object recognition task when administered both immediately and 3 h after learning (Bollen *et al.* 2013). To date, studies have been developed in diseased conditions in order to prevent or counteract the alterations induced by the specific pathology (Johnson *et al.* 2012; Zeng *et al.* 2012a; Zhang *et al.* 2014). However, no studies have evaluated the effect of chronic treatment with 7,8-DHF in healthy conditions. This new approach could have important physiologic and translational applications since the enhancement of cognitive functions in healthy people is highly demanded. Moreover, it could be studied as a strategy to early prevent the pathogenesis of several neuropsychiatric alterations. Studies regarding the molecular mechanism by which 7,8-DHF, and the possible synergy with exercise, act into the brain are needed and this will be the next step of our study.

V. CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

Conclusion 1. The BDNF and IGF-1 blood levels are increased in trained adolescents when they are analyzed during the pre-season period (moderate physical demand). These increments do not modify the CREB activation in mononuclear cells. The differences between the experimental groups disappear in the post-competition period, characterized by a significant increase in the physical performance demands.

Conclusion 2. An acute bout of physical exercise increases BDNF in serum coagulated during 24 hours and in whole blood samples in young adults. These changes are not visible in the serum coagulated during 10 minutes and in plasma samples due to the high variability found in the BDNF levels. Clotting time and temperature, hemoconcentration, and anticoagulants should be taken into account when studying peripheral BDNF levels in exercise studies.

Conclusion 3. Exercise training improves behavior in a 2xTg mice model for Alzheimer's disease. This is accompanied by a significant decrease in the hippocampal A β (1-42) levels, a significant increase in the brain antioxidant defense and in glucose uptake in the 2xTg mice after training. However, the cerebral and systemic oxidative damage, LRP1 and hippocampal BDNF levels are reduced in the 2xTg mice independently of the exercise intervention.

Conclusion 4. Voluntary physical exercise protects NTg and 3xTg mice model for Alzheimer's disease female, submitted to ovariectomy, against the loss of brain plasticity. Behavioral changes of neophobia, anxiety and apathy in Tg mice were exacerbated by ovariectomy and protected in the exercised groups. There is also a recovery by exercise of the reduced acquisition of learning and memory in ovariectomized 3xTg and NTg mice. Neuroprotection is not mediated through a reduction of amyloid or tau pathology but rather through enhancement of signaling

pathways of plasticity and survival. Accordingly, there is a positive correlation between BDNF levels and amelioration of behavior and cognition. These results confirm the value of moderate aerobic exercise training as a lifestyle factor that effectively induce neuroprotection in postmenopausal women and reinforce the role of BDNF as a molecular effector of exercise neuroprotection.

Conclusion 5. Exercise training and treatment with 7,8-dihydroxyflavone do not show a synergic positive effect on cognitive and psychological parameters in healthy young rats. The learning and memory do not change while the exploratory behavior is improved with both interventions, being exercise training the most effective one.

CONCLUSIONES

Conclusión 1. Los niveles sanguíneos de BDNF e IGF-1 se muestran incrementados en los adolescentes deportistas cuando son analizados durante el periodo de pretemporada (demanda física moderada). Estos incrementos no modifican la activación de CREB en células mononucleares. Las diferencias entre los grupos experimentales desaparecen en el periodo post-competitivo, caracterizado por un significativo incremento de las demandas de rendimiento físico.

Conclusión 2. Una sesión aguda de ejercicio físico incrementa el BDNF en suero coagulado durante 24 horas y en sangre total en adultos jóvenes. Estos cambios no son visibles en el suero coagulado durante 10 minutos ni en las muestras de plasma debido a la alta variabilidad encontrada en los niveles de BDNF. El tiempo y la temperatura de coagulación, la hemoconcentración y los anticoagulantes deberían ser tenidos en cuenta cuando se estudian los niveles de BDNF periféricos en estudios con ejercicio.

Conclusión 3. El entrenamiento físico mejora el comportamiento en un modelo de ratones 2xTg para la enfermedad de Alzheimer. Esto va acompañado por una significativa reducción del β A (1-42) hipocampal, un significativo incremento en la defensa antioxidante y en la captación de glucosa cerebral en los ratones 2xTg tras el entrenamiento. Sin embargo, el daño oxidativo sistémico y cerebral y los niveles de LRP1 y BDNF hipocampal se muestran reducidos en los ratones 2xTg independientemente de la intervención con ejercicio.

Conclusión 4. El entrenamiento físico voluntario protege a los ratones hembra NTg y 3xTg para la enfermedad de Alzheimer, sometidos a ovariectomía, contra la pérdida de plasticidad cerebral. Cambios comportamentales de neofobia, ansiedad y apatía en ratones 3xTg son exacerbados por la ovariectomía y protegidos en los

grupos entrenados. El ejercicio físico también recupera la merma de adquisición de memoria y aprendizaje en los ratones ovariectomizados 3xTg y NTg. La neuroprotección no está mediada por una reducción en la patología amiloide o tau, sino a través de la mejora de las vías de señalización de plasticidad y supervivencia neuronal. En consecuencia, existe una correlación positiva entre los niveles de BDNF y las mejoras en el comportamiento y la cognición. Estos resultados confirman el valor del entrenamiento físico aeróbico como un estilo de vida que induce de forma efectiva neuroprotección en mujeres postmenopáusicas y refuerza el papel del BDNF como su efector molecular mediado por ejercicio.

Conclusión 5. El entrenamiento físico y el tratamiento con 7,8-dihydroxiflavona no muestran un efecto sinérgico positivo en los parámetros psicológicos analizados en ratas sanas jóvenes. El aprendizaje y la memoria no cambian mientras que el comportamiento exploratorio es mejorado con ambos tratamientos, siendo el ejercicio físico el más efectivo.

VI. BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFÍA

- Abbott RD, White LR, Ross GW, Masaki KH, Curb JD, Petrovitch H (2004). *Walking and dementia in physically capable elderly men*. JAMA. 292, 1447-1453.
- Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J (2006). *Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain*. ScientificWorldJournal. 6, 53-80.
- Abramov AY, Canevari L, Duchen MR (2004). *Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase*. J Neurosci. 24, 565-575.
- Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1995). *A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death*. Nature. 374, 450-453.
- Adamo ML, Ma X, Ackert-Bicknell CL, Donahue LR, Beamer WG, Rosen CJ (2006). *Genetic increase in serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) in C3H/HeJ compared with C57BL/6J mice is associated with increased transcription from the IGF-I exon 2 promoter*. Endocrinology. 147, 2944-2955.
- Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW (2005). *Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease*. J Neurosci. 25, 4217-4221.
- Agnati LF, Cortelli P, Pettersson R, Fuxe K (1995). *The concept of trophic units in the central nervous system*. Prog Neurobiol. 46, 561-574.
- Agrawal R, Tyagi E, Vergnes L, Reue K, Gomez-Pinilla F (2014). *Coupling energy homeostasis with a mechanism to support plasticity in brain trauma*. Biochim Biophys Acta. 1842, 535-546.
- Aisen PS (2014). *Serum brain-derived neurotrophic factor and the risk for dementia*. JAMA. 311, 1684-1685.
- Alberca R (2005). *[Advanced dementia in Alzheimer's disease and memantine]*. Rev Neurol. 40, 173-179.
- Alegria-Torres JA, Baccarelli A, Bollati V (2011). *Epigenetics and lifestyle*. Epigenomics. 3, 267-277.
- Aleman A, Torres-Aleman I (2009). *Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan*. Prog Neurobiol. 89, 256-265.
- Alessio HM (1993). *Exercise-induced oxidative stress*. Med Sci Sports Exerc. 25, 218-224.
- Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK (2005). *Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses*. Neurobiol Dis. 20, 187-198.
- Alomari MA, Khabour OF, Alzoubi KH, Alzubi MA (2013). *Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels*. Behav Brain Res. 247, 34-39.

- Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K (1997). *Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau.* Proc Natl Acad Sci U S A. 94, 298-303.
- Altman R, Rutledge JC (2010). *The vascular contribution to Alzheimer's disease.* Clin Sci (Lond). 119, 407-421.
- Alzheimer A (1907). *Über eine eigenartige Erkrankung der hirnrinde.* Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychiatrisch-gerichtliche Medizin. 64, 146-148.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK (2013). *GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration.* Pharmacol Ther. 138, 155-175.
- Andel R, Crowe M, Pedersen NL, Fratiglioni L, Johansson B, Gatz M (2008). *Physical exercise at midlife and risk of dementia three decades later: a population-based study of Swedish twins.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 63, 62-66.
- Andero R, Daviu N, Escorihuela RM, Nadal R, Armario A (2012). *7,8-dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, blocks long-term spatial memory impairment caused by immobilization stress in rats.* Hippocampus. 22, 399-408.
- Andero R, Heldt SA, Ye K, Liu X, Armario A, Ressler KJ (2011). *Effect of 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, on emotional learning.* Am J Psychiatry. 168, 163-172.
- Andero R, Ressler KJ (2012). *Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic.* Genes Brain Behav. 11, 503-512.
- Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibanez CF (1995). *GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo.* Neuron. 15, 1465-1473.
- Arendt T (2001). *Disturbance of neuronal plasticity is a critical pathogenetic event in Alzheimer's disease.* Int J Dev Neurosci. 19, 231-245.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992). *Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease.* Neurology. 42, 631-639.
- Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Estrela JM, Vina J (1994). *A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples.* Anal Biochem. 217, 323-328.
- Atamna H, Boyle K (2006). *Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A. 103, 3381-3386.

- Autry AE, Monteggia LM (2012). *Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders*. Pharmacol Rev. 64, 238-258.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004). *Role of tau protein in both physiological and pathological conditions*. Physiol Rev. 84, 361-384.
- Bach MA, Shen-Orr Z, Lowe WL, Jr., Roberts CT, Jr., LeRoith D (1991). *Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain*. Brain Res Mol Brain Res. 10, 43-48.
- Badia MC, Giraldo E, Dasi F, Alonso D, Lainez JM, Lloret A, Vina J (2013). *Reductive stress in young healthy individuals at risk of Alzheimer disease*. Free Radic Biol Med. 63C, 274-279.
- Baeza I, De Castro NM, Gimenez-Llort L, De la Fuente M (2010). *Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems*. J Neuroimmunol. 219, 90-99.
- Baj G, Carlino D, Gardossi L, Tongiorgi E (2013). *Toward a unified biological hypothesis for the BDNF Val66Met-associated memory deficits in humans: a model of impaired dendritic mRNA trafficking*. Front Neurosci. 7, 188.
- Baker LD, Frank LL, Foster-Schubert K, Green PS, Wilkinson CW, McTiernan A, Plymate SR, Fishel MA, Watson GS, Cholerton BA, Duncan GE, Mehta PD, Craft S (2010). *Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial*. Arch Neurol. 67, 71-79.
- Balaratnasingam S, Janca A (2012). *Brain Derived Neurotrophic Factor: a novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders*. Pharmacol Ther. 134, 116-124.
- Balazs L, Leon M (1994). *Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain*. Neurochem Res. 19, 1131-1137.
- Barbacid M (1994). *The Trk family of neurotrophin receptors*. J Neurobiol. 25, 1386-1403.
- Barco A, Marie H (2011). *Genetic approaches to investigate the role of CREB in neuronal plasticity and memory*. Mol Neurobiol. 44, 330-349.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1980). *Sensory neurons in culture: changing requirements for survival factors during embryonic development*. Proc Natl Acad Sci U S A. 77, 1199-1203.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982). *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. EMBO J. 1, 549-553.
- Barde YA, Lindsay RM, Monard D, Thoenen H (1978). *New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurones*. Nature. 274, 818.
- Barnes LL, Wilson RS, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA (2003). *Gender, cognitive decline, and risk of AD in older persons*. Neurology. 60, 1777-1781.
- Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B, Lippa AS (1982). *The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction*. Science. 217, 408-414.

- Bath KG, Akins MR, Lee FS (2012). *BDNF control of adult SVZ neurogenesis*. Dev Psychobiol. 54, 578-589.
- Beck M, Flachenecker P, Magnus T, Giess R, Reiners K, Toyka KV, Naumann M (2005). *Autonomic dysfunction in ALS: a preliminary study on the effects of intrathecal BDNF*. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 6, 100-103.
- Bell RD, Zlokovic BV (2009). *Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol. 118, 103-113.
- Ben J, Soares FM, Scherer EB, Cechetti F, Netto CA, Wyse AT (2010). *Running exercise effects on spatial and avoidance tasks in ovariectomized rats*. Neurobiol Learn Mem. 94, 312-317.
- Bennett DL, Boucher TJ, Armanini MP, Poulsen KT, Michael GJ, Priestley JV, Phillips HS, McMahon SB, Shelton DL (2000). *The glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor components are differentially regulated within sensory neurons after nerve injury*. J Neurosci. 20, 427-437.
- Berchtold NC, Kessler JP, Pike CJ, Adlard PA, Cotman CW (2001). *Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus*. Eur J Neurosci. 14, 1992-2002.
- Bermejo-Pareja F (2007). *Enfermedades neurológicas crónicas: desde la clínica a la población*. Neurología. 22, 236-248.
- Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, Caselli U, Meier-Ruge W (1996). *Deterioration threshold of synaptic morphology in aging and senile dementia of Alzheimer's type*. Anal Quant Cytol Histol. 18, 209-213.
- Besser M, Wank R (1999). *Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors*. J Immunol. 162, 6303-6306.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005). *Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice*. Neuron. 45, 675-688.
- Binder DK, Scharfman HE (2004). *Brain-derived neurotrophic factor*. Growth Factors. 22, 123-131.
- Binoux M (1995). *The IGF system in metabolism regulation*. Diabete Metab. 21, 330-337.
- Bird TD (2008). *Genetic aspects of Alzheimer disease*. Genet Med. 10, 231-239.
- Bixby WR, Spalding TW, Haufler AJ, Deeny SP, Mahlow PT, Zimmerman JB, Hatfield BD (2007). *The unique relation of physical activity to executive function in older men and women*. Med Sci Sports Exerc. 39, 1408-1416.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993). *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus*. Nature. 361, 31-39.

- Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, Molet J, Mouchard A, Zeau B, Bernard C, Benoliel JJ, Becker C (2011). *Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers*. J Neurosci. 31, 12889-12899.
- Bollen E, Vanmierlo T, Akkerman S, Wouters C, Steinbusch HM, Prickaerts J (2013). *7,8-Dihydroxyflavone improves memory consolidation processes in rats and mice*. Behav Brain Res. 257, 8-12.
- Bondy CA (1991). *Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons*. J Neurosci. 11, 3442-3455.
- Bondy CA, Werner H, Roberts CT, Jr., LeRoith D (1990). *Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression*. Mol Endocrinol. 4, 1386-1398.
- Bondy SC (1992). *Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage*. Neurotoxicology. 13, 87-100.
- Booth FW, Chakravarthy MV, Gordon SE, Spangenburg EE (2002). *Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy*. J Appl Physiol. 93, 3-30.
- Bos I, Jacobs L, Nawrot TS, de Geus B, Torfs R, Int Panis L, Degraeuwe B, Meeusen R (2011). *No exercise-induced increase in serum BDNF after cycling near a major traffic road*. Neurosci Lett. 500, 129-132.
- Boyle PA, Buchman AS, Wilson RS, Leurgans SE, Bennett DA (2009). *Association of muscle strength with the risk of Alzheimer disease and the rate of cognitive decline in community-dwelling older persons*. Arch Neurol. 66, 1339-1344.
- Bradford MM (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72, 248-254.
- Breese CR, Ingram RL, Sonntag WE (1991). *Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins*. J Gerontol. 46, B180-187.
- Brigelius-Flohe R (1999). *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases*. Free Radic Biol Med. 27, 951-965.
- Broe GA, Henderson AS, Creasey H, McCusker E, Korten AE, Jorm AF, Longley W, Anthony JC (1990). *A case-control study of Alzheimer's disease in Australia*. Neurology. 40, 1698-1707.
- Brooker GJ, Kalloniatis M, Russo VC, Murphy M, Werther GA, Bartlett PF (2000). *Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells*. J Neurosci Res. 59, 332-341.
- Brunelli A, Dimauro I, Sgro P, Emerenziani GP, Magi F, Baldari C, Guidetti L, Luigi LD, Parisi P, Caporossi D (2012). *Acute exercise modulates BDNF*

- and pro-BDNF protein content in immune cells. Med Sci Sports Exerc. 44, 1871-1880.
- Buchman AS, Schneider JA, Leurgans S, Bennett DA (2008). *Physical frailty in older persons is associated with Alzheimer disease pathology.* Neurology. 71, 499-504.
- Burgess BL, McIsaac SA, Naus KE, Chan JY, Tansley GH, Yang J, Miao F, Ross CJ, van Eck M, Hayden MR, van Nostrand W, St George-Hyslop P, Westaway D, Wellington CL (2006). *Elevated plasma triglyceride levels precede amyloid deposition in Alzheimer's disease mouse models with abundant A beta in plasma.* Neurobiol Dis. 24, 114-127.
- Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, Buitelaar JK, Kenis G, Prickaerts J, Elzinga BM, Voshaar RC (2011). *Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor.* Psychoneuroendocrinology. 36, 228-239.
- Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J (1994). *beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease.* Biochem Biophys Res Commun. 200, 710-715.
- Caccamo A, Maldonado MA, Bokov AF, Majumder S, Oddo S (2010). *CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A. 107, 22687-22692.
- Cao L, Lin EJ, Cahill MC, Wang C, Liu X, Durrant DJ (2009). *Molecular therapy of obesity and diabetes by a physiological autoregulatory approach.* Nat Med. 15, 447-454.
- Cardoso SM, Santos S, Swerdlow RH, Oliveira CR (2001). *Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity.* FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 15, 1439-1441.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005). *The many faces of CREB.* Trends Neurosci. 28, 436-445.
- Carro Díaz E, Trejo Pérez JL, Torres Aleman I (2003). *Efectos beneficiosos del ejercicio físico sobre el cerebro.* Ciencia al día. Internacional. 5.
- Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I (2000). *Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain.* J Neurosci. 20, 2926-2933.
- Carro E, Torres-Aleman I (2004). *Insulin-like growth factor I and Alzheimer's disease: therapeutic prospects?* Expert Rev Neurother. 4, 79-86.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I (2001). *Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy.* J Neurosci. 21, 5678-5684.

- Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002). *Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels*. Nat Med. 8, 1390-1397.
- Carroll JC, Rosario ER, Villamagna A, Pike CJ (2010). *Continuous and cyclic progesterone differentially interact with estradiol in the regulation of Alzheimer-like pathology in female 3xTransgenic-Alzheimer's disease mice*. Endocrinology. 151, 2713-2722.
- Casazza K, Hanks LJ, Alvarez JA (2010). *Role of various cytokines and growth factors in pubertal development*. Med Sport Sci. 55, 14-31.
- Casey BJ, Glatt CE, Tottenham N, Soliman F, Bath K, Amso D, Altemus M, Pattwell S, Jones R, Levita L, McEwen B, Magarinos AM, Gunnar M, Thomas KM, Mezey J, Clark AG, Hempstead BL, Lee FS (2009). *Brain-derived neurotrophic factor as a model system for examining gene by environment interactions across development*. Neuroscience. 164, 108-120.
- Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA (2002). *Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities*. J Neurochem. 80, 91-100.
- Cassilhas RC, Viana VA, Grassmann V, Santos RT, Santos RF, Tufik S, Mello MT (2007). *The impact of resistance exercise on the cognitive function of the elderly*. Med Sci Sports Exerc. 39, 1401-1407.
- Castellano V, White LJ (2008). *Serum brain-derived neurotrophic factor response to aerobic exercise in multiple sclerosis*. J Neurol Sci. 269, 85-91.
- Castello NA, Nguyen MH, Tran JD, Cheng D, Green KN, LaFerla FM (2014). *7,8-Dihydroxyflavone, a small molecule TrkB agonist, improves spatial memory and increases thin spine density in a mouse model of Alzheimer disease-like neuronal loss*. PLoS One. 9, e91453.
- Catlow BJ, Rowe AR, Clearwater CR, Mamcarz M, Arendash GW, Sanchez-Ramos J (2009). *Effects of environmental enrichment and physical activity on neurogenesis in transgenic PS1/APP mice*. Brain Res. 1256, 173-179.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH (2005). *Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function*. Nat Neurosci. 8, 79-84.
- Coelho FG, Gobbi S, Andreatto CA, Corazza DI, Pedroso RV, Santos-Galduroz RF (2013). *Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): a systematic review of experimental studies in the elderly*. Arch Gerontol Geriatr. 56, 10-15.
- Coelho FG, Vital TM, Stein AM, Arantes FJ, Rueda AV, Camarini R, Teodorov E, Santos-Galduroz RF (2014). *Acute aerobic exercise increases brain-derived neurotrophic factor levels in elderly with Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis. 39, 401-408.
- Cohen AD, Price JC, Weissfeld LA, James J, Rosario BL, Bi W, Nebes RD, Saxton JA, Snitz BE, Aizenstein HA, Wolk DA, Dekosky ST, Mathis CA,

- Klunk WE (2009). *Basal cerebral metabolism may modulate the cognitive effects of Abeta in mild cognitive impairment: an example of brain reserve.* J Neurosci. 29, 14770-14778.
- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V (1954). *A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180.* Proc Natl Acad Sci U S A. 40, 1014-1018.
- Cole SL, Grudzien A, Manhart IO, Kelly BL, Oakley H, Vassar R (2005). *Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, beta-secretase-cleaved fragments, and amyloid beta-peptide via an isoprenoid-dependent mechanism.* J Biol Chem. 280, 18755-18770.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S (1997). *Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport.* J Neurosci. 17, 2295-2313.
- Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M (1997). *Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease.* Brain Res Mol Brain Res. 49, 71-81.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993). *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.* Science. 261, 921-923.
- Correia PR, Scorza FA, Gomes da Silva S, Pansani A, Toscano-Silva M, de Almeida AC, Arida RM (2011). *Increased basal plasma brain-derived neurotrophic factor levels in sprint runners.* Neurosci Bull. 27, 325-329.
- Costello EJ, Foley DL, Angold A (2006). *10-year research update review: the epidemiology of child and adolescent psychiatric disorders: II. Developmental epidemiology.* J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 45, 8-25.
- Cotman CW, Berchtold NC (2002). *Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity.* Trends Neurosci. 25, 295-301.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA (2007). *Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation.* Trends Neurosci. 30, 464-472.
- Cotman CW, Engesser-Cesar C (2002). *Exercise enhances and protects brain function.* Exerc Sport Sci Rev. 30, 75-79.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993). *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders.* Science. 262, 689-695.
- Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF, Oja P (2003). *International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity.* Med Sci Sports Exerc. 35, 1381-1395.

- Cross AJ, Slater P, Simpson M, Royston C, Deakin JF, Perry RH, Perry EK (1987). *Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases.* Neurosci Lett. 79, 213-217.
- Cruts M, Backhovens H, Wang SY, Van Gassen G, Theuns J, De Jonghe CD, Wehnert A, De Voecht J, De Winter G, Cras P, et al. (1995). *Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3.* Hum Mol Genet. 4, 2363-2371.
- Cui Q (2006). *Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration.* Mol Neurobiol. 33, 155-179.
- Cummings JL (2004). *Alzheimer's disease.* N Engl J Med. 351, 56-67.
- Currie J, Ramsbottom R, Ludlow H, Nevill A, Gilder M (2009). *Cardio-respiratory fitness, habitual physical activity and serum brain derived neurotrophic factor (BDNF) in men and women.* Neurosci Lett. 451, 152-155.
- Chaddock L, Erickson KI, Prakash RS, Kim JS, Voss MW, Vanpatter M, Pontifex MB, Raine LB, Konkel A, Hillman CH, Cohen NJ, Kramer AF (2010a). *A neuroimaging investigation of the association between aerobic fitness, hippocampal volume, and memory performance in preadolescent children.* Brain Res. 1358, 172-183.
- Chaddock L, Erickson KI, Prakash RS, VanPatter M, Voss MW, Pontifex MB, Raine LB, Hillman CH, Kramer AF (2010b). *Basal ganglia volume is associated with aerobic fitness in preadolescent children.* Dev Neurosci. 32, 249-256.
- Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM (2001). *Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system.* Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 14661-14668.
- Chan KL, Tong KY, Yip SP (2008). *Relationship of serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and health-related lifestyle in healthy human subjects.* Neurosci Lett. 447, 124-128.
- Chao MV (1992a). *Growth factor signaling: where is the specificity?* Cell. 68, 995-997.
- Chao MV (1992b). *Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation.* Neuron. 9, 583-593.
- Chao MV (2003). *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways.* Nat Rev Neurosci. 4, 299-309.
- Chao MV, Hempstead BL (1995). *p75 and Trk: a two-receptor system.* Trends Neurosci. 18, 321-326.
- Chaudhry V, Giuliani M, Petty BG, Lee D, Seyedsadr M, Hilt D, Cornblath DR (2000). *Tolerability of recombinant-methionyl human neurotrophin-3 (r-metHuNT3) in healthy subjects.* Muscle Nerve. 23, 189-192.

- Chen MJ, Russo-Neustadt AA (2009). *Running exercise-induced up-regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor is CREB-dependent.* Hippocampus. 19, 962-972.
- Chen ZY, Bath K, McEwen B, Hempstead B, Lee F (2008). *Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function.* Novartis Found Symp. 289, 180-188; discussion 188-195.
- Cheng A, Wan R, Yang JL, Kamimura N, Son TG, Ouyang X, Luo Y, Okun E, Mattson MP (2012). *Involvement of PGC-1alpha in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines.* Nat Commun. 3, 1250.
- Cho HC, Kim J, Kim S, Son YH, Lee N, Jung SH (2012). *The concentrations of serum, plasma and platelet BDNF are all increased by treadmill VO(2)max performance in healthy college men.* Neurosci Lett. 519, 78-83.
- Cho JY, Hwang DY, Kang TS, Shin DH, Hwang JH, Lim CH, Lee SH, Lim HJ, Min SH, Seo SJ, Song YS, Nam KT, Lee KS, Cho JS, Kim YK (2003). *Use of NSE/PS2m-transgenic mice in the study of the protective effect of exercise on Alzheimer's disease.* J Sports Sci. 21, 943-951.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem. 162, 156-159.
- Chourbaji S, Brandwein C, Gass P (2011). *Altering BDNF expression by genetics and/or environment: impact for emotional and depression-like behaviour in laboratory mice.* Neurosci Biobehav Rev. 35, 599-611.
- Chung JY, Kim MW, Bang MS, Kim M (2013). *Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise.* PLoS One. 8, e52461.
- Daffner KR, Scinto LF, Weintraub S, Guinessey JE, Mesulam MM (1992). *Diminished curiosity in patients with probable Alzheimer's disease as measured by exploratory eye movements.* Neurology. 42, 320-328.
- Davidson SR, Burnett M, Hoffman-Goetz L (2006). *Training effects in mice after long-term voluntary exercise.* Med Sci Sports Exerc. 38, 250-255.
- Davies KJ, Packer L, Brooks GA (1982). *Exercise bioenergetics following sprint training.* Arch Biochem Biophys. 215, 260-265.
- Dechant G, Barde YA (1997). *Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR.* Curr Opin Neurobiol. 7, 413-418.
- Deijen JB, de Boer H, Blok GJ, van der Veen EA (1996). *Cognitive impairments and mood disturbances in growth hormone deficient men.* Psychoneuroendocrinology. 21, 313-322.
- DeKosky ST, Scheff SW (1990). *Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity.* Ann Neurol. 27, 457-464.

- DeKosky ST, Scheff SW, Styren SD (1996). *Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change*. Neurodegeneration. 5, 417-421.
- Derbre F, Gomez-Cabrera MC, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, Tresguerres JA, Fuentes T, Gratas-Delamarche A, Monsalve M, Vina J (2012). *Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1alpha to exercise training*. Age (Dordr). 34, 669-679.
- Desai AK, Grossberg GT (2005). *Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease*. Neurology. 64, S34-39.
- Devi L, Ohno M (2012). *7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease*. Neuropsychopharmacology. 37, 434-444.
- Devi SA, Kiran TR (2004). *Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary vitamin E in aging rat brain*. Neurobiol Aging. 25, 501-508.
- Dickson DW (1997). *The pathogenesis of senile plaques*. J Neuropathol Exp Neurol. 56, 321-339.
- Dill DB, Costill DL (1974). *Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration*. J Appl Physiol. 37, 247-248.
- Dincheva I, Glatt CE, Lee FS (2012). *Impact of the BDNF Val66Met polymorphism on cognition: implications for behavioral genetics*. Neuroscientist. 18, 439-451.
- Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2006). *Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function*. Neuroscience. 140, 823-833.
- Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Gandevia SC, Gomez-Pinilla F, Greenwood BN, Hillman CH, Kramer AF, Levin BE, Moran TH, Russo-Neustadt AA, Salamone JD, Van Hoomissen JD, Wade CE, York DA, Zigmond MJ (2006). *Neurobiology of exercise*. Obesity (Silver Spring). 14, 345-356.
- Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, Sharif S, Kaplan DR, Tsoulfas P, Parada L, et al. (1995). *Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury*. Am J Pathol. 147, 309-324.
- Doolittle RF (1992). *Stein and Moore Award address. Reconstructing history with amino acid sequences*. Protein Sci. 1, 191-200.
- Dore S, Bastianetto S, Kar S, Quirion R (1999). *Protective and rescuing abilities of IGF-I and some putative free radical scavengers against beta-amyloid-inducing toxicity in neurons*. Ann N Y Acad Sci. 890, 356-364.

- Duman CH, Schlesinger L, Russell DS, Duman RS (2008). *Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice*. Brain Res. 1199, 148-158.
- Dumont M, Wille E, Stack C, Calingasan NY, Beal MF, Lin MT (2009). *Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 23, 2459-2466.
- Dunger DB, Ong KK, Sandhu MS (2003). *Serum insulin-like growth factor-I levels and potential risk of type 2 diabetes*. Horm Res. 60 Suppl 3, 131-135.
- Easter SS, Jr., Purves D, Rakic P, Spitzer NC (1985). *The changing view of neural specificity*. Science. 230, 507-511.
- Eckert A, Hauptmann S, Scherping I, Meinhardt J, Rhein V, Drose S, Brandt U, Fandrich M, Muller WE, Gotz J (2008). *Oligomeric and fibrillar species of beta-amyloid (A beta 42) both impair mitochondrial function in P301L tau transgenic mice*. J Mol Med (Berl). 86, 1255-1267.
- Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schussel K, Muller WE (2003). *Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease*. Biochem Pharmacol. 66, 1627-1634.
- Edling AE, Nanavati T, Johnson JM, Tuohy VK (2004). *Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells*. J Neurosci Res. 77, 709-717.
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003). *The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function*. Cell. 112, 257-269.
- Ehmann WD, Markesbery WR, Alauddin M, Hossain TI, Brubaker EH (1986). *Brain trace elements in Alzheimer's disease*. Neurotoxicology. 7, 195-206.
- Elfving B, Plougmann PH, Wegener G (2010). *Detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat blood and brain preparations using ELISA: pitfalls and solutions*. J Neurosci Methods. 187, 73-77.
- Elliott E, Ginzburg I (2006). *The role of neurotrophins and insulin on tau pathology in Alzheimer's disease*. Rev Neurosci. 17, 635-642.
- Ennaceur A, Delacour J (1988). *A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data*. Behav Brain Res. 31, 47-59.
- Ennaceur A, Meliani K (1992). *A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory*. Behav Brain Res. 51, 83-92.
- Erickson KI, Miller DL, Roecklein KA (2012). *The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF*. Neuroscientist. 18, 82-97.

- Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Heo S, McLaren M, Pence BD, Martin SA, Vieira VJ, Woods JA, McAuley E, Kramer AF (2010). *Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume*. J Neurosci. 30, 5368-5375.
- Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Persson H, Lindvall O (1991). *Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis*. Neuron. 7, 165-176.
- Esposito L, Raber J, Kekonius L, Yan F, Yu GQ, Bien-Ly N, Puolivali J, Scarse-Levie K, Masliah E, Mucke L (2006). *Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer's disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice*. J Neurosci. 26, 5167-5179.
- Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD (2003). *VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis*. Eur J Neurosci. 18, 2803-2812.
- Feldman EL, Sullivan KA, Kim B, Russell JW (1997). *Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival*. Neurobiol Dis. 4, 201-214.
- Fernandez AM, de la Vega AG, Torres-Aleman I (1998). *Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 1253-1258.
- Ferris LT, Williams JS, Shen CL (2007). *The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function*. Med Sci Sports Exerc. 39, 728-734.
- Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B (1996). *Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus*. Nature. 381, 706-709.
- Fizman (2003). *Neuroprotección y factores neurotróficos*. Revista Neurológica Argentina. 28, 6-10.
- Fletcher JM, Hughes RA (2006). *Novel monocyclic and bicyclic loop mimetics of brain-derived neurotrophic factor*. J Pept Sci. 12, 515-524.
- Floel A, Ruscheweyh R, Kruger K, Willemer C, Winter B, Volker K, Lohmann H, Zitzmann M, Mooren F, Breitenstein C, Knecht S (2010). *Physical activity and memory functions: are neurotrophins and cerebral gray matter volume the missing link?* Neuroimage. 49, 2756-2763.
- Fordyce DE, Wehner JM (1993). *Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice*. Brain Res. 619, 111-119.
- Frank HJ, Pardridge WM, Morris WL, Rosenfeld RG, Choi TB (1986). *Binding and internalization of insulin and insulin-like growth factors by isolated brain microvessels*. Diabetes. 35, 654-661.
- Franklin TB, Perrot-Sinal TS (2006). *Sex and ovarian steroids modulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in rat hippocampus*

- under stressful and non-stressful conditions. Psychoneuroendocrinology. 31, 38-48.
- Frei B (1994). *Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action*. Am J Med. 97, 5S-13S; discussion 22S-28S.
- Fueger BJ, Czernin J, Hildebrandt I, Tran C, Halpern BS, Stout D, Phelps ME, Weber WA (2006). *Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice*. J Nucl Med. 47, 999-1006.
- Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN (2002). *Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation*. Thromb Haemost. 87, 728-734.
- Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC (2002). *Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease*. Arch Neurol. 59, 1381-1389.
- Fuss J, Ben Abdallah NM, Vogt MA, Touma C, Pacifici PG, 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.
- Gall CM, Isackson PJ (1989). *Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor*. Science. 245, 758-761.
- Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP (2006). *Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease*. Neurobiol Dis. 24, 516-524.
- Garcia-Mesa Y, Cristòfol i Martínez RM, Sanfeliu i Pujol C (2011a). *El ejercicio físico voluntario como terapia para la enfermedad de Alzheimer estudio en ratones triple transgénicos 3xTg-AD*. Departament de Medicina. Universitat de Barcelona. Barcelona
- Garcia-Mesa Y, Gimenez-Llort L, Lopez LC, Venegas C, Cristofol R, Escames G, Acuna-Castroviejo D, Sanfeliu C (2012). *Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse*. Neurobiol Aging. 33, 1124 e1113-1129.
- Garcia-Mesa Y, Lopez-Ramos JC, Gimenez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, Laferla FM, Cristofol R, Delgado-Garcia JM, Sanfeliu C (2011b). *Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice*. J Alzheimers Dis. 24, 421-454.
- Garcia-Mesa Y, Pareja-Galeano H, Bonet-Costa V, Revilla S, Gomez-Cabrera MC, Gambini J, Gimenez-Llort L, Cristòfol R, Viña J, Sanfeliu C (2014). *Physical exercise neuroprotects ovariectomized 3xTg-AD mice through BDNF mechanisms*. Psychoneuroendocrinology. 45, 154-166.
- Giedd JN (2004). *Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain*. Ann N Y Acad Sci. 1021, 77-85.

- Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL (1999). *Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study*. Nat Neurosci. 2, 861-863.
- Gimenez-Llort L, Blazquez G, Canete T, Johansson B, Oddo S, Tobena A, LaFerla FM, Fernandez-Teruel A (2007a). *Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid*. Neurosci Biobehav Rev. 31, 125-147.
- Gimenez-Llort L, Garcia Y, Buccieri K, Revilla S, Sunol C, Cristofol R, Sanfeliu C (2010). *Gender-Specific Neuroimmunoendocrine Response to Treadmill Exercise in 3xTg-AD Mice*. Int J Alzheimers Dis. 2010, 128354.
- Gimenez-Llort L, Schiffmann SN, Schmidt T, Canela L, Camon L, Wassholm M, Canals M, Terasmaa A, Fernandez-Teruel A, Tobena A, Popova E, Ferre S, Agnati L, Ciruela F, Martinez E, Scheel-Kruger J, Lluís C, Franco R, Fuxe K, Bader M (2007b). *Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain*. Neurobiol Learn Mem. 87, 42-56.
- Giulivi C (1998). *Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism*. Biochem J. 332 (Pt 3), 673-679.
- Glenner GG, Wong CW (1984). *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun. 120, 885-890.
- Goekint M, De Pauw K, Roelands B, Njemini R, Bautmans I, Mets T, Meeusen R (2010). *Strength training does not influence serum brain-derived neurotrophic factor*. Eur J Appl Physiol. 110, 285-293.
- Goekint M, Heyman E, Roelands B, Njemini R, Bautmans I, Mets T, Meeusen R (2008). *No influence of noradrenaline manipulation on acute exercise-induced increase of brain-derived neurotrophic factor*. Med Sci Sports Exerc. 40, 1990-1996.
- Goekint M, Roelands B, Heyman E, Njemini R, Meeusen R (2011). *Influence of citalopram and environmental temperature on exercise-induced changes in BDNF*. Neurosci Lett. 494, 150-154.
- Gold SM, Schulz KH, Hartmann S, Mladek M, Lang UE, Hellweg R, Reer R, Braumann KM, Heesen C (2003). *Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls*. J Neuroimmunol. 138, 99-105.
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J (2008). *Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training*. Free Radic Biol Med. 44, 126-131.
- Gomez-Cabrera MC, Sanchis-Gomar F, Garcia-Valles R, Pareja-Galeano H, Gambini J, Borrás C, Vina J (2012). *Mitochondria as sources and targets of damage in cellular aging*. Clin Chem Lab Med. 50, 1287-1295.

- Gomez-Pinilla F (2008). *The influences of diet and exercise on mental health through hormesis*. Ageing Res Rev. 7, 49-62.
- Gomez-Pinilla F, Cummings BJ, Cotman CW (1990). *Induction of basic fibroblast growth factor in Alzheimer's disease pathology*. Neuroreport. 1, 211-214.
- Gomez-Pinilla F, Tyagi E (2013). *Diet and cognition: interplay between cell metabolism and neuronal plasticity*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 16, 726-733.
- Gomez-Pinilla F, Vaynman S, Ying Z (2008). *Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition*. Eur J Neurosci. 28, 2278-2287.
- Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR (2002). *Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity*. J Neurophysiol. 88, 2187-2195.
- Gomez-Pinilla F, Zhuang Y, Feng J, Ying Z, Fan G (2011). *Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation*. Eur J Neurosci. 33, 383-390.
- Gong B, Pan Y, Vempati P, Zhao W, Knable L, Ho L, Wang J, Sastre M, Ono K, Sauve AA, Pasinetti GM (2013). *Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α regulated beta-secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models*. Neurobiol Aging. 34, 1581-1588.
- Goñi MM-L, P. (2010). *Alzheimer 2010: Evolución humana y evolución del Alzheimer*. Madrid.
- Goodman L (1953). *Alzheimer's disease; a clinico-pathologic analysis of twenty-three cases with a theory on pathogenesis*. J Nerv Ment Dis. 118, 97-130.
- Gotz J, Deters N, Doldissen A, Bokhari L, Ke Y, Wiesner A, Schonrock N, Ittner LM (2007). *A decade of tau transgenic animal models and beyond*. Brain Pathol. 17, 91-103.
- Grande G, Vanacore N, Maggiore L, Cucumo V, Ghiretti R, Galimberti D, Scarpini E, Mariani C, Clerici F (2014). *Physical activity reduces the risk of dementia in mild cognitive impairment subjects: a cohort study*. J Alzheimers Dis. 39, 833-839.
- Gray SL, Anderson ML, Hubbard RA, LaCroix A, Crane PK, McCormick W, Bowen JD, McCurry SM, Larson EB (2013). *Frailty and incident dementia*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 68, 1083-1090.
- Green LA, Gambhir SS, Srinivasan A, Banerjee PK, Hoh CK, Cherry SR, Sharfstein S, Barrio JR, Herschman HR, Phelps ME (1998). *Noninvasive methods for quantitating blood time-activity curves from mouse PET images obtained with fluorine-18-fluorodeoxyglucose*. J Nucl Med. 39, 729-734.

- Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F (1993). *Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function*. Science. 259, 780-785.
- Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Campisi J, Hammack SH, Campeau S, Maier SF, Fleshner M (2003). *Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons*. J Neurosci. 23, 2889-2898.
- Griffin EW, Bechara RG, Birch AM, Kelly AM (2009). *Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism*. Hippocampus. 19, 973-980.
- Griffin EW, Mullally S, Foley C, Warmington SA, O'Mara SM, Kelly AM (2011). *Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males*. Physiol Behav. 104, 934-941.
- Group TBS (1999). *A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III)*. Neurology. 52, 1427-1433.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986). *Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments*. J Biol Chem. 261, 6084-6089.
- Grundke-Iqbal I, Johnson AB, Wisniewski HM, Terry RD, Iqbal K (1979). *Evidence that Alzheimer neurofibrillary tangles originate from neurotubules*. Lancet. 1, 578-580.
- Gsell W, Conrad R, Hickethier M, Sofic E, Frolich L, Wichart I, Jellinger K, Moll G, Ransmayr G, Beckmann H, et al. (1995). *Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type*. J Neurochem. 64, 1216-1223.
- Guiney H, Machado L (2013). *Benefits of regular aerobic exercise for executive functioning in healthy populations*. Psychon Bull Rev. 20, 73-86.
- Gussekloo J, Heeren TJ, Izaks GJ, Ligthart GJ, Rooijmans HG (1995). *A community based study of the incidence of dementia in subjects aged 85 years and over*. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 59, 507-510.
- Gustafsson G, Lira CM, Johansson J, Wisen A, Wohlfart B, Ekman R, Westrin A (2009). *The acute response of plasma brain-derived neurotrophic factor as a result of exercise in major depressive disorder*. Psychiatry Res. 169, 244-248.
- Gyls KH, Fein JA, Yang F, Wiley DJ, Miller CA, Cole GM (2004). *Synaptic changes in Alzheimer's disease: increased amyloid-beta and gliosis in surviving terminals is accompanied by decreased PSD-95 fluorescence*. Am J Pathol. 165, 1809-1817.
- Hagstromer M, Bergman P, De Bourdeaudhuij I, Ortega FB, Ruiz JR, Manios Y, Rey-Lopez JP, Philipp K, von Berlepsch J, Sjostrom M (2008). *Concurrent validity of a modified version of the International Physical*

- Activity Questionnaire (IPAQ-A) in European adolescents: The HELENA Study.* Int J Obes (Lond). 32 Suppl 5, S42-48.
- Hall CS (1934). *Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.* J. Comp. Psychol. 18, 385–403.
- Hall D, Dhillia A, Charalambous A, Gogos JA, Karayiorgou M (2003). *Sequence variants of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated with obsessive-compulsive disorder.* Am J Hum Genet. 73, 370-376.
- Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991). *Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary.* Neuron. 6, 845-858.
- Halliwell B (1996). *Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation.* Biochem Soc Trans. 24, 1023-1027.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1995). *The definition and measurement of antioxidants in biological systems.* Free Radic Biol Med. 18, 125-126.
- Hammond RS, Tull LE, Stackman RW (2004). *On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory.* Neurobiol Learn Mem. 82, 26-34.
- Hampson E (1995). *Spatial cognition in humans: possible modulation by androgens and estrogens.* J Psychiatry Neurosci. 20, 397-404.
- Han X, Zhu S, Wang B, Chen L, Li R, Yao W, Qu Z (2014). *Antioxidant action of 7,8-dihydroxyflavone protects PC12 cells against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity.* Neurochem Int. 64, 18-23.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002). *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.* Science. 297, 353-356.
- Hardy JA, Owen MJ, Goate AM, James LA, Haynes AR, Rossor MN, Roques P, Mullan MJ (1989). *Molecular genetics of Alzheimer's disease.* Biochem Soc Trans. 17, 75-76.
- Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Morl K, Meyer M, Hempstead BL, Yoon SO, Giehl KM (2004). *Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury.* Proc Natl Acad Sci U S A. 101, 6226-6230.
- Hauptmann S, Keil U, Scherping I, Bonert A, Eckert A, Muller WE (2006). *Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease.* Experimental gerontology. 41, 668-673.
- He G, Luo W, Li P, Remmers C, Netzer WJ, Hendrick J, Bettayeb K, Flajolet M, Gorelick F, Wennogle LP, Greengard P (2010). *Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease.* Nature. 467, 95-98.

- Hebert LE, Scherr PA, McCann JJ, Beckett LA, Evans DA (2001). *Is the risk of developing Alzheimer's disease greater for women than for men?* Am J Epidemiol. 153, 132-136.
- Hefti F (1994). *Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases.* J Neurobiol. 25, 1418-1435.
- Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjodin B, Richter EA (1997). *Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation.* J Physiol. 498 (Pt 1), 239-248.
- Hempstead BL (2002). *The many faces of p75NTR.* Curr Opin Neurobiol. 12, 260-267.
- Hennigan A, O'Callaghan RM, Kelly AM (2007). *Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection.* Biochem Soc Trans. 35, 424-427.
- Herholz K, Carter SF, Jones M (2007). *Positron emission tomography imaging in dementia.* Br J Radiol. 80 Spec No 2, S160-167.
- Hernandez-Sanchez C, Lopez-Carranza A, Alarcon C, de La Rosa EJ, de Pablo F (1995). *Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina.* Proc Natl Acad Sci U S A. 92, 9834-9838.
- Hernandez F, Gomez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J (2009). *GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein.* Exp Neurol. 223, 322-325.
- Heyman E, Gamelin FX, Goekint M, Piscitelli F, Roelands B, Leclair E, Di Marzo V, Meeusen R (2012). *Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans--possible implications for reward and depression.* Psychoneuroendocrinology. 37, 844-851.
- Heyn P, Abreu BC, Ottenbacher KJ (2004). *The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis.* Arch Phys Med Rehabil. 85, 1694-1704.
- Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao HT, Augustine GJ, Greengard P (1999). *Synapsins as regulators of neurotransmitter release.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 354, 269-279.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2001). *Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease.* J Neurosci. 21, 3017-3023.
- Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U (2000). *Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas.* Arch Neurol. 57, 846-851.

- Hock C, Heese K, Muller-Spahn F, Hulette C, Rosenberg C, Otten U (1998). *Decreased trkA neurotrophin receptor expression in the parietal cortex of patients with Alzheimer's disease.* Neurosci Lett. 241, 151-154.
- Hof PR, Morrison JH (1996). *Hippocampal and neocortical involvement in normal brain aging and dementia: morphological and neurochemical profile of the vulnerable circuits.* J Am Geriatr Soc. 44, 857-864.
- Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnestock M (2000). *Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease.* Brain Res Mol Brain Res. 76, 347-354.
- Holtzman DM, Mobley WC (1994). *Neurotrophic factors and neurologic disease.* West J Med. 161, 246-254.
- Horch HW, Katz LC (2002). *BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons.* Nat Neurosci. 5, 1177-1184.
- Hsu TM, Kanoski SE (2014). *Blood-brain barrier disruption: mechanistic links between Western diet consumption and dementia.* Front Aging Neurosci. 6, 88.
- Huai R, Han X, Wang B, Li C, Niu Y, Li R, Qu Z (2014). *Vasorelaxing and antihypertensive effects of 7,8-dihydroxyflavone.* Am J Hypertens. 27, 750-760.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001). *Neurotrophins: roles in neuronal development and function.* Annu Rev Neurosci. 24, 677-736.
- Huang SC, Wu HM, Shoghi-Jadid K, Stout DB, Chatziioannou A, Schelbert HR, Barrio JR (2004). *Investigation of a new input function validation approach for dynamic mouse microPET studies.* Mol Imaging Biol. 6, 34-46.
- Huang T, Larsen KT, Ried-Larsen M, Moller NC, Andersen LB (2014). *The effects of physical activity and exercise on brain-derived neurotrophic factor in healthy humans: a review.* Scand J Med Sci Sports. 24, 1-10.
- Huang WS, Lee MS, Perng HW, Yang SP, Kuo SW, Chang HD (2002). *Circulating brain natriuretic peptide values in healthy men before and after exercise.* Metabolism. 51, 1423-1426.
- Hutton M, Busfield F, Wragg M, Crook R, Perez-Tur J, Clark RF, Prihar G, Talbot C, Phillips H, Wright K, Baker M, Lendon C, Duff K, Martinez A, Houlden H, Nichols A, Karran E, Roberts G, Roques P, Rossor M, Venter JC, Adams MD, Cline RT, Phillips CA, Goate A, et al. (1996). *Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease.* Neuroreport. 7, 801-805.
- Ingram DK (1983). *Toward the behavioral assessment of biological aging in the laboratory mouse: concepts, terminology, and objectives.* Exp Aging Res. 9, 225-238.

- Intlekofer KA, Cotman CW (2013). *Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis. 57, 47-55.
- Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R, 3rd, Squinto SP, et al. (1992). *Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 3060-3064.
- Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, Wilson WD, Xiao G, Bianchi B, Sun YE, Ye K (2010). *A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone*. Proc Natl Acad Sci U S A. 107, 2687-2692.
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR (2004). *Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase*. Hum Mol Genet. 13, 159-170.
- Jankowsky JL, Xu G, Fromholt D, Gonzales V, Borchelt DR (2003). *Environmental enrichment exacerbates amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol. 62, 1220-1227.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002). *Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 11946-11950.
- Johnson RA, Lam M, Punzo AM, Li H, Lin BR, Ye K, Mitchell GS, Chang Q (2012). *7,8-dihydroxyflavone exhibits therapeutic efficacy in a mouse model of Rett syndrome*. J Appl Physiol. 112, 704-710.
- Jorm AF, Korten AE, Henderson AS (1987). *The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature*. Acta Psychiatr Scand. 76, 465-479.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003). *APP processing and synaptic function*. Neuron. 37, 925-937.
- Kandel ER (1998). *A new intellectual framework for psychiatry*. Am J Psychiatry. 155, 457-469.
- Kang H, Schuman EM (1995). *Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus*. Science. 267, 1658-1662.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987). *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. Nature. 325, 733-736.
- Kappeler L, De Magalhaes Filho C, Dupont J, Leneuve P, Cervera P, Perin L, Loudes C, Blaise A, Klein R, Epelbaum J, Le Bouc Y, Holzenberger M

- (2008). *Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism*. PLoS Biol. 6, e254.
- Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM, Bertschy G (2005). *Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity*. Biol Psychiatry. 57, 1068-1072.
- Karege F, Schwald M, Cisse M (2002). *Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets*. Neurosci Lett. 328, 261-264.
- Karsten SL, Geschwind DH (2005). *Exercise your amyloid*. Cell. 120, 572-574.
- Kato K, Kurobe N, Suzuki F, Morishita R, Asano T, Sato T, Inagaki T (1991). *Concentrations of several proteins characteristic of nervous tissue in cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease*. J Mol Neurosci. 3, 95-99.
- Katoh-Semba R, Wakako R, Komori T, Shigemi H, Miyazaki N, Ito H, Kumagai T, Tsuzuki M, Shigemi K, Yoshida F, Nakayama A (2007). *Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls*. Int J Dev Neurosci. 25, 367-372.
- Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, Miller CM, Loffredo FS, Wojtkiewicz GR, Chen JW, Lee RT, Wagers AJ, Rubin LL (2014). *Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors*. Science. 344, 630-634.
- Ke HC, Huang HJ, Liang KC, Hsieh-Li HM (2011). *Selective improvement of cognitive function in adult and aged APP/PS1 transgenic mice by continuous non-shock treadmill exercise*. Brain Res. 1403, 1-11.
- Keil U, Hauptmann S, Bonert A, Scherping I, Eckert A, Muller WE (2006). *Mitochondrial dysfunction induced by disease relevant AbetaPP and tau protein mutations*. J Alzheimers Dis. 9, 139-146.
- Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR (2000). *Impaired proteasome function in Alzheimer's disease*. J Neurochem. 75, 436-439.
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfield R (1999). *Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?* J Exp Med. 189, 865-870.
- Kerwin DR, Zhang Y, Kotchen JM, Espeland MA, Van Horn L, McTigue KM, Robinson JG, Powell L, Kooperberg C, Coker LH, Hoffmann R (2010). *The cross-sectional relationship between body mass index, waist-hip ratio, and cognitive performance in postmenopausal women enrolled in the Women's Health Initiative*. J Am Geriatr Soc. 58, 1427-1432.

- Kim D, Tsai LH (2009). *Bridging physiology and pathology in AD*. Cell. 137, 997-1000.
- Kim J, Herrero P, Sharp T, Laforest R, Rowland DJ, Tai YC, Lewis JS, Welch MJ (2006). *Minimally invasive method of determining blood input function from PET images in rodents*. J Nucl Med. 47, 330-336.
- Kim KC, Lee IK, Kang KA, Cha JW, Cho SJ, Na SY, Chae S, Kim HS, Kim S, Hyun JW (2013). *7,8-Dihydroxyflavone suppresses oxidative stress-induced base modification in DNA via induction of the repair enzyme 8-oxoguanine DNA glycosylase-1*. Biomed Res Int. 2013, 863720.
- King DL, Arendash GW (2002). *Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: correlations with cognitive impairment*. Brain Res. 926, 58-68.
- King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan MJ (1999). *Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease*. Behav Brain Res. 103, 145-162.
- Kivipelto M, Solomon A (2008). *Alzheimer's disease - the ways of prevention*. J Nutr Health Aging. 12, 89S-94S.
- Knaepen K, Goekint M, Heyman EM, Meeusen R (2010). *Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects*. Sports Med. 40, 765-801.
- Knochel C, Oertel-Knochel V, O'Dwyer L, Prvulovic D, Alves G, Kollmann B, Hampel H (2012). *Cognitive and behavioural effects of physical exercise in psychiatric patients*. Prog Neurobiol. 96, 46-68.
- Koch JM, Hinze-Selch D, Stingele K, Huchzermeier C, Goder R, Seeck-Hirschner M, Aldenhoff JB (2009). *Changes in CREB phosphorylation and BDNF plasma levels during psychotherapy of depression*. Psychother Psychosom. 78, 187-192.
- Komulainen P, Pedersen M, Hanninen T, Bruunsgaard H, Lakka TA, Kivipelto M, Hassinen M, Rauramaa TH, Pedersen BK, Rauramaa R (2008). *BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: the DR's EXTRA Study*. Neurobiol Learn Mem. 90, 596-603.
- Koo HM, Lee SM, Kim MH (2013). *Spontaneous Wheel Running Exercise Induces Brain Recovery via Neurotrophin-3 Expression Following Experimental Traumatic Brain Injury in Rats*. J Phys Ther Sci. 25, 1103-1107.
- Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P (2000). *Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease*. Science. 290, 767-773.

- Koshimizu H, Kiyosue K, Hara T, Hazama S, Suzuki S, Uegaki K, Nagappan G, Zaitsev E, Hirokawa T, Tatsu Y, Ogura A, Lu B, Kojima M (2009). *Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival.* Mol Brain. 2, 27.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986). *Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease.* Proc Natl Acad Sci U S A. 83, 4044-4048.
- Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK (1995). *LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation.* Cell. 82, 331-340.
- Koziris LP, Hickson RC, Chatterton RT, Jr., Groseth RT, Christie JM, Goldflies DG, Unterman TG (1999). *Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training.* J Appl Physiol (1985). 86, 1436-1442.
- Kraemer WJ, Aguilera BA, Terada M, Newton RU, Lynch JM, Rosendaal G, McBride JM, Gordon SE, Hakkinen K (1995). *Responses of IGF-I to endogenous increases in growth hormone after heavy-resistance exercise.* J Appl Physiol (1985). 79, 1310-1315.
- Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A (1999). *Ageing, fitness and neurocognitive function.* Nature. 400, 418-419.
- Lace GL, Wharton SB, Ince PG (2007). *A brief history of tau: the evolving view of the microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases.* Clin Neuropathol. 26, 43-58.
- LaFerla FM, Oddo S (2005). *Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction.* Trends Mol Med. 11, 170-176.
- Laforest R, Sharp TL, Engelbach JA, Fetting NM, Herrero P, Kim J, Lewis JS, Rowland DJ, Tai YC, Welch MJ (2005). *Measurement of input functions in rodents: challenges and solutions.* Nucl Med Biol. 32, 679-685.
- Lahiri DK, Maloney B (2010). *The "LEARn" (Latent Early-life Associated Regulation) model integrates environmental risk factors and the developmental basis of Alzheimer's disease, and proposes remedial steps.* Experimental gerontology. 45, 291-296.
- Lam XM, Duenas ET, Daugherty AL, Levin N, Cleland JL (2000). *Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes.* J Control Release. 67, 281-292.
- Langley JN (1895). *Note on Regeneration of Prae-Ganglionic Fibres of the Sympathetic.* J Physiol. 18, 280-284.
- Larson EB (2008). *Physical activity for older adults at risk for Alzheimer disease.* JAMA. 300, 1077-1079.

- Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P, Kukull W (2006). *Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older.* Ann Intern Med. 144, 73-81.
- Laske C, Banschbach S, Stransky E, Bosch S, Straten G, Machann J, Fritsche A, Hipp A, Niess A, Eschweiler GW (2010). *Exercise-induced normalization of decreased BDNF serum concentration in elderly women with remitted major depression.* Int J Neuropsychopharmacol. 13, 595-602.
- Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009). *Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers.* Nature. 457, 1128-1132.
- Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, Rockwood K (2001). *Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons.* Arch Neurol. 58, 498-504.
- Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, Ranaldi S, Fraser P, St-George-Hyslop P, Le Thuc O, Espin V, Chami L, Dunys J, Checler F (2012). *The beta-secretase-derived C-terminal fragment of betaAPP, C99, but not Abeta, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus.* J Neurosci. 32, 16243-16255a.
- Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS (2005). *Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice.* Cell. 120, 701-713.
- Lee E, Son H (2009). *Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors.* BMB Rep. 42, 239-244.
- Lee FS, Kim AH, Khursigara G, Chao MV (2001a). *The uniqueness of being a neurotrophin receptor.* Curr Opin Neurobiol. 11, 281-286.
- Lee J, Duan W, Mattson MP (2002). *Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice.* J Neurochem. 82, 1367-1375.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001b). *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.* Science. 294, 1945-1948.
- Lee TM, Wong ML, Lau BW, Lee JC, Yau SY, So KF (2014). *Aerobic exercise interacts with neurotrophic factors to predict cognitive functioning in adolescents.* Psychoneuroendocrinology. 39, 214-224.
- Lee VM, Balin BJ, Otvos L, Jr., Trojanowski JQ (1991). *A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau.* Science. 251, 675-678.
- Lessmann V, Gottmann K, Heumann R (1994). *BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones.* Neuroreport. 6, 21-25.

- Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951). *Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo*. J Exp Zool. 116, 321-361.
- Levinger I, Goodman C, Matthews V, Hare DL, Jerums G, Garnham A, Selig S (2008). *BDNF, metabolic risk factors, and resistance training in middle-aged individuals*. Med Sci Sports Exerc. 40, 535-541.
- Li F, Calingasan NY, Yu F, Mauck WM, Toidze M, Almeida CG, Takahashi RH, Carlson GA, Flint Beal M, Lin MT, Gouras GK (2004). *Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice*. J Neurochem. 89, 1308-1312.
- Liang XB, Liu XY, Li FQ, Luo Y, Lu J, Zhang WM, Wang XM, Han JS (2002). *Long-term high-frequency electro-acupuncture stimulation prevents neuronal degeneration and up-regulates BDNF mRNA in the substantia nigra and ventral tegmental area following medial forebrain bundle axotomy*. Brain Res Mol Brain Res. 108, 51-59.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993). *GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons*. Science. 260, 1130-1132.
- Little M, Seehaus T (1988). *Comparative analysis of tubulin sequences*. Comp Biochem Physiol B. 90, 655-670.
- Liu X, Chan CB, Qi Q, Xiao G, Luo HR, He X, Ye K (2012). *Optimization of a small tropomyosin-related kinase B (TrkB) agonist 7,8-dihydroxyflavone active in mouse models of depression*. J Med Chem. 55, 8524-8537.
- Liu YF, Chen HI, Wu CL, Kuo YM, Yu L, Huang AM, Wu FS, Chuang JI, Jen CJ (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, 3221-3231.
- Lohof AM, Ip NY, Poo MM (1993). *Potential of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF*. Nature. 363, 350-353.
- Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC (2005). *The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma*. Neurobiol Aging. 26, 115-123.
- Lopez-Lopez C, LeRoith D, Torres-Aleman I (2004). *Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 101, 9833-9838.
- López López C, Carro Díaz EM, Torres Alemán I, Torrado J, Carrascosa C, Torrado S (2004). *Composición química de IGF-I para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas*. (CSdI Científicas, UCd Madrid, ed^eds). Spain.

- Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR (1995). *Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease*. Neurology. 45, 1594-1601.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem. 193, 265-275.
- Lu B, Chang JH (2004). *Regulation of neurogenesis by neurotrophins: implications in hippocampus-dependent memory*. Neuron Glia Biol. 1, 377-384.
- Lucia A, Ruiz JR (2011). *Exercise is beneficial for patients with Alzheimer's disease: a call for action*. Br J Sports Med. 45, 468-469.
- Luo F, Rustay NR, Ebert U, Hradil VP, Cole TB, Llano DA, Mudd SR, Zhang Y, Fox GB, Day M (2012). *Characterization of 7- and 19-month-old Tg2576 mice using multimodal in vivo imaging: limitations as a translatable model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging. 33, 933-944.
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL (2008). *Growth factors as mediators of exercise actions on the brain*. Neuromolecular Med. 10, 99-107.
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL (2009). *Mechanisms mediating brain plasticity: IGF1 and adult hippocampal neurogenesis*. Neuroscientist. 15, 134-148.
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL (2010). *Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour*. Mol Cell Neurosci. 44, 109-117.
- Lloret A, Badia MC, Mora NJ, Ortega A, Pallardo FV, Alonso MD, Atamna H, Vina J (2008). *Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease*. Free Radic Biol Med. 44, 2019-2025.
- Lloret A, Badia MC, Mora NJ, Pallardo FV, Alonso MD, Vina J (2009). *Vitamin E paradox in Alzheimer's disease: it does not prevent loss of cognition and may even be detrimental*. J Alzheimers Dis. 17, 143-149.
- Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Hayashida N, Asada-Utsugi M, Watanabe K, Uemura M, Kihara T, Takahashi R, Shimohama S, Kinoshita A (2012). *Exercise is more effective than diet control in preventing high fat diet-induced beta-amyloid deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice*. J Biol Chem. 287, 23024-23033.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990). *Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF*. Science. 247, 1446-1451.
- Maki PM, Henderson VW (2012). *Hormone therapy, dementia, and cognition: the Women's Health Initiative 10 years on*. Climacteric. 15, 256-262.
- Manczak M, Park BS, Jung Y, Reddy PH (2004). *Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease:*

- implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage. Neuromolecular Med. 5, 147-162.*
- Markesbery WR (1997). *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. Free Radic Biol Med. 23, 134-147.*
- Marshall WA, Tanner JM (1970). *Variations in the pattern of pubertal changes in boys. Arch Dis Child. 45, 13-23.*
- Martinowich K, Manji H, Lu B (2007). *New insights into BDNF function in depression and anxiety. Nat Neurosci. 10, 1089-1093.*
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985). *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 4245-4249.*
- Matsuoka Y, Picciano M, La Francois J, Duff K (2001). *Fibrillar beta-amyloid evokes oxidative damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience. 104, 609-613.*
- Matthews VB, Astrom MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerstrom T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA (2009). *Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. Diabetologia. 52, 1409-1418.*
- Mattson MP (2004). *Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature. 430, 631-639.*
- Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR (1995). *Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. J Neurochem. 65, 1740-1751.*
- McArdle WD, Katch, F.I, Katch, V.L (2004). *Fisiología del ejercicio.*
- McCusker RH, McCrear K, Zurich S, Dantzer R, Broussard SR, Johnson RW, Kelley KW (2006). *Insulin-like growth factor-I enhances the biological activity of brain-derived neurotrophic factor on cerebrocortical neurons. J Neuroimmunol. 179, 186-190.*
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF (1994). *Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. Ann Neurol. 36, 747-751.*
- Meinel L, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Peter Merkle H, Gander B (2001). *Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. J Control Release. 70, 193-202.*
- Merlio JP, Ernfors P, Kokaia Z, Middlemas DS, Bengzon J, Kokaia M, Smith ML, Siesjo BK, Hunter T, Lindvall O, et al. (1993). *Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. Neuron. 10, 151-164.*

- Meyer EP, Ulmann-Schuler A, Staufenbiel M, Krucker T (2008). *Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. 105, 3587-3592.
- Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Wyse BW, Breitner JC (1998). *APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease*. Nat Genet. 19, 321-322.
- Middleton LE, Mitnitski A, Fallah N, Kirkland SA, Rockwood K (2008). *Changes in cognition and mortality in relation to exercise in late life: a population based study*. PLoS One. 3, e3124.
- Molsa PK, Marttila RJ, Rinne UK (1982). *Epidemiology of dementia in a Finnish population*. Acta Neurol Scand. 65, 541-552.
- Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge JM (1987). *Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers*. FEBS Lett. 213, 23-28.
- Mosconi L, Tsui WH, De Santi S, Li J, Rusinek H, Convit A, Li Y, Boppana M, de Leon MJ (2005). *Reduced hippocampal metabolism in MCI and AD: automated FDG-PET image analysis*. Neurology. 64, 1860-1867.
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA (2001). *Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor*. J Biol Chem. 276, 12660-12666.
- Muller M, Cardenas C, Mei L, Cheung KH, Foskett JK (2011). *Constitutive cAMP response element binding protein (CREB) activation by Alzheimer's disease presenilin-driven inositol trisphosphate receptor (InsP3R) Ca²⁺ signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 13293-13298.
- Mungarro-Menchaca X, Ferrera P, Moran J, Arias C (2002). *beta-Amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine*. J Neurosci Res. 68, 89-96.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R (2001). *Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. Prog Neurobiol. 63, 71-124.
- Myers J, Kaykha A, George S, Abella J, Zaheer N, Lear S, Yamazaki T, Froelicher V (2004). *Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men*. Am J Med. 117, 912-918.
- Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE (2002). *Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing*. N Engl J Med. 346, 793-801.
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH (2009). *Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease*. Nat Med. 15, 331-337.

- Nagahara AH, Tuszynski MH (2011). *Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders*. Nat Rev Drug Discov. 10, 209-219.
- Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B (2000). *Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor*. FEBS Lett. 470, 113-117.
- Naylor R, Hill AF, Barnham KJ (2008). *Is covalently crosslinked Aβ responsible for synaptotoxicity in Alzheimer's disease?* Curr Alzheimer Res. 5, 533-539.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C (1995). *Exercise and brain neurotrophins*. Nature. 373, 109.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW (1996). *Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain*. Brain Res. 726, 49-56.
- Nelson TJ, Alkon DL (2005). *Insulin and cholesterol pathways in neuronal function, memory and neurodegeneration*. Biochem Soc Trans. 33, 1033-1036.
- Nestor PJ, Scheltens P, Hodges JR (2004). *Advances in the early detection of Alzheimer's disease*. Nat Med. 10 Suppl, S34-41.
- Nguyen UN, Mougín F, Simon-Rigaud ML, Rouillon JD, Marguet P, Regnard J (1998). *Influence of exercise duration on serum insulin-like growth factor and its binding proteins in athletes*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 78, 533-537.
- Nichol K, Deeny SP, Seif J, Camaclang K, Cotman CW (2009). *Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE ε4 mice*. Alzheimers Dement. 5, 287-294.
- Nichol KE, Parachikova AI, Cotman CW (2007). *Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse*. Behav Brain Res. 184, 124-132.
- Nichol KE, Poon WW, Parachikova AI, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW (2008). *Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid*. J Neuroinflammation. 5, 13.
- Niwa K, Kazama K, Younkin SG, Carlson GA, Iadecola C (2002). *Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein*. Neurobiol Dis. 9, 61-68.
- Nofuji Y, Suwa M, Moriyama Y, Nakano H, Ichimiya A, Nishichi R, Sasaki H, Radak Z, Kumagai S (2008). *Decreased serum brain-derived neurotrophic factor in trained men*. Neurosci Lett. 437, 29-32.
- Noga O, Englmann C, Hanf G, Grutzkau A, Seybold J, Kunkel G (2003). *The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human*

- peripheral eosinophils in allergics and non-allergics.* Clin Exp Allergy. 33, 649-654.
- Ntanasis-Stathopoulos J, Tzanninis JG, Philippou A, Koutsilieris M (2013). *Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise.* J Musculoskelet Neuronal Interact. 13, 133-146.
- Nunez A, Carro E, Torres-Aleman I (2003). *Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons.* J Neurophysiol. 89, 3008-3017.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA (2001). *Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease.* J Neuropathol Exp Neurol. 60, 759-767.
- O'Bryant SE, Hobson V, Hall JR, Waring SC, Chan W, Massman P, Lacritz L, Cullum CM, Diaz-Arrastia R (2009). *Brain-derived neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis. 17, 337-341.
- O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM (2007). *The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning.* Behav Brain Res. 176, 362-366.
- O'Leary PD, Hughes RA (2003). *Design of potent peptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor.* J Biol Chem. 278, 25738-25744.
- Ochs G, Penn RD, York M, Giess R, Beck M, Tonn J, Haigh J, Malta E, Traub M, Sendtner M, Toyka KV (2000). *A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis.* Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 1, 201-206.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003a). *Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging. 24, 1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003b). *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction.* Neuron. 39, 409-421.
- Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, Radak Z (2005). *The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain.* Neurochem Int. 46, 635-640.
- Ohya Y (2008). *Intracellular amyloid beta-protein as a therapeutic target for treating Alzheimer's disease.* Curr Alzheimer Res. 5, 555-561.
- Oppenheim RW (1991). *Cell death during development of the nervous system.* Annu Rev Neurosci. 14, 453-501.
- Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, Michel BF, Boada M, Frank A, Hock C

- (2003). *Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization*. Neurology. 61, 46-54.
- Pacifici RE, Davies KJ (1991). *Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited*. Gerontology. 37, 166-180.
- Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ (1998). *Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier*. Neuropharmacology. 37, 1553-1561.
- Parachikova A, Nichol KE, Cotman CW (2008). *Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition*. Neurobiol Dis. 30, 121-129.
- Pareja-Galeano H, Brioché T, Sanchis-Gomar F, Escrivá C, Dromant M, Gomez-Cabrera MC, Vina J (2012). *[Effects of physical exercise on cognitive alterations and oxidative stress in an APP/PSN1 transgenic model of Alzheimer's disease]*. Rev Esp Geriatr Gerontol. 47, 198-204.
- Pareja-Galeano H, Brioché T, Sanchis-Gomar F, Montal A, Jovani C, Martínez-Costa C, Gomez-Cabrera MC, Vina J (2013a). *Impact of exercise training on neuroplasticity-related growth factors in adolescents*. J Musculoskelet Neuronal Interact. 13, 330-333.
- Pareja-Galeano H, Sanchis-Gomar F, Garcia-Gimenez JL (2014). *Physical exercise and epigenetic modulation: elucidating intricate mechanisms*. Sports Med. 44, 429-436.
- Pareja-Galeano H, Sanchis-Gomar F, Mayero S (2013b). *Autism spectrum disorders: possible implications of BDNF modulation through epigenetics*. Acta Psychiatr Scand. 128, 97.
- Pascual-Leone A, Amedi A, Fregni F, Merabet LB (2005). *The plastic human brain cortex*. Annu Rev Neurosci. 28, 377-401.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001). *Trk receptors: mediators of neurotrophin action*. Curr Opin Neurobiol. 11, 272-280.
- Pedersen BK, Pedersen M, Krabbe KS, Bruunsgaard H, Matthews VB, Febbraio MA (2009). *Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals*. Exp Physiol. 94, 1153-1160.
- Peng S, Garzon DJ, Marchese M, Klein W, Ginsberg SD, Francis BM, Mount HT, Mufson EJ, Salehi A, Fahnstock M (2009). *Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease*. J Neurosci. 29, 9321-9329.
- Pereira C, Santos MS, Oliveira C (1998). *Mitochondrial function impairment induced by amyloid beta-peptide on PC12 cells*. Neuroreport. 9, 1749-1755.

- Pereira C, Santos MS, Oliveira C (1999). *Involvement of oxidative stress on the impairment of energy metabolism induced by A beta peptides on PC12 cells: protection by antioxidants.* Neurobiol Dis. 6, 209-219.
- Petit-Taboue MC, Landeau B, Desson JF, Desgranges B, Baron JC (1998). *Effects of healthy aging on the regional cerebral metabolic rate of glucose assessed with statistical parametric mapping.* Neuroimage. 7, 176-184.
- Pflanzner T, Janko MC, Andre-Dohmen B, Reuss S, Weggen S, Roebroek AJ, Kuhlmann CR, Pietrzik CU (2011). *LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid-beta across the blood-brain barrier.* Neurobiol Aging. 32, 2323 e2321-2311.
- Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramee GR, Johnson SA, Winslow JW (1991). *BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease.* Neuron. 7, 695-702.
- Pietro Paolo S, Feldon J, Alleva E, Cirulli F, Yee BK (2006). *The role of voluntary exercise in enriched rearing: a behavioral analysis.* Behav Neurosci. 120, 787-803.
- Ploughman M, Granter-Button S, Chernenko G, Tucker BA, Mearow KM, Corbett D (2005). *Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia.* Neuroscience. 136, 991-1001.
- Poisnel G, Herard AS, El Tannir El Tayara N, Bourrin E, Volk A, Kober F, Delatour B, Delzescaux T, Debeir T, Rooney T, Benavides J, Hantraye P, Dhenain M (2012). *Increased regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 model of Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging. 33, 1995-2005.
- Pompili A, Arnone B, Gasbarri A (2012). *Estrogens and memory in physiological and neuropathological conditions.* Psychoneuroendocrinology. 37, 1379-1396.
- Ponte P, Gonzalez-DeWhitt P, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I, Fuller F (1988). *A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors.* Nature. 331, 525-527.
- Pozzo-Miller LD, Gottschalk W, Zhang L, McDermott K, Du J, Gopalakrishnan R, Oho C, Sheng ZH, Lu B (1999). *Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice.* J Neurosci. 19, 4972-4983.
- Pratico D (2008). *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal.* Trends Pharmacol Sci. 29, 609-615.
- Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM (2001). *Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis.* J Neurosci. 21, 4183-4187.

- Prelli F, Castano E, Glenner GG, Frangione B (1988). *Differences between vascular and plaque core amyloid in Alzheimer's disease*. J Neurochem. 51, 648-651.
- 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.
- Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T (2007). *Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters*. Genomics. 90, 397-406.
- Pugazhenth S, Wang M, Pham S, Sze CI, Eckman CB (2011). *Downregulation of CREB expression in Alzheimer's brain and in Abeta-treated rat hippocampal neurons*. Mol Neurodegener. 6, 60.
- Purves D (1988). *Body and brain: a trophic theory of neural connections*. Cambridge: Harvard University Press.
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010). *Alzheimer's disease*. N Engl J Med. 362, 329-344.
- Raap U, Goltz C, Deneka N, Bruder M, Renz H, Kapp A, Wedi B (2005). *Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects*. J Allergy Clin Immunol. 115, 1268-1275.
- Radak Z, Chung HY, Goto S (2008a). *Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise*. Free Radic Biol Med. 44, 153-159.
- Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S (2008b). *Exercise, oxidative stress and hormesis*. Ageing Res Rev. 7, 34-42.
- Radak Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I (2010). *Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis. 20, 777-783.
- Radak Z, Ihasz F, Koltai E, Goto S, Taylor AW, Boldogh I (2014). *The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise*. Free Radic Res. 48, 84-92.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsok J, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (2001a). *Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain*. Neurochem Int. 38, 17-23.
- Radak Z, Kumagai S, Taylor AW, Naito H, Goto S (2007). *Effects of exercise on brain function: role of free radicals*. Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme. 32, 942-946.
- Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S (2001b). *Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain*. Exercise immunology review. 7, 90-107.
- Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S (2006). *The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain*. Neurochem Int. 49, 387-392.

- Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA (1996). *Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay.* Brain Res. 709, 122-301.
- Raichlen DA, Alexander GE (2014). *Exercise, APOE genotype, and the evolution of the human lifespan.* Trends Neurosci. 37, 247-255.
- Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Davignon J, Quirion R, Poirier J (1999). *Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype.* Free Radic Biol Med. 27, 544-553.
- Ramon y Cajal S (1928). *Degeneration and regeneration of the nervous system:* Hafner, New York.
- Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H (2009). *Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise.* Exp Physiol. 94, 1062-1069.
- Reddy PH, Beal MF (2008). *Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease.* Trends Mol Med. 14, 45-53.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW (1980). *High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides.* Anal Biochem. 106, 55-62.
- Reiman EM, Uecker A, Gonzalez-Lima F, Minear D, Chen K, Callaway NL, Berndt JD, Games D (2000). *Tracking Alzheimer's disease in transgenic mice using fluorodeoxyglucose autoradiography.* Neuroreport. 11, 987-991.
- Reinhardt RR, Bondy CA (1994). *Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier.* Endocrinology. 135, 1753-1761.
- Resende R, Moreira PI, Proenca T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveira CR (2008). *Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease.* Free Radic Biol Med. 44, 2051-2057.
- Revilla S, Sunol C, Garcia-Mesa Y, Gimenez-Llort L, Sanfeliu C, Cristofol R (2014). *Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain.* Neuropharmacology. 81, 55-63.
- Rice ME (2000). *Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain.* Trends Neurosci. 23, 209-216.
- Richner M, Bach G, West MJ (2009). *Over expression of amyloid beta-protein reduces the number of neurons in the striatum of APP^{swe}/PS1^{DeltaE9}.* Brain Res. 1266, 87-92.

- Richter H, Ambree O, Lewejohann L, Herring A, Keyvani K, Paulus W, Palme R, Touma C, Schabitz WR, Sachser N (2008). *Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: protection or symptom?* Behav Brain Res. 190, 74-84.
- Robinson RC, Radziejewski C, Stuart DI, Jones EY (1995). *Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer.* Biochemistry. 34, 4139-4146.
- Rocca WA, Cha RH, Waring SC, Kokmen E (1998). *Incidence of dementia and Alzheimer's disease: a reanalysis of data from Rochester, Minnesota, 1975-1984.* Am J Epidemiol. 148, 51-62.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. (1995). *Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene.* Nature. 376, 775-778.
- Rogers SD, Jarrot SE (2008). *Cognitive impairment and effects on upper body strength of adults with dementia.* J Aging Phys Act. 16, 61-68.
- Rojas Vega S, Abel T, Lindschulten R, Hollmann W, Bloch W, Struder HK (2008). *Impact of exercise on neuroplasticity-related proteins in spinal cord injured humans.* Neuroscience. 153, 1064-1070.
- Rojas Vega S, Hollmann W, Vera Wahrmann B, Struder HK (2012). *pH buffering does not influence BDNF responses to exercise.* Int J Sports Med. 33, 8-12.
- Rojas Vega S, Struder HK, Vera Wahrmann B, Schmidt A, Bloch W, Hollmann W (2006). *Acute BDNF and cortisol response to low intensity exercise and following ramp incremental exercise to exhaustion in humans.* Brain Res. 1121, 59-65.
- Rolland Y, Abellan van Kan G, Vellas B (2008). *Physical activity and Alzheimer's disease: from prevention to therapeutic perspectives.* J Am Med Dir Assoc. 9, 390-405.
- Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo J, Radka SF, Bennett L, Miller JA, Welcher AA (1995). *Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum.* Protein Expr Purif. 6, 465-471.
- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M (2006). *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment.* Eur J Neurosci. 24, 1850-1856.
- Rost B, Hanf G, Ohnemus U, Otto-Knapp R, Groneberg DA, Kunkel G, Noga O (2005). *Monocytes of allergics and non-allergics produce, store and release the neurotrophins NGF, BDNF and NT-3.* Regul Pept. 124, 19-25.
- Roux PP, Barker PA (2002). *Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor.* Prog Neurobiol. 67, 203-233.

- Roux PP, Colicos MA, Barker PA, Kennedy TE (1999). *p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure*. J Neurosci. 19, 6887-6896.
- Rovio S, Kareholt I, Helkala EL, Viitanen M, Winblad B, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A, Kivipelto M (2005). *Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease*. Lancet Neurol. 4, 705-711.
- Russo-Neustadt AA, Chen MJ (2005). *Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity*. Curr Pharm Des. 11, 1495-1510.
- Sagare AP, Deane R, Zlokovic BV (2012). *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: a physiological Abeta homeostatic mechanism with multiple therapeutic opportunities*. Pharmacol Ther. 136, 94-105.
- Salehi AH, Xanthoudakis S, Barker PA (2002). *NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway*. J Biol Chem. 277, 48043-48050.
- Salminen A, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T (2009). *Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-beta oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors*. Prog Neurobiol. 87, 181-194.
- Salmon WD, Jr., Daughaday WH (1957). *A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro*. J Lab Clin Med. 49, 825-836.
- Sanchis-Gomar F, Lippi G (2014). *Physical activity - an important preanalytical variable*. Biochem Med (Zagreb). 24, 68-79.
- Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ (1997). *A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study*. N Engl J Med. 336, 1216-1222.
- Santana-Sosa E, Barriopedro MI, Lopez-Mojares LM, Perez M, Lucia A (2008). *Exercise training is beneficial for Alzheimer's patients*. Int J Sports Med. 29, 845-850.
- Santos AR, Comprido D, Duarte CB (2010). *Regulation of local translation at the synapse by BDNF*. Prog Neurobiol. 92, 505-516.
- Sara VR, Hall K (1990). *Insulin-like growth factors and their binding proteins*. Physiol Rev. 70, 591-614.
- Sastre J, Asensi M, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T, Vina J (1992). *Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration*. Am J Physiol. 263, R992-995.

- Saura CA, Valero J (2011). *The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders*. Rev Neurosci. 22, 153-169.
- Savaskan E, Muller-Spahn F, Olivieri G, Bruttel S, Otten U, Rosenberg C, Hulette C, Hock C (2000). *Alterations in trk A, trk B and trk C receptor immunoreactivities in parietal cortex and cerebellum in Alzheimer's disease*. Eur Neurol. 44, 172-180.
- Savonenko A, Xu GM, Melnikova T, Morton JL, Gonzales V, Wong MP, Price DL, Tang F, Markowska AL, Borchelt DR (2005). *Episodic-like memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities*. Neurobiol Dis. 18, 602-617.
- Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA (1997). *4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease*. J Neurochem. 68, 2092-2097.
- Scarmeas N, Levy G, Tang MX, Manly J, Stern Y (2001). *Influence of leisure activity on the incidence of Alzheimer's disease*. Neurology. 57, 2236-2242.
- Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, Stern Y (2009). *Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease*. JAMA. 302, 627-637.
- Scharfman HE, MacLusky NJ (2014). *Differential regulation of BDNF, synaptic plasticity and sprouting in the hippocampal mossy fiber pathway of male and female rats*. Neuropharmacology. 76 Pt C, 696-708.
- Scheff SW, Scott SA, DeKosky ST (1991). *Quantitation of synaptic density in the septal nuclei of young and aged Fischer 344 rats*. Neurobiol Aging. 12, 3-12.
- Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. (1992). *Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14*. Science. 258, 668-671.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P (1999). *Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse*. Nature. 400, 173-177.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S (1996). *Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin*

- 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease.* Nat Med. 2, 864-870.
- Schiffer T, Schulte S, Hollmann W, Bloch W, Struder HK (2009). *Effects of strength and endurance training on brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor 1 in humans.* Horm Metab Res. 41, 250-254.
- Schiffer WK, Mirrione MM, Dewey SL (2007). *Optimizing experimental protocols for quantitative behavioral imaging with 18F-FDG in rodents.* J Nucl Med. 48, 277-287.
- Schinder AF, Poo M (2000). *The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity.* Trends Neurosci. 23, 639-645.
- Schindowski K, Belarbi K, Buee L (2008). *Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport.* Genes Brain Behav. 7 Suppl 1, 43-56.
- Schmechel DE, Goldgaber D, Burkhardt DS, Gilbert JR, Gajdusek DC, Roses AD (1988). *Cellular localization of messenger RNA encoding amyloid-beta-protein in normal tissue and in Alzheimer disease.* Alzheimer Dis Assoc Disord. 2, 96-111.
- Schonberger SJ, Edgar PF, Kydd R, Faull RL, Cooper GJ (2001). *Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: molecular phenotype of a complex disease process.* Proteomics. 1, 1519-1528.
- Schuessel K, Schafer S, Bayer TA, Czech C, Pradier L, Muller-Spahn F, Muller WE, Eckert A (2005). *Impaired Cu/Zn-SOD activity contributes to increased oxidative damage in APP transgenic mice.* Neurobiol Dis. 18, 89-99.
- Schulz KH, Gold SM, Witte J, Bartsch K, Lang UE, Hellweg R, Reer R, Braumann KM, Heesen C (2004). *Impact of aerobic training on immune-endocrine parameters, neurotrophic factors, quality of life and coordinative function in multiple sclerosis.* J Neurol Sci. 225, 11-18.
- Schwarz AJ, Brasel JA, Hintz RL, Mohan S, Cooper DM (1996). *Acute effect of brief low- and high-intensity exercise on circulating insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF-binding protein-3 and its proteolysis in young healthy men.* J Clin Endocrinol Metab. 81, 3492-3497.
- Seifert T, Brassard P, Wissenberg M, Rasmussen P, Nordby P, Stallknecht B, Adser H, Jakobsen AH, Pilegaard H, Nielsen HB, Secher NH (2010). *Endurance training enhances BDNF release from the human brain.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 298, R372-377.
- Selkoe DJ (1997). *Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments.* Science. 275, 630-631.
- Selkoe DJ (2000). *Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein.* Ann N Y Acad Sci. 924, 17-25.

- Senechal Y, Kelly PH, Dev KK (2008). *Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning*. Behav Brain Res. 186, 126-132.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al. (1992). *Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids*. Nature. 359, 325-327.
- Sharma K, Mehra RD, Dhar P, Vij U (2007). *Chronic exposure to estrogen and tamoxifen regulates synaptophysin and phosphorylated cAMP response element-binding (CREB) protein expression in CA1 of ovariectomized rat hippocampus*. Brain Res. 1132, 10-19.
- Sharma S, Prasanthi RPJ, Schommer E, Feist G, Ghribi O (2008). *Hypercholesterolemia-induced Abeta accumulation in rabbit brain is associated with alteration in IGF-1 signaling*. Neurobiol Dis. 32, 426-432.
- Shen CC, Wertelecki W, Driggers WJ, LeDoux SP, Wilson GL (1995). *Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells*. Mutat Res. 337, 19-23.
- Shen H, Tong L, Balazs R, Cotman CW (2001). *Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus*. Neuroscience. 107, 219-229.
- Shimizu SM, Chow DC, Katz AR, Richmond-Crum S, Miller FD (2006). *Ethnic differences in hiv disease progression: a comparison of Asian/Pacific Islanders and Whites living in Hawaii*. Ethn Dis. 16, 262-267.
- Shimoji K, Ravasi L, Schmidt K, Soto-Montenegro ML, Esaki T, Seidel J, Jagoda E, Sokoloff L, Green MV, Eckelman WC (2004). *Measurement of cerebral glucose metabolic rates in the anesthetized rat by dynamic scanning with 18F-FDG, the ATLAS small animal PET scanner, and arterial blood sampling*. J Nucl Med. 45, 665-672.
- Shing CM, Peake JM, Ahern SM, Strobel NA, Wilson G, Jenkins DG, Coombes JS (2007). *The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress*. Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme. 32, 677-685.
- Shoval G, Weizman A (2005). *The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia*. Eur Neuropsychopharmacol. 15, 319-329.
- Sies H (1985). Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*. (H Sies, ed): London: Academic Press, pp. 1-7.
- Sies H (1993). *Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection*. Mutat Res. 299, 183-191.

- Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, Visvikis S (1995). *Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine*. Clin Chem. 41, 1068-1086.
- Silverman DH, Small GW, Chang CY, Lu CS, Kung De Aburto MA, Chen W, Czernin J, Rapoport SI, Pietrini P, Alexander GE, Schapiro MB, Jagust WJ, Hoffman JM, Welsh-Bohmer KA, Alavi A, Clark CM, Salmon E, de Leon MJ, Mielke R, Cummings JL, Kowell AP, Gambhir SS, Hoh CK, Phelps ME (2001). *Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome*. JAMA. 286, 2120-2127.
- Sillanpaa E, Hakkinen A, Laaksonen DE, Karavirta L, Kraemer WJ, Hakkinen K (2010). *Serum basal hormone concentrations, nutrition and physical fitness during strength and/or endurance training in 39-64-year-old women*. Int J Sports Med. 31, 110-117.
- Singh A, Uijtdewilligen L, Twisk JW, van Mechelen W, Chinapaw MJ (2012). *Physical activity and performance at school: a systematic review of the literature including a methodological quality assessment*. Arch Pediatr Adolesc Med. 166, 49-55.
- Slater TF (1984). *Free-radical mechanisms in tissue injury*. Biochem J. 222, 1-15.
- Slaughter MH, Lohman TG, Boileau RA, Horswill CA, Stillman RJ, Van Loan MD, Bembien DA (1988). *Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth*. Hum Biol. 60, 709-723.
- Smith DE, Roberts J, Gage FH, Tuszyński MH (1999). *Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 10893-10898.
- Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N (1996). *Oxidative damage in Alzheimer's*. Nature. 382, 120-121.
- Snider WD (1994). *Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us*. Cell. 77, 627-638.
- Sobue G, Yamamoto M, Doyu M, Li M, Yasuda T, Mitsuma T (1998). *Expression of mRNAs for neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their receptors (p75NGFR, trk, trkB, and trkC) in human peripheral neuropathies*. Neurochem Res. 23, 821-829.
- Somani SM, Husain K (1996). *Exercise training alters kinetics of antioxidant enzymes in rat tissues*. Biochem Mol Biol Int. 38, 587-595.
- Song HJ, Poo MM (1999). *Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors*. Curr Opin Neurobiol. 9, 355-363.
- Soule J, Messaoudi E, Bramham CR (2006). *Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain*. Biochem Soc Trans. 34, 600-604.

- Sowell ER, Peterson BS, Thompson PM, Welcome SE, Henkenius AL, Toga AW (2003). *Mapping cortical change across the human life span*. Nat Neurosci. 6, 309-315.
- Spalletta G, Baldinetti F, Buccione I, Fadda L, Perri R, Scalmana S, Serra L, Caltagirone C (2004). *Cognition and behaviour are independent and heterogeneous dimensions in Alzheimer's disease*. J Neurol. 251, 688-695.
- Sperry RW (1963). *Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections*. Proc Natl Acad Sci U S A. 50, 703-710.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002). *Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain*. J Biol Chem. 277, 44784-44790.
- Stadtman ER (1992). *Protein oxidation and aging*. Science. 257, 1220-1224.
- Stargardt A, Gillis J, Kamphuis W, Wiemhoefer A, Kooijman L, Raspe M, Benckhuijsen W, Drijfhout JW, Hol EM, Reits E (2013). *Reduced amyloid-beta degradation in early Alzheimer's disease but not in the APP^{swe}PS1^{dE9} and 3xTg-AD mouse models*. Aging Cell. 12, 499-507.
- Strohle A, Stoy M, Graetz B, Scheel M, Wittmann A, Gallinat J, Lang UE, Dimeo F, Hellweg R (2010). *Acute exercise ameliorates reduced brain-derived neurotrophic factor in patients with panic disorder*. Psychoneuroendocrinology. 35, 364-368.
- Su J, Sripanidkulchai K, Hu Y, Wyss JM, Sripanidkulchai B (2012). *The effect of ovariectomy on learning and memory and relationship to changes in brain volume and neuronal density*. Int J Neurosci. 122, 549-559.
- Subbarao KV, Richardson JS, Ang LC (1990). *Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro*. J Neurochem. 55, 342-345.
- Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, Kasai H (2008). *Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines*. Science. 319, 1683-1687.
- Tang SW, Chu E, Hui T, Helmeste D, Law C (2008). *Influence of exercise on serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in healthy human subjects*. Neurosci Lett. 431, 62-65.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005). *ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75^{NTR} and sortilin*. J Neurosci. 25, 5455-5463.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991). *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment*. Ann Neurol. 30, 572-580.
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB (2000). *Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles*. Nat Cell Biol. 2, 42-49.

- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE (1994). *Nutritional regulation of the insulin-like growth factors*. Endocr Rev. 15, 80-101.
- Thoenen H (1995). *Neurotrophins and neuronal plasticity*. Science. 270, 593-598.
- Thoenen H, Sendtner M (2002). *Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches*. Nat Neurosci. 5 Suppl, 1046-1050.
- Tierney MC, Moineddin R, Morra A, Manson J, Blake J (2010). *Intensity of recreational physical activity throughout life and later life cognitive functioning in women*. J Alzheimers Dis. 22, 1331-1338.
- Tong L, Thornton PL, Balazs R, Cotman CW (2001). *Beta -amyloid-(1-42) impairs activity-dependent cAMP-response element-binding protein signaling in neurons at concentrations in which cell survival is not compromised*. J Biol Chem. 276, 17301-17306.
- Torres-Aleman I (1999). *Insulin-like growth factors as mediators of functional plasticity in the adult brain*. Horm Metab Res. 31, 114-119.
- Torres-Aleman I (2000). *Serum growth factors and neuroprotective surveillance: focus on IGF-I*. Mol Neurobiol. 21, 153-160.
- Torres-Aleman I (2010). *Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I*. Dev Neurobiol. 70, 384-396.
- Torres Aleman I (2005). *Role of insulin-like growth factors in neuronal plasticity and neuroprotection*. Adv Exp Med Biol. 567, 243-258.
- Townsend M, Cleary JP, Mehta T, Hofmeister J, Lesne S, O'Hare E, Walsh DM, Selkoe DJ (2006). *Orally available compound prevents deficits in memory caused by the Alzheimer amyloid-beta oligomers*. Ann Neurol. 60, 668-676.
- Trajkowska V, Marcussen AB, Vinberg M, Hartvig P, Aznar S, Knudsen GM (2007). *Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data*. Brain Res Bull. 73, 143-149.
- Trejo JL, Carro E, Garcia-Galloway E, Torres-Aleman I (2004). *Role of insulin-like growth factor I signaling in neurodegenerative diseases*. J Mol Med. 82, 156-162.
- Trejo JL, Carro E, Nunez A, Torres-Aleman I (2002). *Sedentary life impairs self-reparative processes in the brain: the role of serum insulin-like growth factor-I*. Rev Neurosci. 13, 365-374.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I (2001). *Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus*. J Neurosci. 21, 1628-1634.
- Trejo JL, Llorens-Martin MV, 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.

- Trejo JL, Piriz J, Llorens-Martin MV, Fernandez AM, Bolos M, LeRoith D, Nunez A, Torres-Aleman I (2007). *Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects.* Mol Psychiatry. 12, 1118-1128.
- Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J (1998). *Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein.* J Biol Chem. 273, 33556-33560.
- Tsukinoki K, Saruta J, Muto N, Sasaguri K, Sato S, Tan-Ishii N, Watanabe Y (2007). *Submandibular glands contribute to increases in plasma BDNF levels.* J Dent Res. 86, 260-264.
- Tsukinoki K, Saruta J, Sasaguri K, Miyoshi Y, Jinbu Y, Kusama M, Sato S, Watanabe Y (2006). *Immobilization stress induces BDNF in rat submandibular glands.* J Dent Res. 85, 844-848.
- Ulery PG, Beers J, Mikhailenko I, Tanzi RE, Rebeck GW, Hyman BT, Strickland DK (2000). *Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease.* J Biol Chem. 275, 7410-7415.
- Um HS, Kang EB, Leem YH, Cho IH, Yang CH, Chae KR, Hwang DY, Cho JY (2008). *Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPsw-transgenic model.* Int J Mol Med. 22, 529-539.
- Valla J, Gonzalez-Lima F, Reiman EM (2008). *FDG autoradiography reveals developmental and pathological effects of mutant amyloid in PDAPP transgenic mice.* Int J Dev Neurosci. 26, 253-258.
- Valla J, Schneider L, Reiman EM (2006). *Age- and transgene-related changes in regional cerebral metabolism in PSAPP mice.* Brain Res. 1116, 194-200.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999). *Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 13427-13431.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005). *Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice.* J Neurosci. 25, 8680-8685.
- Vaynman S, Gomez-Pinilla F (2005). *License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins.* Neurorehabil Neural Repair. 19, 283-295.
- Vaynman S, Gomez-Pinilla F (2006). *Revenge of the "sit": how lifestyle impacts neuronal and cognitive health through molecular systems that interface energy metabolism with neuronal plasticity.* J Neurosci Res. 84, 699-715.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2003). *Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity.* Neuroscience. 122, 647-657.

- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004a). *Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields*. J Neurosci Res. 76, 356-362.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004b). *Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition*. Eur J Neurosci. 20, 2580-2590.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2007). *The select action of hippocampal calcium calmodulin protein kinase II in mediating exercise-enhanced cognitive function*. Neuroscience. 144, 825-833.
- Vaynman SS, Ying Z, Yin D, Gomez-Pinilla F (2006). *Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF*. Brain Res. 1070, 124-130.
- Vega SR, Kleinert J, Sulprizio M, Hollmann W, Bloch W, Struder HK (2011). *Responses of serum neurotrophic factors to exercise in pregnant and postpartum women*. Psychoneuroendocrinology. 36, 220-227.
- Verburgh L, Konigs M, Scherder EJ, Oosterlaan J (2014). *Physical exercise and executive functions in preadolescent children, adolescents and young adults: a meta-analysis*. Br J Sports Med. 48, 973-979.
- Verdile G, Gandy SE, Martins RN (2007). *The role of presenilin and its interacting proteins in the biogenesis of Alzheimer's beta amyloid*. Neurochem Res. 32, 609-623.
- Vergheze J, Lipton RB, Katz MJ, Hall CB, Derby CA, Kuslansky G, Ambrose AF, Sliwinski M, Buschke H (2003). *Leisure activities and the risk of dementia in the elderly*. N Engl J Med. 348, 2508-2516.
- Villaverde Gutierrez C, Torres Luque G, Abalos Medina GM, Argente del Castillo MJ, Guisado IM, Guisado Barrilao R, Ramirez Rodrigo J (2012). *Influence of exercise on mood in postmenopausal women*. J Clin Nurs. 21, 923-928.
- Vina J, Gambini J, Lopez-Grueso R, Abdelaziz KM, Jove M, Borras C (2011). *Females live longer than males: role of oxidative stress*. Curr Pharm Des. 17, 3959-3965.
- Vina J, Lloret A (2010). *Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide*. J Alzheimers Dis. 20 Suppl 2, S527-533.
- Vina J, Lloret A, Orti R, Alonso D (2004). *Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress*. Mol Aspects Med. 25, 117-123.
- Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A (1994). *Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 4766-4770.
- Vlassenko AG, Vaishnavi SN, Couture L, Sacco D, Shannon BJ, Mach RH, Morris JC, Raichle ME, Mintun MA (2010). *Spatial correlation between brain*

- aerobic glycolysis and amyloid-beta (Abeta) deposition.* Proc Natl Acad Sci U S A. 107, 17763-17767.
- Walsh RN, Cummins RA (1976). *The Open-Field Test: a critical review.* Psychol Bull. 83, 482-504.
- Wang A, Bibb JA (2011). *Is CREB the angry bird that releases memory in Alzheimer's?* Neuropsychopharmacology. 36, 2153-2154.
- Wang H, Ward N, Boswell M, Katz DM (2006). *Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells.* Eur J Neurosci. 23, 1665-1670.
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004). *Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats.* Stroke. 35, 1732-1737.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975). *A protein factor essential for microtubule assembly.* Proc Natl Acad Sci U S A. 72, 1858-1862.
- Weinstein G, Beiser AS, Choi SH, Preis SR, Chen TC, Vorgas D, Au R, Pikula A, Wolf PA, DeStefano AL, Vasan RS, Seshadri S (2014). *Serum brain-derived neurotrophic factor and the risk for dementia: the Framingham Heart Study.* JAMA Neurol. 71, 55-61.
- Werckenthin C, Cardoso M, Martel JL, Schwarz S (2001). *Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine Staphylococcus aureus, porcine Staphylococcus hyicus, and canine Staphylococcus intermedius.* Vet Res. 32, 341-362.
- Werner H, Woloschak M, Adamo M, Shen-Orr Z, Roberts CT, Jr., LeRoith D (1989). *Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene.* Proc Natl Acad Sci U S A. 86, 7451-7455.
- Werther GA, Abate M, Hogg A, Cheesman H, Oldfield B, Hards D, Hudson P, Power B, Freed K, Herington AC (1990). *Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridization--relationship to IGF-I receptors.* Mol Endocrinol. 4, 773-778.
- White T, Andreasen NC, Nopoulos P (2002). *Brain volumes and surface morphology in monozygotic twins.* Cereb Cortex. 12, 486-493.
- Willig F, Palacios A, Monmaur P, M'Harzi M, Laurent J, Delacour J (1987). *Short-term memory, exploration and locomotor activity in aged rats.* Neurobiol Aging. 8, 393-402.
- Winker R, Lukas I, Perkmann T, Haslacher H, Ponocny E, Lehrner J, Tscholakoff D, Dal-Bianco P (2010). *Cognitive function in elderly marathon runners: cross-sectional data from the marathon trial (APSOEM).* Wien Klin Wochenschr. 122, 704-716.
- Winter B, Breitenstein C, Mooren FC, Voelker K, Fobker M, Lechtermann A, Krueger K, Fromme A, Korsukewitz C, Floel A, Knecht S (2007). *High impact running improves learning.* Neurobiol Learn Mem. 87, 597-609.

- Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, Kempermann G (2006). *Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease*. Biol Psychiatry. 60, 1314-1323.
- Wong-Riley MT (1989). *Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity*. Trends Neurosci. 12, 94-101.
- Wong J, Higgins M, Halliday G, Garner B (2012). *Amyloid beta selectively modulates neuronal TrkB alternative transcript expression with implications for Alzheimer's disease*. Neuroscience. 210, 363-374.
- Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Jr., Sunderman FW, Jr. (1987). *Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct*. Clin Chem. 33, 214-220.
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005). *Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression*. Nat Neurosci. 8, 1069-1077.
- Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF (2003). *Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor*. Nat Neurosci. 6, 736-742.
- Xu ZQ, Zhang LQ, Wang Q, Marshall C, Xiao N, Gao JY, Wu T, Ding J, Hu G, Xiao M (2013). *Aerobic exercise combined with antioxidative treatment does not counteract moderate- or mid-stage Alzheimer-like pathophysiology of APP/PS1 mice*. CNS Neurosci Ther. 19, 795-803.
- Yaffe K, Barnes D, Nevitt M, Lui LY, Covinsky K (2001). *A prospective study of physical activity and cognitive decline in elderly women: women who walk*. Arch Intern Med. 161, 1703-1708.
- Yamamoto H, Gurney ME (1990). *Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor*. J Neurosci. 10, 3469-3478.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Henrikson RL, Gurney ME (1999). *Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity*. Nature. 402, 533-537.
- Yang Y, Song W (2013). *Molecular links between Alzheimer's disease and diabetes mellitus*. Neuroscience. 250, 140-150.
- Yao J, Irwin R, Chen S, Hamilton R, Cadenas E, Brinton RD (2012). *Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial beta-amyloid*. Neurobiol Aging. 33, 1507-1521.
- Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD (2009). *Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 14670-14675.

- Yarrow JF, White LJ, McCoy SC, Borst SE (2010). *Training augments resistance exercise induced elevation of circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF)*. Neurosci Lett. 479, 161-165.
- Yin JC, Del Vecchio M, Zhou H, Tully T (1995). *CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in Drosophila*. Cell. 81, 107-115.
- Yoshitake T, Kiyohara Y, Kato I, Ohmura T, Iwamoto H, Nakayama K, Ohmori S, Nomiyama K, Kawano H, Ueda K, et al. (1995). *Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the Hisayama Study*. Neurology. 45, 1161-1168.
- Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D (1990). *Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors*. EMBO J. 9, 3545-3550.
- Zeng Y, Liu Y, Wu M, Liu J, Hu Q (2012a). *Activation of TrkB by 7,8-dihydroxyflavone prevents fear memory defects and facilitates amygdalar synaptic plasticity in aging*. J Alzheimers Dis. 31, 765-778.
- Zeng Y, Lv F, Li L, Yu H, Dong M, Fu Q (2012b). *7,8-dihydroxyflavone rescues spatial memory and synaptic plasticity in cognitively impaired aged rats*. J Neurochem. 122, 800-811.
- Zhang W, Hao J, Liu R, Zhang Z, Lei G, Su C, Miao J, Li Z (2011). *Soluble Abeta levels correlate with cognitive deficits in the 12-month-old APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease*. Behav Brain Res. 222, 342-350.
- Zhang Z, Liu X, Schroeder JP, Chan CB, Song M, Yu SP, Weinshenker D, Ye K (2014). *7,8-dihydroxyflavone prevents synaptic loss and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease*. Neuropsychopharmacology. 39, 638-650.
- Zhao WQ, Lacor PN, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL (2009). *Insulin receptor dysfunction impairs cellular clearance of neurotoxic oligomeric A β* . J Biol Chem. 284, 18742-18753.
- Zheng WH, Quirion R (2004). *Comparative signaling pathways of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival*. J Neurochem. 89, 844-852.
- Zhu X, Raina AK, Lee HG, Casadesus G, Smith MA, Perry G (2004). *Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease*. Brain Res. 1000, 32-39.
- Zoladz JA, Pilc A, Majerczak J, Grandys M, Zapart-Bukowska J, Duda K (2008). *Endurance training increases plasma brain-derived neurotrophic factor concentration in young healthy men*. J Physiol Pharmacol. 59 Suppl 7, 119-132.
- Zuccato C, Cattaneo E (2009). *Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases*. Nat Rev Neurol. 5, 311-322.

- Zurn AD, Baetge EE, Hammang JP, Tan SA, Aebischer P (1994). *Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons.* Neuroreport. 6, 113-118.
- Zurn AD, Winkel L, Menoud A, Djabali K, Aebischer P (1996). *Combined effects of GDNF, BDNF, and CNTF on motoneuron differentiation in vitro.* J Neurosci Res. 44, 133-141.

VII. ANNEX / ANEXOS

1. ACRÓNIMOS (ACRONYMS)

%Fat: Porcentaje graso (Percentage of body fat)

%Lean mass: Porcentaje magro (Percentage of body lean mass)

¹⁸F-FDG: ¹⁸F-Fluorodesoxiglucosa (¹⁸F-Fluorodeoxyglucose)

2xTg: Doble transgénico (double transgenic)

3xTg: Triple transgénico (triple transgenic)

5xFAD: Quíntuple transgénico (fivefold transgenic)

7,8-DHF: 7,8-dihidroxiflavona (7,8-dihydroxyflavone)

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario (Complementary deoxyribonucleic acid).

APP: Proteína precursora de amiloide (Amyloid precursor protein)

APS: Persulfato amónico (Ammonium persulfate)

ARTN: Artemina (Artemin)

ATP: Adenosín trifosfato (Adenosine triphosphate)

AU: Unidades arbitrarias (Arbitrary units)

A β : Beta amiloide (Amyloid beta)

BACE: β -secretasa (β -secretase)

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (Brain-derived neurotrophic factor)

BMI: Índice de masa corporal (Body mass index)

BPDS: Ácido batofenantrolin disulfónico (Bathophenanthroline disulfonic acid)

BSA: Albúmina de suero bobino (Bovine serum albumin)

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico (Cyclic adenosine monophosphate)

CAT: Catalasa (Catalase)

Ci: Curios (Curie)

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (cAMP response element-binding protein)

CREM: Modulador del elemento de respuesta a cAMP (cAMP response element modulator)

CRF: Factor liberador de corticotropina (Corticotropin releasing factor)

CT: Tomografía computerizada (Computed tomography)

CT-1: Cardiotrofina 1 (Cardiotrophin 1)

CTNF: Factor neurotrófico ciliar (Ciliary neurotrophic factor)

Cu/Zn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Superoxide dismutase dependent of copper and zinc).

DEPC: Dietil pirocarbonato (Diethyl pyrocarbonate)

DMSO: Dimetil sulfóxido (Dimethyl sulfoxide)

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal growth factor)

EGTA: Etileno glicol-bis (aminoetil eter)-N,N,N',N'- ácido tetracético (Ethylene glycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-linked immunosorbent assay)

EPO: Eritropoyetina (Erythropoietin)

FBG: Glucemia en ayunas (Fasting blood glucose)

FDG: 2-[¹⁸F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (2-Deoxy-2-[¹⁸F]-fluoroglucose)

FGF-1, -2, -5: Factor de crecimiento fibroblástico 1, 2 ó 5 (Fibroblast growth factor 1, 2 or 5)

FWHM: Ancho total a media altura (Full width at half maximum)

GDF11: Factor de diferenciación de crecimiento 11 (Growth differentiation factor 11)

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía (Glial-derived neurotrophic factor)

GH: Hormona de crecimiento (Growth hormone)

GluR1R: Subunidad 1 del receptor de glutamato homomérico de los receptores AMPA (Glutamate receptor subunit Glu1 homomeric AMPA receptors)

GPx: Glutación peroxidasa (Glutathione peroxidase)

GSH: Glutación reducido (Reduced glutathione)

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa (Glycogen synthase kinase 3)

GSSG: Glutación oxidado (Oxidized glutathione)

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno (Hydrogen peroxide)

Hb: Hemoglobina (Hemoglobin)

HDL-C: Colesterol lipoproteína de alta densidad (High-density lipoprotein cholesterol)

HEPES: N-(2-hidroxiethyl)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico) (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid)

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (High performance liquid chromatography)

HRP: Peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)

ID: Dosis inyectada (Injected dosis)

IGF-1, -2: Factor de crecimiento similar a la insulina 1 ó 2 (Insulin-like growth factor 1 or 2)

IPAQ: Cuestionario internacional de actividad física (International physical activity questionnaire)

KeV: Kilo electrón voltio (Kiloelectron volt)

KOH: Hidróxido de potasio (Potassium hydroxide)

LDL-C: Colesterol lipoproteína de baja densidad (Low-density lipoprotein cholesterol)

LIF: Factor inhibitorio de la leucemia (Leukemia inhibitory factor)

LRP1: Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1)

LTP: Potenciación a largo plazo (Long-term potentiation)

mA: Miliamperios (Milliampere)

MAPKs: Protein quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases)

MBq: Megabequerelios (Megabecquerel)

MDA: Malondialdehído (Malondialdehyde)

MET: Equivalente metabólico (Metabolic equivalent task)

MLEM: Máxima verosimilitud expectativa algoritmo de maximización (Maximum-likelihood expectation maximization algorithm)

Mn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Superoxide dismutase dependent of manganese)

MWM: Laberinto de agua de Morris (Morris water maze)

NADE: Ejecutor de la muerte celular asociado a neurotrofinas (Neurotrophin associated cell death executor)

NEM: N-etilmaleimida (N-Ethylmaleimide)

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NGF: Factor de crecimiento nervioso (Nerve growth factor)

NMDA: N-metil-D-aspartato (N-methyl-D-aspartate)

NRAGE: Homólogo de MAGE que interactúa con el receptor de la neurotrofina (Neurotrophin-receptor-interacting MAGE homologue)

NRIF: Factor que interactúa con el receptor de la neurotrofina (Neurotrophin-receptor interacting factor)

NT-3, -4/5, -6: Neurotrofina 3, 4/5 o 6 (Neurotrophin 3, 4/5 or 6)

NTN: Neurturina (Neurturin)

°C: Grados Celsius (Degrees Celsius)

PAEE: Gasto energético en actividad física - por encima de 3 METs (Physical activity energy expenditure - over 3 METs)

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (Polyacrylamide gel electrophoresis)

- PBMCs:** Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral blood mononuclear cells)
- pCREB:** Proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP fosforilada (Phosphorylated cAMP response element-binding protein)
- PET:** Tomografía por emisión de positrones (Positron emission tomography)
- PFP:** Plasma sin plaquetas (Platelets-free plasma)
- PGC-1 α :** Coactivador-1 α del receptor activado de proliferación de los peroxisomas gamma (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α)
- PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa (Phosphoinositide 3-kinase)
- PLC γ :** Fosfolipasa C- γ 1 (Phospholipase C γ)
- PrP:** Proteína priónica (Prion protein)
- PSEN:** Presenilina (Presenilin)
- PSPN:** Persefina (Persephin)
- P-tau:** Proteína tau hiperfosforilada (hiperphosphorylated tau protein)
- PVDF:** Polifluoruro de vinilideno (Polyvinylidene fluoride)
- qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Quantitative polymerase chain reaction)
- RHR:** Frecuencia cardiaca en reposo (Resting heart rate)
- RIP2:** Receptor que interactúa con la proteína quinasa 2 (Receptor-interacting protein kinase 2)
- S10m:** Suero coagulado 10 minutos (Serum coagulated during 10 minutes)
- S24h:** Suero coagulado 24 horas (Serum coagulated during 24 hours)
- SC1:** Célula Schwann 1 (Schwann cell 1)
- SDS:** Sodio dodecil sulfato (Sodium monododecyl sulfate)
- SUV:** Valor de captación estandarizado (Standardized uptake value)
- Swe:** Mutación sueca (Swedish mutation)
- TBA:** Ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric acid)
- TC:** Colesterol total (Total cholesterol)

TEE: Gasto energético total (Total energy expenditure)

TEMED: N,N,N,N'-tetrametilnetilenodiamina (N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine)

TG: Triglicéridos (Triglycerides)

TGFβ: Factor de crecimiento tumoral β (Tumor growth factor β)

TH: Tirosina hidroxilasa (Tyrosine hydroxylase)

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)

TP: Plasma total (Total plasma)

TRIS: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (2-Amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol)

Trk (A, B, C): Tirosina quinasa tipo A, B o C (tyrosine kinase type A, B or C)

Tween 20: Polioxietileno (20) sorbitan monooleato (Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)

v/v: Volumen/volumen (Volume/volume)

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial (Vascular endothelial growth factor)

VOI: Volumen de interés (Volume of interest)

W: Vatios (Watt)

WAT: Tejido graso blanco (White adipose tissue)

WB: Sangre total (Whole Blood)

γ-Glu-Glu: γ-glutamilglutamato (γ-glutamylglutamate)

**2. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL DOCTORANDO
RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS DOCTORAL**

Review

Mitochondria as sources and targets of damage in cellular aging

Mari Carmen Gomez-Cabrera*, Fabian Sanchis-Gomar, Rebeca Garcia-Valles, Helios Pareja-Galeano, Juan Gambini, Consuelo Borrás and Jose Viña

Department of Physiology, University of Valencia, Fundacion Investigacion Hospital Clinico Universitario/INCLIVA, Valencia, Spain

Abstract

Mitochondria are considered as the most important cellular sources and targets of free radicals. They are also a source of signalling molecules that regulate cell cycle, proliferation, and apoptosis. Denham Harman postulated the free radical theory of aging in 1956. Previously Rebecca Gershan showed that radiation toxicity could be attributed to free radical damage. Subsequently, Jaime Miquel formulated the mitochondrial free radical theory of aging. We have shown that mitochondrial size, membrane potential, inner membrane mass and peroxide production is altered inside cells in old animals. These result in an increase in the oxidative damage to mitochondrial DNA with aging that can be prevented by antioxidant supplementation. Aging is also associated with a lower renewal of mitochondria. This is mainly due to the lack of reactivity of proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) coactivator 1 α (PGC-1 α) in old animals. PGC-1 α acts as a master regulator of energy metabolism and mitochondrial biogenesis and recent evidence shows that it interacts with p53 and telomerase. The promotion of mitochondriogenesis is critical to prevent aging. In skeletal muscle it has relevance to prevent sarcopenia and frailty.

Keywords: antioxidants; DNA damage; longevity; oxidative stress; mitochondrial biogenesis; PGC-1.

Mitochondrial as a source of free radicals

Mitochondria have been classically recognized as the organelle that produce the energy required to drive the endergonic

processes of cell life through the respiratory chain, but now they are also considered as the most important cellular source of free radicals, as the main target for free radical regulatory and toxic actions, and as a source of signalling molecules that regulate cell cycle, proliferation and apoptosis (1). The occurrence of free radicals in biological processes is widely accepted (2). Over 95% of all the oxygen we breathe undergoes a reduction to produce water in the mitochondrial electron transport chain. Cytochrome oxidase is the terminal electron acceptor in the chain and must release its reducing equivalents to allow continued electron transport and ATP production (1). Although the mitochondrial electron transport chain is a very efficient system it predisposes each electron carrier to side reactions with molecular oxygen. If an atom/molecule contains one or more unpaired electrons and is capable of independent existence, it is referred to as a “free radical” (3). The primary free radicals generated in cells are superoxide ($O_2^{\bullet-}$) and nitric oxide (NO) (4). The mitochondrial generation of these free radicals, as well as H_2O_2 (hydrogen peroxide) and peroxynitrite (ONOO $^-$), represent the major intracellular source of reactive oxygen species (ROS) under physiological conditions (1). Mitochondria seem to be (quantitatively) the most important cellular site of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 production in mammalian organs, and the steady state concentration of $O_2^{\bullet-}$ in the mitochondrial matrix is about five- to ten-fold higher than that in the cytosol and nucleus (1). Thus, mitochondrial components are exposed to a high flux of free radicals. These cause damage to mitochondrial components and initiate degradative processes. Helmut Sies first coined the term *oxidative stress* in 1985 as “a disturbance in the pro-oxidant-antioxidant balance in favour of the former” (5, 6). Although this definition has been widely used for over two decades, the definition of oxidative stress will likely undergo modifications in the future. In an effort to refine the meaning of oxidative stress, Dean Jones has proposed that this term should be redefined as “a disruption of redox signalling and control” (7).

Mitochondrial free radical theory of aging

The toxic reactions associated to oxidative stress constitute the central dogma of the free radical theory of aging. Aging is associated with an overall loss of function at the level of the whole organism that has origins in cellular deterioration. Bernard Strehler defined aging by means of four postulates: aging is universal, must be intrinsic, progressive and

*Corresponding author: Mari Carmen Gomez-Cabrera, PhD, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibañez, 15 46010 Valencia, Spain
Phone: +(34) 96 386 46 50, Fax: +(34) 96 386 46 42,
E-mail: carmen.gomez@uv.es

Received October 30, 2011; accepted December 25, 2011; previously published online February 1, 2012

deleterious (8). Aging causes a loss in the capacity to maintain the internal milieu of the old animal/person when faced by changes in the external atmosphere. Thus, the individual loses the capacity to maintain homeostasis and almost all physiological functions lose efficiency with aging (9).

The mitochondria require continuous recycling throughout the lifespan and are particularly susceptible to damage over time as they are the major bioenergetic machinery and source of oxidative stress in cells (10). The free radical theory of aging is one of the most prominent theories to explain aging. It was proposed by Denam Harman in 1956 (11) following initial observations and suggestions by Rebecca Gershan (12). The findings in the laboratory of Britton Chance that approximately 2% of oxygen consumed by mitochondria in state 4 is converted to hydrogen peroxide, underpinned the role of mitochondria in ROS production (13). These experiments led Jaime Miquel to refine the free radical theory of aging and in the 1970s he formulated the mitochondrial free radical theory of aging. The main contributions of Miquel were: emphasized the importance of mitochondrial DNA as a target of oxidants produced during aging, and pointing out that mitochondrial DNA might be impaired in aging (14). Brand and colleagues (15) have recently concluded that the upper estimate of the total fraction of oxygen utilized by the mitochondria that forms superoxide is approximately 0.15%; this value is significantly lower than the original estimate of 2%–5%. This low rate of superoxide production may include a role for uncoupling proteins in the protection of mitochondria against oxidative damage (4).

The mitochondrial theory of aging, although recently questioned (16), has been tested in various laboratories and there are many published papers in support of this theory. For instance, data from our own research group have shown that mitochondria from old animals produce more ROS than those from young ones (17, 18). Moreover, there is an inverse relationship between mitochondrial peroxide production and longevity in mammals (19, 20). These results support the hypothesis that the rate of the oxidant generation by mitochondria is a critical factor in aging (21). In fact the rate of peroxide generation increases with age. Corbisier and Remacle postulated that the mitochondria are involved in cell degeneration by microinjecting isolated mitochondria from fibroblasts of old rats into cells of young ones. They found that the cells who had received 'old' mitochondria rapidly entered senescence (22). Thus, the continuous free radical generation by mitochondria during the whole life span causes a chronic oxidative stress that plays a critical role in aging. In addition, the rate of oxidant production by mitochondria from short-lived species is much higher than that of longer-lived ones (20). It appears, therefore, that the rate of ROS production by mitochondria is a key determinant of maximal life span potential at least at the cellular level.

Mitochondria are damaged inside cells in the process of aging

In the 1970s, Jaime Miquel demonstrated the involvement of the mitochondria in the loss of functional properties associated

with aging using basically histological studies (23). In 1996, we studied the involvement of mitochondria in aging using whole liver cells and not isolated mitochondria (24). Until then, the mitochondrial damage leading to aging had only been tested using isolated mitochondria. Subsequently, other research groups showed age-related changes in mitochondrial respiratory function and transport systems using this experimental approach (25, 26). We determined the rate of gluconeogenesis and ketogenesis, which critically depend on mitochondrial function, in the liver of old and young animals. We also determined the mitochondrial size, peroxide production and membrane potential in whole liver cells using flow cytometry (24). Our results showed, for the first time in intact cells, a correlation between age-associated impairment of cell metabolism and specific changes in mitochondrial function and morphology. This was almost simultaneously confirmed by the group of Bruce Ames (27). Subsequently, we observed that respiratory activity of mitochondria not only decreases with age in liver but also in other tissues such as muscle and brain.

Mitochondrial DNA damage correlates with oxidative stress in aging and can be prevented by antioxidant administration

The rate of oxidant production by mitochondria is difficult to study (9). Consequently, studying biomarkers of oxidative stress appears more adequate than studying the rate of oxidant production. The mitochondrial gene *16S rRNA*, for instance, can be considered as a biomarker of cellular aging. This RNA molecule is highly susceptible to oxidative stress (28), and its rate of transcription decreases with age and in parallel with the survival curve of *Drosophila* (29). Damage to different macromolecules such as lipids, proteins and DNA can also be studied as biomarkers of aging. Many of the post-translational modifications found in old cells are due to the deleterious effects of free radicals (30). Lipid peroxidation, for instance, is associated with the pathogenesis of a number of age-associated diseases and can be studied using different biomarkers such as malondialdehyde and isoprostanes (4, 31). Regarding protein oxidation, another interesting biomarker of oxidative stress, it has been found that some enzymes are more susceptible to damage than others with aging. In fact, some key amino acids such as arginine, lysine or proline are more susceptible to yield carbonyl derivatives (32). As previously mentioned, DNA may be the most critical target molecule for age associated oxidative stress (33). It has been calculated that ROS modify approximately 10,000 bases of DNA per cell (34). DNA repairing enzymes are able to repair the vast majority of these lesions, but not all. Therefore, DNA lesions that go unrepaired accumulate with age. It is well known that mitochondrial DNA is much more oxidized with age than nuclear DNA (21). Our group found that oxidative damage to mitochondrial DNA was increased in aging and that it could be prevented by antioxidant supplementation (35). Thus, the initial prediction of Jaime Miquel highlighting the importance of mitochondrial DNA as a target of oxidants produced during aging could be experimentally proved.

Mitochondrial renewal is impaired in aging causing accumulation of damage to mitochondria

Mitochondrial biogenesis includes the cellular processes involved in the synthesis and degradation of the organelle (36). The prediction that aging was associated with a lower renewal of mitochondria was also postulated by Jaime Miquel (33). However, it took several years to establish the relationship between the mitochondria decay in different tissues with aging and the low mitochondriogenesis (37, 38). The major reason is that the number of mitochondria in the cell is difficult to assess. To solve this problem, the elucidation of the mitochondriogenic pathway was required. Mitochondrial biogenesis is a complex process. It involves changes in the expression of more than one thousand genes, the cooperation of two genomes, and alters the level of approximately 20% of cellular proteins (39). Importantly, in addition to the nuclear genes (which encode the major number of mitochondrial proteins), mitochondriogenesis requires the participation of the mitochondrial genome, which is responsible for the synthesis of proteins of the electron transport chain, as well as mitochondrial tRNAs and rRNAs.

Thus, the precise synchronization of the transcription affecting both nuclear and mitochondrial genomes (located in separate subcellular compartments) must be essential in order to produce new mitochondria (40).

Despite the complexity of the various signalling pathways that regulate mitochondrial biogenesis, they all seem to share proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) coactivator 1 α (PGC-1 α) family of transcription factors. PGC-1 α was initially identified as a cold-inducible coactivator for PPAR- γ in brown fat and skeletal muscle (41). PGC-1 α appears to act as a master regulator of energy metabolism and mitochondrial biogenesis by coordinating the activity of multiple transcription factors (41). PGC-1 α strongly co-activates nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) and NRF-1 regulatory responsive elements have been found in the promoter of nuclear genes, such as *mitochondrial transcription factor A (Tfam)*, *cytochrome c* and *aminolevulinic synthase* (42). Tfam can be considered the most important mammalian transcription factor for mtDNA because it stimulates mitochondrial DNA transcription and replication.

Low mitochondrial biogenesis is associated with the lack of reactivity of PGC-1 α , a master regulator of mitochondrial biogenesis

There is a very significant decline in lean body mass associated with aging (43). The mechanisms controlling muscle loss are very relevant in medicine because muscle contraction is involved in the prevention of chronic diseases. Thus, understanding the signalling that regulates muscle mass may provide potential therapeutic targets (44). Muscle aging is a key component of the increase in frailty in human and animal populations (45). Frailty is a syndrome highly prevalent with increasing age and consists of decreased reserve and

resistance to stressors, weakness, decline in activity, weight loss and vulnerability to adverse health outcomes (46). One of the main components of frailty is sarcopenia. This is a syndrome characterized by progressive and generalized loss of skeletal muscle mass and strength with a risk of adverse outcomes such as physical disability, poor quality of life and death (43, 47). The promotion of mitochondriogenesis is critical to prevent aging in skeletal muscle. A functional muscle that has not lost the capacity to synthesise healthy mitochondria is an important contributor to the prevention of frailty (48, 49). As shown in Figure 1, aging has been associated, in skeletal muscle, with reductions in mitochondrial oxidative phosphorylation activity (50), mitochondrial DNA mutations (51), reductions in mitochondrial DNA content (52), decreased activities of the mitochondrial electron transport chain (53), altered apoptotic signalling and an increase in the mitochondrial release of free radicals (54). Several strategies have been developed to stimulate mitochondrial biogenesis. Among them different compounds, such as pyrroloquinoline quinone, resveratrol, genistein, hydroxy-tyrosol, GW1516 (PPAR δ agonists), 5-aminoimidazole-4- carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR), and quercetin have been reported to improve mitochondrial respiratory control or stimulate mitochondrial biogenesis (55–57). In vivo and in vitro studies have shown that PGC-1 α levels stimulate mitochondrial proliferation in skeletal muscle (58). Increased PGC-1 α levels in skeletal muscle prevents muscle wasting by reducing autophagy, proteasome degradation and apoptosis (59). Autophagy is used to define the controlled recycling and degradation of intracellular structures (dysfunctional organelles and protein aggregates) to replenish nutrient stores and ensure the integrity of the cell and its survival (60). The non-functional mitochondria accumulation in aged individuals could be counteracted by removing damaged mitochondria by an autophagic process called “mitophagy” (61).

In a recent study by Henriette Pilegaard's group it has been shown that PGC-1 α is required for the beneficial effects of moderate exercise training at an advanced age to maintain mitochondrial metabolic and antioxidant capacity (62). These studies suggest that the modulation of PGC-1 α levels in skeletal muscle present an avenue for the prevention and treatment of age-related disorders. In 2011 we studied the mechanism by which mitochondriogenesis is decreased in aging and tried to determine to which extent it could be prevented by exercise training (63). As endurance training is known to up-regulate PGC-1 α expression in young skeletal muscle (64), we postulated that the modulation of PGC-1 α levels by endurance training in aged skeletal muscle should be a very effective strategy for the prevention and treatment of sarcopenia. For our purpose we used old rats and compared them with PGC-1 α KO mice. Our results showed that muscle from old rats present a marked loss in mitochondriogenesis and that this may be due to a lack of induction of PGC-1 α (63). We found a striking similarity between the response to exercise training in PGC-1 α KO mice and in old rats. In young rats, PGC-1 α was activated in skeletal muscle not only by training but also by cold exposure or triiodothyronine. However, in the old animals we found an

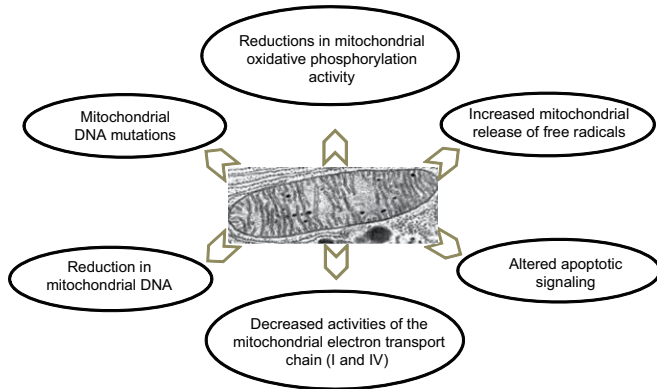


Figure 1 Mitochondrial alterations associated to aging in skeletal muscle.

age-associated lack of expression of PGC-1 α in response to exercise training or to any of the other stimuli tested in rat skeletal muscle (Figure 2). Our study highlighted the importance of maintaining a normal PGC-1 α responsiveness to maintain normal muscle function.

A unified theory of aging involves the interaction between telomerase, p53, and mitochondrial free radical production

There are more than 300 theories of aging (65). Several researchers have worked in the development of a unified theory, which includes all the phenomena associated with aging. A new theory that unifies the interaction between p53, telomerase and mitochondria has been published recently (66). Telomeres are nucleoprotein complexes at chromosome ends that preserve chromosomal integrity and are involved in age-related disorders (66). Telomerase is a cellular enzyme

capable of compensating the progressive shortening of telomeres (67). Telomerase is required for telomere maintenance, as well as its importance for cancer and aging (68). In this regard, in the absence of telomerase, continued cell division results in telomere shortening and p53 activation (69). The tumour suppressor p53 is a transcriptional factor that responds to a multitude of stresses and play a central part in the detection and elimination of cellular damage (70). Thus, p53 mediates cellular checkpoints of growth arrest, senescence and apoptosis in cells (66). Interestingly, Nakano et al. determined that exists a threshold level of p53 for the initiation of apoptosis in cells (71). Moreover, it has been established that p53 regulates mtDNA content in skeletal muscle (72). Finally, Sahin et al. (73) established that telomere dysfunction-induced p53 represses PGC-1 α and PGC-1 β , linking telomeres to mitochondrial biology, oxidative defence, and metabolism. Therefore, when telomeres have shortened down to a critical length they are recognized as DNA damage, activating a p53-mediated DNA damage signalling response (68). Decisively,



Figure 2 PGC-1 α is not functional in the aged skeletal muscle and it can be involved in the decrease in mitochondrial biogenesis during aging.

An old animal behaves as a knock-out mouse for PGC-1 α .

telomeres shorten with age, limiting the proliferative capacity and thus contributing to organism aging.

A new group of proteins, called sestrins (SESNs), are targets of p53 (74) and stress-inducible. SESNs have dual biochemical functions, as antioxidants that control the activity of peroxiredoxins (a family of thioredoxin-dependent peroxidases which scavenge free radicals) and as inhibitors of target of rapamycin complex 1 (TORC1) signalling (75). Both free radicals accumulation (76) and TORC1 activation (77) are associated with accelerated aging and development of age-associated pathologies in diverse organs and organisms, implicating SESNs as anti-aging agents. SESNs may act as suppressors of aging that are responsive to stressful stimuli and insults that can accelerate the aging process. By activating AMPK and inhibiting TORC1, SESNs can reprogram cells to adapt to stressful conditions by attenuating anabolism and enhancing autophagic catabolism (78). By up regulating SESNs expression, p53 is able to induce a strong anti-apoptotic response whose physiological implications have been elucidated only recently (79). In the absence of severe stresses, relatively low p53 levels are sufficient for up regulation of several antioxidant genes including *GPX*, *SESN1* and *SESN2* correlating with a decrease in intracellular ROS levels (79). In contrast, elevated ROS production is only observed in heavily stressed cells upon induction of the p53 targets Bax and Puma that, however, might only be a consequence of cells dying rather than its cause (79). Thus, the antioxidant function of p53 represents an important component of its tumour suppressor activity, which decreases the probability of genetic alterations and assists the survival and repair of cells with minor injuries. Therefore, we also can view SESNs as physiological brakes that can attenuate stress-dependent acceleration of aging (80).

During the last decades, many studies have been confirming and settling this “unified theory of aging”. Telomerase-deficient mice developed premature aging pathologies (81). In addition, increased lifespan is observed in mouse models that overexpress telomerase, although the probabilities of initiating a tumour are higher (82, 83). However, in mice that overexpressed telomerase, p53, p16 and p19ARF, cancer appearance and degenerative lesions are significantly delayed while symptoms of aging are also attenuated (84). Tumour suppressor p53 limits the reprogramming of cells with different kinds of DNA damage due to short telomeres, deficiencies in their DNA repair systems or exogenously inflicted DNA damage (85). Thus, Matheu et al. observed that increasing the activity of p53 in mice produces both cancer resistance and delayed aging (86). It was also observed that a single extra gene-dose of p53 protects mice against cancer (87, 88). Likewise, p53 is known to enhance mitochondrial function (89). In fact, p53 activation results in the direct suppression of PGC-1 genes in telomerase-deficient mice and reducing p53 levels in these animals reverses PGC-1 suppression associated with telomere deficiency (73). Reduction of mitochondrial function would seem a deleterious response and the loss of PGC-1 function can lead to the generation of ROS, which can damage mitochondrial DNA. Therefore, dysfunctional mitochondria may trigger cell injury and death.

To conclude, telomerase and telomere maintenance are considered to be rate limiting for longevity. Telomere shortening continues throughout the adult life and it is proposed to be a major cause of aging. p53 also integrates and responds to a multitude of stresses, such as cancer or physiological process of aging. Finally, mitochondria are the chief energy-producing cells. Mitochondrial deficiency increase ROS production and DNA damage. Thus, all the mechanisms above mentioned conform a DNA-repair machinery that seems to be connected. Consequently, a new “unified theory of aging” may be postulated.

Acknowledgments

We thank Mrs Marilyn Noyes for her kind help in reviewing the manuscript. Our work is supported by grants SAF2008-00270, SAF2009-08334 from the Spanish Ministry of Education and Science; PROMETEO/2010/074 from the Conselleria de Educaci3n de la Generalitat Valenciana. ISIII2006-RED13-027 from the “Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF)”, EU Funded COSTB35 and DPS2008-06968 from Spanish Ministry of Innovation and Science. Our studies have also been co-financed by FEDER funds from the European Union.

Conflict of interest statement

Authors’ conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research funding played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

1. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000;29:222–30.
2. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 1954;174:689–91.
3. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, UK: Oxford University Press, 2007.
4. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008;88:1243–76.
5. Sies H. *Oxidative stress*. London: Academic Press, 1985.
6. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985;311:617–31.
7. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1865–79.
8. Strehler BL. Aging: a challenge to science, society, and the individual. *Clin Geriatr Med* 1985;1:5–13.
9. Vina J, Borras C, Miquel J. Theories of ageing. *IUBMB Life* 2007;59:249–54.
10. Miquel J, de Juan E, Sevilla I. Oxygen-induced mitochondrial damage and aging. *EXS* 1992;62:47–57.
11. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298–300.

12. Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and X irradiation: a mechanism in common. *Science* 1954;119:623–6.
13. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527–605.
14. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980;15:575–91.
15. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002;277:44784–90.
16. Yang W, Hekimi S. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*;8:e1000556.
17. Sohal RS, Orr WC. Relationship between antioxidants, prooxidants, and the aging process. *Ann N Y Acad Sci* 1992;663:74–84.
18. García de la Asunción J, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 1996;10:333–8.
19. Sohal RS, Sohal BH. Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. *Mech Ageing Dev* 1991;57:187–202.
20. Barja G, Cadenas S, Rojas C, Perez-Campo R, Lopez-Torres M. Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radic Res* 1994;21:317–27.
21. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6465–7.
22. Corbissier P, Remacle J. Involvement of mitochondria in cell degeneration. *Eur J Cell Biol* 1990;51:173–82.
23. Rockstein M, Chesky J, Philpott DE, Takahashi A, Johnson JE Jr, Miquel J. An electron microscopic investigation of age-dependent changes in the flight muscle of *Musca domestica* L. *Gerontologia* 1975;21:216–23.
24. Sastre J, Pallardo FV, Pla R, Pellin A, Juan G, O'Connor JE, et al. Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 1996;24:1199–205.
25. Yen TC, Chen YS, King KL, Yeh SH, Wei YH. Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:944–1003.
26. Tummino PJ, Gafni A. A comparative study of succinate-supported respiration and ATP/ADP translocation in liver mitochondria from adult and old rats. *Mech Ageing Dev* 1991;59:177–88.
27. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10771–8.
28. Crawford DR, Wang Y, Schools GP, Kochheiser J, Davies KJ. Down-regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1997;22:551–9.
29. Calleja M, Pena P, Ugalde C, Ferreira C, Marco R, Garesse R. Mitochondrial DNA remains intact during *Drosophila* aging, but the levels of mitochondrial transcripts are significantly reduced. *J Biol Chem* 1993;268:18891–7.
30. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992;257:1220–4.
31. Vladimirov YA. Free radical lipids peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation and biological consequences. In: Johnson JE, Walford R, Harman D, Miquel J, Liss AR, editors. *Free radicals, aging and degenerative diseases*. New York: Liss, 1986:141–95.
32. Vitorica J, Satrustegui J. Involvement of mitochondria in the age-dependent decrease in calcium uptake of rat brain synaptosomes. *Brain Res* 1986;378:36–48.
33. Miquel J. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat Res* 1992;275:209–16.
34. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7915–22.
35. Pallardo FV, Asensi M, Garcia de la Asuncion J, Anton V, Lloret A, Sastre J, et al. Late onset administration of oral antioxidants prevents age-related loss of motor co-ordination and brain mitochondrial DNA damage. *Free Radic Res* 1998;29:617–23.
36. Holloszy JO. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1967;242:2278–82.
37. Lopez-Lluch G, Irueta PM, Navas P, de Cabo R. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* 2008;43:813–9.
38. Vina J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:1369–74.
39. Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* 2007;76:701–22.
40. Scarpulla RC. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 2002;286:81–9.
41. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 1998;92:829–39.
42. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999;98:115–24.
43. Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* 1997;127:990S–1S.
44. Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* 2006;84:475–82.
45. Vanitallie TB. Frailty in the elderly: contributions of sarcopenia and visceral protein depletion. *Metabolism* 2003;52:22–6.
46. Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;56:M146–56.
47. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 2010;39:412–23.
48. Fiatarone MA, O'Neill EF, Ryan ND, Clements KM, Solares GR, Nelson ME, et al. Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med* 1994;330:1769–75.
49. Gill TM, Gahbauer EA, Han L, Allore HG. Trajectories of disability in the last year of life. *N Engl J Med* 2010;362:1173–80.
50. Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, et al. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R474–80.
51. McKiernan SH, Colman RJ, Lopez M, Beasley TM, Aiken JM, Anderson RM, et al. Caloric restriction delays aging-induced cellular phenotypes in rhesus monkey skeletal muscle. *Exp Gerontol* 2011;46:23–9.
52. Cassano P, Sciancalepore AG, Lezza AM, Leeuwenburgh C, Cantatore P, Gadaleta MN. Tissue-specific effect of age and caloric restriction diet on mitochondrial DNA content. *Rejuvenation Res* 2006;9:211–4.

53. Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C670–86.
54. Marzetti E, Wohlgemuth SE, Lees HA, Chung HY, Giovannini S, Leeuwenburgh C. Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mech Ageing Dev* 2008;129:542–9.
55. Chowanadisai W, Bauerly KA, Tchapanian E, Wong A, Cortopassi GA, Rucker RB. Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1 α expression. *J Biol Chem* 2010;285:142–52.
56. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 2006;127:1109–22.
57. Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang YX, Banayo E, et al. AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics. *Cell* 2008;134:405–15.
58. Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol* 2006;209:2265–75.
59. Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT. Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:20405–10.
60. Saleem A, Carter HN, Iqbal S, Hood DA. Role of p53 within the regulatory network controlling muscle mitochondrial biogenesis. *Exerc Sport Sci Rev*;39:199–205.
61. Mammucari C, Rizzuto R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech Ageing Dev* 2010;131:536–43.
62. Leick L, Lyngby SS, Wojtasewski JF, Pilegaard H. PGC-1 α is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle. *Exp Gerontol* 2010;45:336–42.
63. Derbre F, Gomez-Cabrera MC, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, Tresguerres JA, et al. Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1 α to exercise training. *Age (Dordr)* 2011.
64. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr* 2008;87:142–9.
65. Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev* 1990;65:375–98.
66. Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 2010;464:520–8.
67. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985;43:405–13.
68. Donate LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing. *Philos T Roy Soc B* 2011;366:76–84.
69. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997;91:25–34.
70. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004;432:307–15.
71. Nakano H, Yonekawa H, Shinohara K. Threshold level of p53 required for the induction of apoptosis in X-irradiated MOLT-4 cells. *Int J Radiat Oncol* 2007;68:883–91.
72. Park JY, Wang PY, Matsumoto T, Sung HJ, Ma W, Choi JW, et al. p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content. *Circ Res* 2009;105:705–12.
73. Sahin E, Colla S, Liesa M, Moslehi J, Muller FL, Guo M, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 2011;470:359–65.
74. Budanov AV, Shoshani T, Faerman A, Zelin E, Kamer I, Kalinski H, et al. Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability. *Oncogene* 2002;21:6017–31.
75. Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 2004;304:596–600.
76. Lee JH, Budanov AV, Park EJ, Birse R, Kim TE, Perkins GA, et al. Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies. *Science* 2010;327:1223–8.
77. Kapahi P, Zid B. TOR pathway: linking nutrient sensing to life span. *Sci Aging Knowledge Environ* 2004;2004:PE34.
78. Budanov AV, Lee JH, Karin M. Stressin' Sestrins take an aging fight. *EMBO Mol Med* 2010;2:388–400.
79. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 2005;11:1306–13.
80. Lee JH, Bodmer R, Bier E, Karin M. Sestrins at the crossroad between stress and aging. *Ageing* 2010;2:369–74.
81. Gonzalez-Suarez E, Samper E, Flores JM, Blasco MA. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat Genet* 2000;26:114–7.
82. Serrano M, Blasco MA. Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:715–22.
83. Gonzalez-Suarez E, Geserick C, Flores JM, Blasco MA. Antagonistic effects of telomerase on cancer and aging in K5-mTert transgenic mice. *Oncogene* 2005;24:2256–70.
84. Tomas-Loba A, Flores I, Fernandez-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A, et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* 2008;135:609–22.
85. Marion RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S, et al. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 2009;460:1149–53.
86. Matheu A, Maraver A, Klatt P, Flores I, Garcia-Cao I, Borrás C, et al. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 2007;448:375–9.
87. Garcia-Cao I, Garcia-Cao M, Martin-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, et al. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 2002;21:6225–35.
88. Matheu A, Pantoja C, Efeyan A, Criado LM, Martin-Caballero J, Flores JM, et al. Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* 2004;18:2736–46.
89. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wrang A, Boehm M, Gavrilova O, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 2006;312:1650–3.



Impact of exercise training on neuroplasticity-related growth factors in adolescents

H. Pareja-Galeano¹, T. Brioché², F. Sanchis-Gomar¹, A. Montal³, C. Jovaní⁴,
C. Martínez-Costa⁵, M.C. Gomez-Cabrera¹, J. Viña¹

¹Department of Physiology, University of Valencia, Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario/INCLIVA, Spain; ²Laboratory of Movement, Sport and Health, University Rennes 2ENS, Rennes, France; ³Department of Nursing, Hospital Clínico de Valencia, Spain; ⁴Department of Pediatrics, Hospital Clínico La Plana, Castellon, Spain; ⁵Department of Pediatrics, Hospital Clínico de Valencia, Spain

Abstract

Objectives: We aimed to determine the effect of exercise training on plasma levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) as well as cAMP response element-binding (CREB) activation in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in adolescents. **Methods:** Nine trained and seven sedentary male adolescents, matched in age (14.0 ± 2.2 years), were recruited for the study. Trained boys performed higher physical activity levels (expressed both as total energy expenditure and as physical activity energy expenditure) and showed significant bradycardia when compared with sedentary ones. **Results:** We found that BDNF and IGF-1 levels were significantly higher in trained adolescents than in sedentary ones. However, no effect of training was found in the activation of CREB in PBMCs. **Conclusions:** We demonstrated the increase of neuroplasticity-related proteins due to exercise training in adolescents. Our results emphasize the significance and impact of exercise in this developmental period.

Keywords: BDNF, IGF-1, CREB, Peripheral Blood Mononuclear Cells

Introduction

Exercise training influences a wide range of cognitive processes, one of the principal pathways being through neurotrophic factors (NFs)¹, which is a family of proteins responsible for growth, differentiation, and survival of neurons². Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is the most prevalent growth factor in the central nervous system and its modulation by (chronic or acute) exercise has been extensively described in both adult humans³ and animals. Exercise increases BDNF levels not only in the brain, but also in blood and through its high-affinity receptor, tyrosine kinase type 2 (TrkB), it activates the cAMP response element-binding pro-

tein (CREB) transcription factor which is responsible for the hippocampal expression of several genes required for learning and memory⁴. Similarly, increased phosphorylated CREB (pCREB) has been reported in lymphocytes from depressive patients in response to antidepressant treatment⁵.

The use of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) has been recognized as an appropriate cellular model to investigate the possible effect of the activation of proplastic signal transduction cascades induced by exogenous stimuli⁶. However, to our knowledge, the effect of BDNF on CREB activation in PBMCs has never been investigated in exercise training studies. Moreover, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mediates the exercise-induced increase in BDNF, neurogenesis, and cognitive performance⁷.

Low levels of BDNF are found in patients with neurodegenerative diseases and different psychiatric disorders including depression, post-traumatic stress disorder, schizophrenia, obsessive-compulsive disorder, autism, bipolar disorder, addiction, and attention-deficit hyperactivity disorder. Moreover, several antidepressant, antipsychotic, and eutymic drugs, as well as electroconvulsive therapy and transcranial magnetic stimulation, have been found to increase BDNF levels⁸. As many neural programs that shape behavior become established during

The authors have no conflict of interest.

Corresponding author: Helios Pareja Galeano, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibañez, 15, Valencia; 46010 Spain
E-mail: helios.pareja@uv.es

Edited by: S. Warden
Accepted 28 April 2013

adolescence⁹, any lifestyle factor that increases BDNF and IGF-1 during this developmental period could play a role in the regulation and growth of neurons and in the prevention of different psychiatric and neurological disorders during childhood and adolescence. The aim of this work was to study whether exercise training causes an increase in NFs in childhood.

Materials and methods

Participants and data collection

Nine trained and seven sedentary male adolescents, matched in age (14.0±2.2 years), were recruited for the study. All trained adolescents were cyclists and had participated in regular sport activities for an average of five training sessions and nineteen hours per week for more than three years. By contrast, the sedentary subjects had not taken part in any regular exercise other than the usual physical exercise program included in the educational curriculum which comprises sport activities for two hours, twice a week; volunteers who exceeded these limits were excluded from the study. All the participants were non-smokers, free from any known illnesses, and provided written informed consent prior to participation. This study complies with the World Medical Association Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. The experimental protocol was approved by the Committee on Ethics in Research of the Faculty of Medicine, University of Valencia, Spain.

Biochemical measurements

Venous blood samples were taken in the morning between 9:00 a.m. and 10:30 a.m. after an overnight fast and following a fifteen-minute rest in a supine position. To avoid changes in blood parameters induced by physical performance, the cyclists did not train or compete for at least 24 hours before the blood extractions. All blood samples were collected in vacutainers from a superficial vein of the antecubital fossa. Plasma (EDTA) and serum were immediately separated (1,500xg, 15 minutes, RT) and stored at -20°C until testing. Peripheral blood mononuclear cells were also isolated using Ficoll tubes (BD Vacutainer® CPT™). After washing the cells, the pellet was resuspended in lysis buffer (Hepes 20 mM, pH 7.4; NaCl 100 mM; TritonX100 1%; NaF 50 mM; β-glycerophosphate 10 mM; PMSF 1 mM; sodium orthovanadate and protease inhibitor cocktail), sonicated, centrifuged (13,000xg, 10 minutes at 4°C) and stored at -20°C until testing. The protein contents of the extracts were quantified in duplicate by using the Bradford method¹⁰, and BSA standard.

Plasma BDNF levels were measured using an ELISA kit (CYT306, ChemiKine TM, Millipore, Temecula, CA) following the manufacturer's instructions. Serum IGF-1 levels were measured by an automated chemiluminescent assay system (IMMULITE 2000®, Siemens, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA). Hemoglobin (Hb), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglyceride (TG), fasting blood glucose (FBG), and iron levels were also determined according to standard laboratory operating procedures.

	Sedentary (n=7)	Trained (n=9)
Age (years)	13.4±2.2	14.4±2.1
Weight (kg)	47.4±16.7	62.0±8.5
Height (z-score)	0.3±0.4	1.2±1.0*
BMI (z-score)	-0.3±1.2	0.7±0.9
%Fat	18.1±9.5	10.6±1.8
%Lean mass	81.9±9.5	89.4±1.8
RHR (bpm)	70.7±10.1	57.5±6.4*
TC (mg/dl)	172.9±29.4	145.1±25.9
HDL-C (mg/dL)	68.6±12.1	57.4±8.4
LDL-C (mg/dL)	93.6±27.6	86.1±22.3
TG (mg/dL)	84.7±52.8	61.8±20.2
FBG (mg/dL)	90.7±13.4	92.3±8.3
Hb (g/dL)	14.0±1.5	14.1±1.0
Iron (µg/dL)	94.0±32.6	95.6±24.2
TEE (kcal/day)	1,951.7±539.2	2,745.0±411.0*
PAEE (kcal/day)	590.5±122.1	945.3±286.9*

Table 1. Characteristics of the subjects. Mean (±SD) results of BMI, body mass index; %Fat, percentage of body fat; %Lean mass, percentage of body lean mass; RHR, resting heart rate; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride; FBG, fasting blood glucose; Hb, hemoglobin; TEE, total energy expenditure in a regular day without training session; PAEE, physical activity energy expenditure (over 3 METs) in a regular day without training session (*p<0.05).

CREB and pCREB were measured by Western blotting in PBMC lysates. The lysates (40 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred to PVDF membranes, which were incubated overnight at 4°C with CREB and pCREB primary antibodies (1:800, Cell Signaling). Subsequently, the membranes were incubated in a secondary antibody for one hour at room temperature. One of the samples of each membrane was only incubated with the secondary antibody to guarantee specificity. Specific proteins were visualized by using the enhanced chemiluminescence procedure as specified by the manufacturer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Autoradiographic signals were assessed by using a scanning densitometer (BioRad, Hercules, CA). The protein levels of α-tubulin (1:1,000, Sigma-Aldrich) were determined in all the experiments as a housekeeping protein marker. The determination of CREB activation was calculated by the following equation: pCREB/total CREB.

Body composition and energy expenditure

In order to assess nutritional status, each child's weight, height, tricipital and subscapular skinfolds, using a standardized technique, and body mass index (BMI) calculations were performed. The z-score for age (based on the WHO Growth Reference, 2007), height, and BMI were calculated and the percentage of body fat (% fat) was recorded following the Slaughter equation¹¹. The percentage of lean mass (% lean mass) was calculated by subtracting total weight from fat

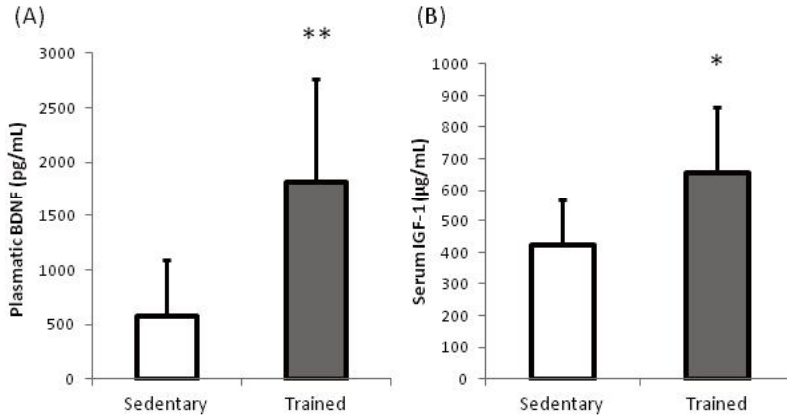


Figure 1. Peripheral neurotrophic factors in sedentary and trained adolescents. Mean (\pm SD) results of BDNF plasma levels (A) and IGF-1 serum levels (B) of sedentary (n=7) and trained adolescents (n=9). (*) indicates $p < 0.05$ and (**) indicates $p < 0.01$ vs sedentary group.

weight. All subjects were monitored according to the pubertal development Tanner scale¹².

The total energy expenditure (TEE) and physical activity energy expenditure (PAEE) were evaluated by calorimetry. For this purpose, the subjects wore a SenseWear Armband® (Body-Media) for three ordinary days (not including a training session) before the blood collection. Total energy expenditure was defined as the total kcal consumed per day, whereas PAEE was defined as the kcal consumed over three METs.

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm standard deviation (SD). The comparisons between the sedentary and trained subjects were performed using the unpaired Student's *t*-test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results

Table 1 shows the morphological and metabolic characteristics of the subjects. There were no differences in age, weight, BMI z-score, % fat, % lean mass, TC, HDL-C, LDL-C, TG, FBG, Hb, or free iron. However, statistically significant differences were observed in the z-score of height, resting heart rate (RHR), TEE, and PAEE between the sedentary and trained groups.

Figure 1A shows a significant increase in plasma BDNF levels in the trained adolescents when compared with the sedentary subjects (1,815.3 \pm 948.6 pg/mL vs 570.7 \pm 516.8 pg/mL). We also found a significant increase in serum IGF-1 levels in the trained adolescents when compared with the sedentary subjects (654.0 \pm 207.5 μ g/mL vs 421.3 \pm 146.8 μ g/mL) (Figure 1B).

No effect of the increase in peripheral BDNF induced by training was found in the activation of CREB in PBMCs (Figure 2).

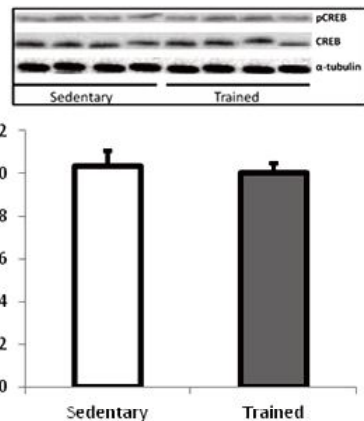


Figure 2. Activation of CREB in PBMCs. Mean (\pm SD) results of CREB activation (pCREB/total CREB) in PBMCs of sedentary (n=7) and trained adolescents (n=9).

Consequently, this finding and our other results described above show that exercise training increases plasma BDNF and serum IGF-1 levels in adolescents.

Discussion

It has been previously noted that exercise is involved in the maintenance of the synaptic structure⁴, axonal elongation¹³, and neurogenesis¹⁴ through the induction of NFs in animal models^{4,7}.

To our knowledge, this is the first report that investigates the effect of exercise training on peripheral NFs in healthy adolescents¹⁵. We found a significant increase in both the BDNF and IGF-1 levels in the trained subjects.

Although levels of BDNF and IGF-1 change according to age, body weight, and BMI¹⁶, in the current study, there were no significant differences in age and body-composition parameters between the two groups. It has been shown that peripheral BDNF levels can also be decreased in psychiatric and neurological disorders⁸ but the medical doctors involved in this study did not detect any disorder in any of the boys we studied. Thus, the changes reported in NFs can be attributed to the exercise training itself.

The higher plasma levels of BDNF induced by exercise did not modify the CREB activation in PBMCs. One limitation of this work is the missing assessment of CREB activation in specific PBMCs sub-populations, because it is known that the percentage of individual cell populations may vary in response to exercise¹⁷. Therefore, although there is a release of BDNF in the different subtypes of PBMCs¹⁸⁻¹⁹ the mechanism by which mononuclear cells activate CREB remains unclear. Even though *in vitro* experiments have demonstrated that exogenous BDNF is a potent inducer of CREB activation in T lymphocytes⁵, we did not observe this phenomenon *in vivo* in PBMCs.

The role of the most important NFs (BDNF and IGF-1) in adolescence, a critical period of central nervous system development, remained unclear. However, we have demonstrated the increase of these neuroplasticity-related proteins due to exercise training during this stage. Overall, our results emphasize the significance and impact of exercise in adolescence, when many neural programs that shape behavior become established.

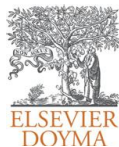
We are aware of some limitations in our study; for instance, the sample size is small and this limitation may decrease the strength of our statistical analysis. Consequently, more research is needed to extend our conclusions.

Acknowledgements

We thank Mrs Marilyn Noyes for her kind help in revising the manuscript. This work was supported by grants SAF2010-19498 and FPU-AP2009-4755, awarded by the Spanish Ministry of Education and Science (MEC); ISCIII2006-RED13-027 from the "Red Temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad (RETICEF)", PROMETEO2010/074 from "Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana", 35NEURO Gents/Gent from "Fundació Gent Per Gent de la Comunitat Valenciana" and EU Funded COSTB35 and CM1001. This study was cofinanced by FEDER funds from the European Union.

References

- Hopkins ME, Davis FC, Vantieghem MR, Whalen PJ, Bucci DJ. Differential effects of acute and regular physical exercise on cognition and affect. *Neuroscience* 2012; 215:59-68.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 1995;373:109.
- Gomez-Pinilla F, Zhuang Y, Feng J, Ying Z, Fan G. Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. *Eur J Neurosci* 2011;33:383-90.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 2004;20:2580-90.
- Koch JM, Hinze-Selch D, Stingle K, et al. Changes in CREB phosphorylation and BDNF plasma levels during psychotherapy of depression. *Psychother Psychosom* 2009;78:187-92.
- Koch JM, Kell S, Aldenhoff JB. Differential effects of fluoxetine and imipramine on the phosphorylation of the transcription factor CREB and cell-viability. *J Psychiatr Res* 2003;37:53-9.
- Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 2000;20:2926-33.
- Balaratnasingam S, Janca A. Brain Derived Neurotrophic Factor: a novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Ther* 2012;134:116-24.
- Sher L. The role of brain-derived neurotrophic factor in the pathophysiology of adolescent suicidal behavior. *Int J Adolesc Med Health* 2011;23:181-5.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Slaughter MH, Lohman TG, Boileau RA, et al. Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Hum Biol* 1988;60:709-23.
- Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970;45:13-23.
- Molteni R, Zheng JQ, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Twiss JL. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:8473-8.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13427-31.
- Knaepen K, Goekint M, Heyman EM, Meeusen R. Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects. *Sports Med* 2010;40:765-801.
- Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging* 2005;26:115-23.
- Brunelli A, Dimauro I, Sgro P, et al. Acute exercise modulates BDNF and pro-BDNF protein content in immune cells. *Med Sci Sports Exerc* 2012;44:1871-80.
- Edling AE, Nanavati T, Johnson JM, Tuohy VK. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J Neurosci Res* 2004;77:709-17.
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor *in vitro* and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 1999;189:865-70.



ORIGINAL/SECCIÓN BIOLÓGICA

Efecto del ejercicio físico sobre las alteraciones cognitivas y el estrés oxidativo en un modelo transgénico APP/PSN1 para la enfermedad de Alzheimer

Helios Pareja-Galeano^{a,1}, Thomas Brioché^{b,1}, Fabián Sanchís-Gomar^a, Consuelo Escrivá^a, Mar Dromant^a, Mari Carmen Gómez-Cabrera^a y José Viña^{a,*}

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

^b Laboratorio Movement Sport and Health Sciences, Universidad de Rennes, Rennes, Francia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 1 de febrero de 2012

Aceptado el 4 de mayo de 2012

On-line el 9 de agosto de 2012

Palabras clave:

Entrenamiento

Transgénico

Antioxidante

Memoria

Ansiedad

RESUMEN

Introducción: Los efectos beneficiosos del ejercicio físico, tanto en el tratamiento como en la prevención de distintas enfermedades, han sido ampliamente establecidos. La demencia más frecuente, la enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno donde el ejercicio ha demostrado causar notables mejoras fisiopatológicas y cognitivas. En el presente trabajo estudiamos el efecto del ejercicio físico sobre el estrés oxidativo y la cognición en el modelo murino doble transgénico (2×Tg) para la EA, APP/PSN1, basado fundamentalmente en la deposición cerebral de placas de β-amiloide.

Material y métodos: Dieciocho ratones de 10 meses de edad fueron divididos en 4 grupos experimentales: 2×Tg entrenado (2×Tg-E) (n=5), 2×Tg reposo (2×Tg-R) (n=5), control entrenado (Control-E) (n=4) y control reposo (Control-R) (n=4). El entrenamiento de 12 semanas, fue forzado en tapiz rodante (3 días a la semana) combinado con carrera espontánea. Los animales fueron evaluados mediante test físicos y cognitivos antes y después del entrenamiento. Se analizaron los parámetros del daño oxidativo y las enzimas antioxidantes a nivel cortical y sistémico.

Resultados: Los ratones 2×Tg-R mostraron una disminución con el tiempo en la fuerza de agarre y el VO_{2máx}, que se previno con el entrenamiento. El grupo 2×Tg-E demostró mejor memoria que el 2×Tg-R. Los grupos entrenados evidenciaron mayor capacidad exploratoria y menor ansiedad que los que mantuvieron reposo. El daño oxidativo sistémico se mostró ligeramente disminuido en los 2×Tg, aunque no encontramos diferencias en cuanto a lipoperoxidación, ni en la defensa antioxidante, a nivel cerebral entre los distintos grupos.

Conclusiones: El ejercicio físico produce mejoras en la fuerza de agarre, VO_{2máx}, cognición y memoria de los ratones 2×Tg. Estas mejoras no están relacionadas con modificaciones significativas en la defensa antioxidante o un menor daño oxidativo causado por el ejercicio.

© 2012 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Effects of physical exercise on cognitive alterations and oxidative stress in an APP/PSN1 transgenic model of Alzheimer's disease

A B S T R A C T

Introduction: The beneficial effects of physical exercise, in both the treatment and the prevention of several diseases, have been extensively demonstrated. The most common dementia, Alzheimer's disease (AD), is a disorder in which exercise induces significant improvement at pathophysiological and cognitive levels. In the present work, we studied the relationship between physical exercise, oxidative stress, and cognition in the double transgenic mice model (2×Tg) for AD, APP/PSN1. This model is mainly based on the cerebral deposition of amyloid β plaques.

Material and methods: Eighteen ten-month-old mice were divided into four experimental groups: exercised 2×Tg (2×Tg-E) (n=5), rested 2×Tg (2×Tg-R) (n=5), exercised controls (control-E) (n=4) and rested controls (control-R) (n=4). We trained the animals for twelve weeks with a combination of forced exercise (treadmill running three days/week) and spontaneous wheel running. The animals were evaluated

Keywords:

Training

Transgenic

Antioxidant

Memory

Anxiety

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jose.vina@uv.es (J. Viña).

¹ Estos autores han contribuido de manera ecúámine en este trabajo.

with physical and cognitive tests before and after the training period. We analyzed systemic and cortical oxidative damage and the induction of antioxidant enzymes.

Results: The 2×Tg-R mice showed a decrease in their grip strength and VO_{2max} as they grew older which was prevented by training. The 2×Tg-E group showed better memory than the 2×Tg-R animals. All the trained groups demonstrated greater exploratory capacity and less anxiety than the sedentary animals. Systemic oxidative damage was slightly decreased in the 2×Tg, although we found no difference in the lipoperoxidation and in the induction of the antioxidant defense in cortex between groups.

Conclusions: Physical exercise leads to improvements in the grip strength, VO_{2max} , cognition, and memory in 2×Tg mice. These improvements are not significantly related to changes in the antioxidant defenses or a reduction in the oxidative damage brought about by exercise.

© 2012 SEGG. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia en la edad adulta y cuyas bases moleculares y etiología no están completamente establecidas¹. Está clínicamente caracterizada por una progresiva pérdida de memoria y un marcado deterioro de la función cognitiva¹. Entre las características neuropatológicas de la EA destaca la presencia de ovillos fibrilares intracelulares y la deposición de placas seniles, constituidas en gran parte por β -amiloide (βA)¹. Esto provoca una consecuente pérdida sináptica y neuronal especialmente acentuada en ventrículos e hipocampo¹.

Actualmente no existe un tratamiento farmacológico exitoso para la EA, por lo que la investigación sobre posibles terapias paliativas y preventivas derivadas de estilos de vida saludables ha cobrado especial relevancia². El ejercicio aeróbico es una de las intervenciones más estudiadas debido a sus evidentes y significativos beneficios a nivel cerebral³. Entre estos beneficios destaca: el incremento en la síntesis de factores neurotróficos como el *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *insulin like growth factor* (IGF-1); la inducción de la defensa antioxidante y la consecuente protección frente al estrés oxidativo; la estimulación en la degradación de la proteína precursora de βA (PP βA) a través del proteasoma; el aumento del flujo sanguíneo cerebral; el incremento del metabolismo cerebral a través de lactato y, finalmente, la inducción de la neurogénesis a nivel hipocampal⁴.

La importancia del estrés oxidativo en la etiología de la EA ha sido objeto de estudio desde hace décadas. El sistema nervioso central es especialmente vulnerable al estrés oxidativo por poseer una alta tasa de consumo de oxígeno, abundante contenido lipídico (rico en ácidos grasos poliinsaturados), alto contenido en hierro y ácido ascórbico y relativa escasez de enzimas antioxidantes comparado con otros tejidos⁵.

La producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en el cerebro afectado de Alzheimer ocurre por diversos mecanismos: la activación de la NADPH oxidasa (NOX) de la microglía tanto por el βA ⁶ como por la PP βA ⁷, la hipoxia local de ciertas partes del cerebro⁸, así como el bloqueo de los grupos hemo de la cadena de transporte electrónico mitocondrial por el βA ⁹.

Aunque existe un gran número de estudios en pacientes de EA en los que se ha demostrado que el ejercicio físico aeróbico mejora a nivel cognitivo¹⁰, es ineludible utilizar modelos animales con el fin de esclarecer los mecanismos moleculares activados por el ejercicio a nivel cerebral y que, en última instancia, darán lugar a beneficios clínicos y fisiopatológicos¹¹.

En el presente estudio utilizamos ratones doble transgénicos para la EA¹² con el fin de analizar el efecto del ejercicio físico sobre el estrés oxidativo y la cognición, ambos alterados en este modelo como consecuencia de su particular neurofisiopatología. El animal 2×Tg para la EA presenta un aumento en la deposición de placas de βA producidas por la sobre-expresión de la proteína madre transmembrana, PP βA , y de la enzima que la escinde, la

presenilina1 (PSN1), dando lugar así al agregado de βA . Este agregado termina formando placas insolubles a nivel cortical e hipocampal alrededor de los 9 meses de edad. Por tanto, este ratón 2×Tg, APP/PSN1, resulta un modelo de estudio muy interesante en diferentes áreas terapéuticas, entre ellas el ejercicio. A través de test cognitivos y comportamentales se pueden estudiar las mejoras como consecuencia del ejercicio, en el aprendizaje y la memoria, en la potenciación a largo plazo¹³, así como en la actividad exploratoria y la ansiedad¹⁴ en estos animales 2×Tg. Del mismo modo diversos investigadores se han interesado en el estudio de la neurogénesis hipocampal¹⁵, y en la disminución de la deposición de placas de βA inducidas por el ejercicio en este modelo¹⁶.

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar el efecto de un protocolo de ejercicio físico aeróbico combinado (espontáneo y forzado en tapiz rodante), sobre distintas habilidades cognitivas y comportamentales. Asimismo, evaluamos la posible implicación del estrés oxidativo en dichos efectos.

Material y métodos

Animales de experimentación

Diez ratones 2×Tg para el modelo B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85DBo/J de la EA y 8 ratones de la misma colonia sin transgenes modificados, de 10 meses de edad, fueron utilizados en este estudio. Los ratones fueron divididos de forma aleatoria en 4 grupos experimentales: control reposo (Control-R) (n=4); control sometido a ejercicio (Control-E) (n=4); 2×Tg reposo (2×Tg-R) (n=5) y 2×Tg sometido a ejercicio (2×Tg-E) (n=5).

Nuestro modelo 2×Tg muestra un fenotipo parcial de EA incluyendo la sobreproducción de βA -40 y βA -42, así como deposición de esta última isoforma en hipocampo y corteza cerebral a partir de los 7-9 meses, pérdida sináptica causada por neuritis distróficas a partir de los 9 meses y disfunciones cognitivas y comportamentales a partir de los 7 meses de edad (<http://www.jax.org>). Todos los animales fueron estabulados individualmente y mantenidos en el animalario del Servicio Central de soporte a la Investigación Experimental (SCIE) de la Facultad de Farmacia bajo condiciones de temperatura constante ($23 \pm 1^\circ C$), humedad relativa del 60% y ciclos de luz/oscuridad de 12:12 h. Fueron alimentados con dieta estándar (PANLAB S.L.) y provistos de agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación de la Facultad de Medicina, Universidad de Valencia.

Diseño experimental y protocolo de entrenamiento físico

Los animales fueron sometidos a tests de aptitud física y tests cognitivos/comportamentales al inicio del estudio. Posteriormente, los grupos ejercicio entrenaron durante 12 semanas. El protocolo de entrenamiento fue una combinación entre carrera espontánea y forzada. El ejercicio espontáneo se realizó mediante la

instalación de ruedas giratorias en las jaulas de los ratones que, a través de un sensor magnético, recogían la información de tiempos y distancias de carrera diaria. El ejercicio forzado se desarrolló en un tapiz rodante (Columbus Instruments. Excer-3r Treadmill Model). Los animales tuvieron una semana de familiarización al nuevo ambiente y adaptación al ejercicio tras la cual se implementó un protocolo incremental en intensidad y duración llegando hasta 60 min por día a 20 m \times min, 3 días a la semana. Al finalizar las 12 semanas de entrenamiento todos los ratones fueron nuevamente evaluados mediante los mismos tests y seguidamente fueron sacrificados.

Tests físicos y cognitivos/comportamentales

Test de potencia aeróbica máxima

Se desarrolló una modificación al protocolo original de Davidson et al.^{17,18}. El test en tapiz rodante consistió en 6 min de calentamiento a una velocidad de 6 m \times min⁻¹. Tras el calentamiento la velocidad del tapiz fue incrementándose en 2 m \times min⁻¹ cada 2 min, hasta que el animal fue incapaz de seguir corriendo (extenuación). La extenuación se estableció cuando el ratón, por 3 veces consecutivas, manifestó una incapacidad para continuar con su ritmo de carrera, manteniéndose en la rejilla de descarga durante más de 2 s. Se considera la máxima velocidad de carrera como la capacidad aeróbica máxima del animal¹⁹, definiéndose la velocidad aeróbica máxima como la velocidad de carrera a la que es alcanzado el consumo máximo de oxígeno (VO_{2máx})²⁰.

Test de fuerza de agarre

Se empleó un medidor de fuerza de agarre (modelo GS3[®], Bioseb) para medir esta variable en las patas delanteras de los ratones. Los animales son sujetados por la cola, por el investigador disponiendo las patas delanteras sobre la barra de tracción conectada al sensor dinamométrico. Son lentamente separados de la barra hasta que su fuerza no es suficiente para permanecer agarrados. Esta fuerza de agarre máxima es registrada para cada animal y medida en Newtons.

Test de reconocimiento de objetos

Este test emplea la tendencia innata de los animales a escoger objetos nuevos frente a los ya conocidos²¹. Evalúa el comportamiento espontáneo y la memoria. El material fue desarrollado según describe Hammond²², instalándose en una habitación insonorizada y de luminosidad invariable. El reconocimiento de objetos fue evaluado de acuerdo a un protocolo adaptado, inicialmente establecido por Ennaceur²³. El día del test, cada animal se sitúa en la caja y se le permite explorar durante 5 min. Cinco minutos después, en la primera fase (F1) se presentan 2 objetos idénticos dentro de la caja, centrados pero separados entre sí para que el animal los explore durante 5 min. Transcurridos 60 min de la anterior, en la segunda fase (F2), uno de los objetos presentados en la F1 fue sustituido por un nuevo objeto distinto para que el animal lo explore de nuevo durante 5 min. Finalmente, transcurridas 24 h de la F2, en la última fase del test (F3), el objeto que aún se mantenía de la F1 es sustituido por un objeto completamente nuevo para que el animal lo explore nuevamente durante 5 min. Cada fase del test es grabada para el análisis y cálculo del ratio entre el contacto o aproximación del ratón a cada nuevo objeto con respecto al ya conocido.

Test de las esquinas

Este test se emplea para evaluar la capacidad exploratoria de los roedores. Los ratones se mantuvieron en una caja conocida, similar a donde se estableaban, se que introdujo en una caja blanca más grande. Durante 30 s que cuantifica el número de esquinas

exploradas, así como de exploraciones verticales y el tiempo al que hace la primera exploración.

Test de campo abierto

Este test permite evaluar parámetros comportamentales a través del estudio de la ansiedad, actividad exploratoria, tigmotaxia, defecaciones y agorafobia²⁴. Se desarrolló en una caja blanca de 50 \times 50 \times 25 cm siguiendo el protocolo de PANLAB/HARVARD-APPARATUS. Cada ratón fue introducido en la caja donde se grabó durante 5 min para el posterior análisis y cuantificación de los siguientes parámetros: tiempo transcurrido en el cuadro central, tiempo en alcanzar la periferia, número de exploraciones verticales, duración de los lavados, así como el número de defecaciones.

Estudio del estrés oxidativo

Malondialdehído

La determinación de lipoperóxidos en forma de malondialdehído (MDA) fue realizada en plasma y corteza cerebral siguiendo el método descrito por Wong et al.²⁵. Este método está basado en la hidrólisis de los lipoperóxidos y la subsiguiente formación del aducto ácido tiobarbitúrico (TBA) y MDA (TBA-MDA₂). Este aducto es detectado por HPLC en fase reversa y cuantificado a 532 nm. El modelo instrumental utilizado fue «Ultimate 3000, DIONE» y la técnica cromatográfica fue llevada a cabo en condiciones isocráticas siendo la fase móvil una mezcla de KH₂PO₄ 50 mM (pH: 6,8) y acetonitrilo (70:30).

Cociente glutatión oxidado y reducido

El cociente glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH) fue analizado siguiendo el método previamente descrito por nuestro grupo de investigación²⁶.

SDS-PAGE y Western Blot. Alícuotas de los lisados de corteza cerebral (50 μ g) fueron separadas en geles para electroforesis de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida. Las proteínas fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilo que fueron bloqueadas durante 1 h con leche desnatada (5%) y se incubaron toda la noche a 4 °C con su respectivo anticuerpo primario diluido en el mismo medio de bloqueo: anti cobre/zinc superóxido dismutasa (anti-Cu/ZnSOD; 1:5.000. Assay Designs) y anti glutatión peroxidasa (anti-Gpx; 1:750. Abcam). Las membranas fueron después incubadas con el anticuerpo secundario (anti-rabbit IgG; 1:2.000. Cell Signaling) durante una hora a temperatura ambiente. Una de las muestras de cada membrana fue incubada solo con el anticuerpo secundario para garantizar la especificidad. Las proteínas específicas fueron visualizadas utilizando el procedimiento de quimioluminiscencia tal como especifica el fabricante (Amersham Biosciences). Las señales auto-radiográficas fueron cuantificadas utilizando un escáner densitométrico (BioRad, Hercules). Los niveles de α -tubulina (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology) fueron determinados en todos los experimentos como marcador de control de carga.

Sacrificio y conservación de muestras

Los animales fueron sacrificados 24 h después de la última sesión de ejercicio siendo anestesiados por vía inhalatoria con sevoflurano (SEVOrane[®]). Por laparotomía amplia se accedió a la vena cava inferior para la extracción de sangre. Parte de esta sangre se dispuso en un tubo heparinizado y se centrifugó a 1.500 \times g, 15 min a temperatura ambiente. Se recogió el plasma y se conservó a -20 °C para su posterior análisis. Se dispusieron 40 μ l de sangre del tubo heparinizado a los que se les añadió el mismo volumen de ácido perclórico al 12%, ácido batofenantrolindisulfónico (BPDS) 2 mM. Tras agitar energicamente se centrifugó a 15.000 \times g, 15 min a 4 °C. Se recogió

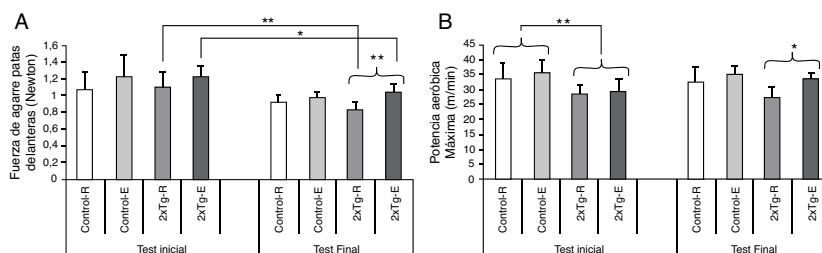


Figura 1. Adaptaciones físicas producidas por el entrenamiento. A) Test de fuerza de agarre de las patas delanteras. * $p < 0,05$; 2xTg-E final vs 2xTg-E inicial; ** $p < 0,01$; 2xTg-R final vs 2xTg-R inicial y 2xTg-E vs 2xTg-R en test final. B) Test de potencia aeróbica máxima. * $p < 0,05$; 2xTg-E vs 2xTg-R en test final; ** $p < 0,01$; 2xTg vs Control en test inicial. Valores expresados como media \pm DE (n=5 grupos 2xTg; n=4 grupos Control). Control-R y Control-E, grupo no transgénico en reposo y entrenado respectivamente; 2xTg-R y 2xTg-E, grupo doble transgénico en reposo y entrenado respectivamente.

el sobrenadante conservándolo a -20°C para la posterior determinación de glutatión reducido (GSH). El mismo procedimiento se siguió para la determinación de glutatión oxidado (GSSG), sustituyendo los reactivos mezclados con la sangre por ácido perclórico al 12%, BPDS 2 mM, N-etilmaleimida 40 mM. El resto de la sangre se depositó en un tubo con EDTA para después centrifugarlo a $1.500 \times g$, 15 min a temperatura ambiente y conservar el plasma resultante a -20°C para el posterior determinación de MDA.

También se extrajo y se conservó el cerebro de los animales, conservándose congelado tras *FreezeClamping* a -80°C . Para las determinaciones mediante Western Blot, los tejidos fueron lisados en frío con tampón de lisis (Tris: 76,5 mM; pH: 6,8; SDS: 2%; Glicerol: 10%; suplementado con 2 mM de ortovanadato de sodio e inhibidor de proteasas [Sigma-Aldrich]). Los homogenados fueron sonicados en hielo durante 3 s e incubados 10 min a 4°C y posteriormente centrifugados a $1.500 \times g$, 15 min a 4°C , recogiendo finalmente el sobrenadante. La concentración de proteínas de los extractos fue cuantificada por duplicado utilizando el método de Lowry²⁷ y un estándar de BSA.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE). Para todos los parámetros bioquímicos, el análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza seguido por el *test post hoc* de dos factores de Bonferroni. Un análisis de varianza de medidas repetidas seguido por el *test post hoc* de Newman-Keuls fueron utilizadas para determinar los efectos del protocolo de ejercicio sobre las diferentes pruebas. Se estableció un valor de $p < 0,05$ para considerar significativas las diferencias obtenidas.

Resultados

Efecto del entrenamiento físico sobre la potencia aeróbica máxima y la fuerza de agarre

Se estudió la carrera espontánea de los grupos ejercitados a través del tiempo y distancia recorrida, revelándose un mayor tiempo de carrera por parte de los 2xTg-E cuando los comparamos con los WT-E en la quinta semana de ejercicio. Esta diferencia se mantuvo hasta la undécima semana. El tiempo de carrera espontánea en el caso de los 2xTg-E, en la quinta semana de ejercicio, fue de $4,78 \pm 1,19$ h diarias, frente a los animales WT-E que corrieron $1,00 \pm 0,59$ h al día ($p < 0,001$). En la undécima semana los valores de tiempo de carrera de los 2xTg-E fueron de $2,11 \pm 1,02$ h diarias, mientras que los WT-E se mantuvieron corriendo de forma voluntaria $0,58 \pm 0,49$ h ($p < 0,05$). Similares resultados se evidenciaban analizando la distancia recorrida (datos no mostrados). En el test de fuerza de agarre de las patas delanteras se observa que los

2xTg pierden fuerza con el tiempo. No obstante, esta pérdida de fuerza fue significativamente menor en el grupo 2xTg-E frente a su homólogo en reposo (fig. 1A). El estudio del $\text{VO}_{2\text{máx}}$ reveló que los ratones 2xTg comenzaron el protocolo de entrenamiento con una menor potencia aeróbica máxima que los controles. Tras las 12 semanas de estudio, el grupo 2xTg-R mostró menor potencia aeróbica máxima que el grupo 2xTg-E que se mantuvo al nivel de los controles (fig. 1B).

El ejercicio físico revierte las alteraciones cognitivo/comportamentales mostradas en los 2xTg

En el test de reconocimiento de objetos no se observaron cambios en la memoria a corto plazo (1 h), sin embargo en la memoria a largo plazo (24 h) los animales 2xTg-E mostraron una mejora significativa con respecto a los 2xTg-R (tabla 1A).

En el test de las esquinas, el número de exploraciones verticales incrementó tras el período de ejercicio en el grupo control-E. Asimismo, los ratones 2xTg mostraron menor número de exploraciones en comparación con los controles. La exploración de las esquinas aumentó en ambos grupos sometidos a ejercicio frente a los mantenidos en reposo (tabla 1B).

En el estudio del test de campo abierto se muestran diversas variables comportamentales. Contabilizando el tiempo que el ratón se mantuvo inmóvil en el centro de la caja no se encontraron diferencias entre los distintos grupos experimentales. El grupo 2xTg-R necesitó un mayor tiempo para alcanzar la periferia en comparación con su homólogo entrenado en el test final. Tras el período de entrenamiento, las exploraciones verticales aumentaron en todos los grupos, aunque de una forma más significativa en el grupo 2xTg-E. En el test final, el tiempo de lavado fue mayor en todos los grupos y el número de defecaciones incrementó en ambos grupos mantenidos en reposo (tabla 1C).

El daño oxidativo sistémico es menor en los ratones 2xTg

Los niveles de MDA medidos en corteza cerebral y en plasma no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (fig. 2A y B, respectivamente). Sin embargo, el cociente glutatión oxidado/reducido (GSSG/GSH) medido en sangre total fue mayor en los grupos controles que en los 2xTg (fig. 2C).

Estudio de los niveles de enzimas antioxidantes a nivel cerebral

Los niveles de la enzima antioxidante Cu/ZnSOD, implicada en la dismutación del radical superóxido, fueron mayores en el grupo Control-E cuando se compararon con el Control-R. No se observan diferencias entre los grupos 2xTg (fig. 3A). Los niveles de la enzima antioxidante GPx, implicada en la detoxificación de

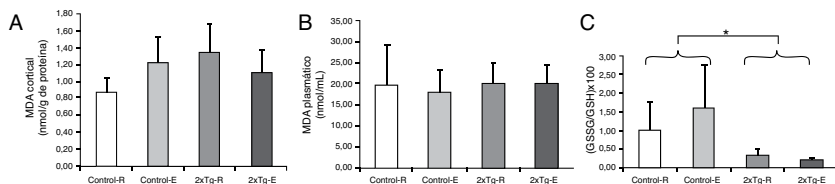


Figura 2. Daño causado por estrés oxidativo. A) Niveles corticales de MDA. B) Niveles plasmáticos de MDA. C) Cociente (GSSG/GSH) \times 100. * $p < 0,05$; 2 \times Tg vs Control. Valores expresados como media \pm DE (n=5 grupos 2 \times Tg; n=4 grupos Control). Control-R y Control-E, grupo no transgénico en reposo y entrenado respectivamente; 2 \times Tg-R y 2 \times Tg-E, grupo doble transgénico en reposo y entrenado respectivamente.

peróxido de hidrógeno, no se modificaron en ninguno de los grupos experimentales (fig. 3B).

Discusión

El $VO_{2m\acute{a}x}$ ha demostrado ser uno de los más relevantes predictores de muerte tanto en sujetos sanos como en sujetos con enfermedades cardiovasculares. Un aumento de un 1 MET ($3,5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{kg}^{-1}$) en el $VO_{2m\acute{a}x}$ supone un 12% de mejora en la supervivencia en humanos, por lo que su determinación ha adquirido una importante relevancia en el ámbito de la medicina²⁸. El ejercicio mantuvo la fuerza y el $VO_{2m\acute{a}x}$ en los 2 \times Tg mientras los sedentarios sufrieron un declive en estas capacidades con el tiempo, sin demostrarse diferencias entre genotipo tal como describe Lalonde²⁹. El hecho de que el $VO_{2m\acute{a}x}$ no aumente en los animales Control-E, como consecuencia del entrenamiento, puede ser explicado por la alternancia en las sesiones de ejercicio físico forzado (3 veces por semana). Trabajos previos de nuestro grupo de investigación desarrollados en ratas, demuestran que es necesario mantener una frecuencia de entrenamiento de 5 días a la semana para inducir incrementos en el $VO_{2m\acute{a}x}$ significativos¹⁸. El aumento en la fuerza de agarre demostrado por los animales 2 \times Tg tras el entrenamiento lo interpretamos como muy relevante por su implicación en la sarcopenia y en el riesgo de caídas cuya incidencia aumenta en el envejecimiento. De hecho, se considera que no existe una pérdida con la edad tan evidente como la pérdida de masa magra. Esta pérdida se asocia con una menor independencia del individuo y con la fragilidad, un síndrome geriátrico recientemente descrito. Buchman et al., en 2008, correlacionaron la fragilidad con la predisposición a EA³⁰.

Los niveles de memoria han sido evaluados en distintos modelos murinos para la EA³¹, aunque sin alcanzar un consenso correlacional entre los modelos basados en la hipótesis del β A y la pérdida de memoria. La causa de esta indeterminación surge de las diferencias en las edades con las que se usa cada modelo y el momento de

inicio y progresión de la afección³². Basándonos en nuestro modelo APP/PSN1, encontramos que en las edades de 6, 7, 9 y 15 meses los niveles de retención de los transgénicos son normales cuando se comparan con los controles³³. Otros trabajos describen normalidad en la memoria a los 11 meses seguido de una involución de esta capacidad a los 15³⁴; o anormal retención a los 9 meses¹³ e incluso desde los 4 meses de edad³⁵. En nuestro estudio encontramos que los ratones 2 \times Tg (de 12 meses) muestran peor memoria a largo plazo que los controles. No obstante, los resultados sugieren que, gracias al ejercicio, se restituyeron estos déficits de memoria en los 2 \times Tg hasta alcanzar niveles similares a los controles. Resultados previos de otros grupos de investigación han mostrado efectos similares en 2 \times Tg de 9 meses¹³ y 24 meses¹⁴.

El ejercicio desencadenó una mayor actividad exploratoria tanto en los ratones controles como 2 \times Tg siendo ligeramente superior en los primeros; se demostró una mayor neofobia en los 2 \times Tg-R, ya descrita por Lalonde³⁶, que revirtió con el ejercicio; así como también se evidenció un incremento en la ansiedad en ambos grupos reposo, medida a través del control de esfínteres³⁷.

La mayor actividad mostrada por los 2 \times Tg a través de la carrera espontánea responde al comportamiento estereotipado mostrado por distintos modelos de EA como el triple transgénico para PP β A, PSN1 y Tau³⁸ o el transgénico simple para PP β A³⁹. Además, se describe una correlación inversa entre esta estereotipia manifestada a través de la carrera y los comportamientos estereotipados clásicos sugiriendo que el ejercicio espontáneo los sustituye a la vez que se correlaciona positivamente con la eliminación de placas de β A³⁹.

La relación entre estrés oxidativo y EA ha sido ampliamente estudiada por nuestro grupo de investigación⁴⁰. Sin embargo, no encontramos cambios en la peroxidación lipídica debidos a genotipo, tanto a nivel cerebral como en plasma. El daño oxidativo no se vio tampoco modificado por el ejercicio. A nivel sistémico la disminución en el cociente GSSG/GSH indica un menor estrés oxidativo en sangre en los 2 \times Tg frente a los controles. Estos resultados, sin duda paradójicos, en relación al estrés oxidativo podrían ser

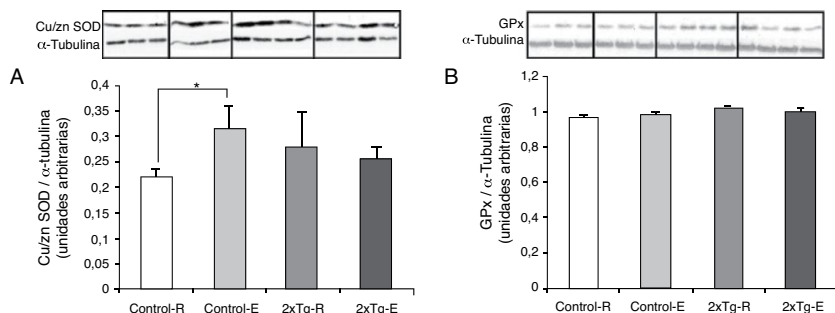


Figura 3. Defensa antioxidante cortical. A) Niveles de Cu/Zn SOD. * $p < 0,05$; Control-E vs Control-R. B) Niveles de GPx. Valores expresados como media \pm DE (n=5 grupos 2 \times Tg; n=4 grupos Control). Control-R y Control-E, grupo no transgénico en reposo y entrenado respectivamente; 2 \times Tg-R y 2 \times Tg-E, grupo doble transgénico en reposo y entrenado respectivamente.

Tabla 1
Test cognitivos

	Test cognitivos					
	Antes del entrenamiento (AE)			Después del entrenamiento (DE)		
	Control-R	Control-E	2 × Tg-R	2 × Tg-E	Control-R	Control-E
A) Reconocimiento de objetos						
Porcentaje de reconocimiento de objetos idénticos	49,20 ± 2,59	48,96 ± 7,59	48,58 ± 16,18	52,65 ± 5,60	51,40 ± 3,44	48,50 ± 3,07
Porcentaje de reconocimiento de nuevo objeto (1h)	41,28 ± 3,13	41,35 ± 7,15	45,96 ± 7,63	47,18 ± 13,86	44,10 ± 5,46	49,18 ± 7,01
Porcentaje de reconocimiento de nuevo objeto (24h)	41,97 ± 6,91	49,25 ± 14,34	49,83 ± 7,72	51,6 ± 7,48	50,45 ± 12,40	53,41 ± 5,51 ^a
B) Test de las esquinatas						
N.º de exploraciones verticales	2,00 ± 2,16	0,75 ± 0,95	0,80 ± 0,83	1,8 ± 1,09	5,00 ± 11,63 ^d	3,00 ± 1,41 ^{df}
N.º de exploraciones de esquinas	2,25 ± 2,21	1,00 ± 0,81	2,00 ± 1,58	1,40 ± 1,14	2,50 ± 1,73 ^d	5,00 ± 1,41 ^{dg}
C) Test de campo abierto						
N.º de exploraciones verticales	13,50 ± 8,81	10,00 ± 2,70	6,20 ± 3,19	6,80 ± 5,80	27,33 ± 23,62	21,60 ± 10,08 ^b
Tiempo total de lavado (s)	6,75 ± 4,34	8,00 ± 4,24	6,60 ± 1,14	3,80 ± 3,83	14,00 ± 1,00 ^d	9,60 ± 7,43 ^b
N.º de defecaciones	1,00 ± 0,81	1,25 ± 0,50	1,20 ± 0,83	1,20 ± 1,09	3,50 ± 1,73 ^c	3,00 ± 0,70 ^c
Tiempo en alcanzar la periferia (s)	23,75 ± 17,44	12,50 ± 9,88	17,60 ± 10,28	27,40 ± 20,88	7,25 ± 3,86 ^b	8,00 ± 6,63 ^{abe}
Latencia en el centro (s)	4,50 ± 8,34	5,50 ± 11,00	8,60 ± 10,57	9,00 ± 17,46	2,50 ± 3,00	1,20 ± 2,16

AE: antes del entrenamiento; DE: después del entrenamiento; Control-R y Control-E, no transgénicos mantenidos en reposo y sometidos a ejercicio respectivamente; 2 × Tg-R y 2 × Tg-E, doble transgénicos mantenidos en reposo y sometidos a ejercicio respectivamente. Valores expresados como media ± DE (n = 5 grupos 2 × Tg; n = 4 grupos control).

Estadística: *p < 0,05 con respecto a 2 × Tg-R en test DE; **p < 0,01; ***p < 0,001 con respecto a los valores de test AE; ^ap < 0,05; ^bp < 0,01 con respecto a Control en test DE; ^cp < 0,05; ^dp < 0,01 con respecto a Control en test AE; ^ep < 0,05; ^fp < 0,01 con respecto a grupos reposo en test DE.

explicados por un aumento en la inducción de las enzimas antioxidantes en los 2 × Tg. Sin embargo, cuando estudiamos la defensa antioxidante no encontramos ninguna diferencia entre los 2 genotipos, ni como consecuencia del ejercicio espontáneo. Únicamente los ratones del grupo Control-E mostraron un aumento en los niveles de Cu-Zn SOD. Este resultado refuerza la idea de que el ejercicio físico induce la defensa antioxidante endógena no solo en el músculo esquelético⁴¹ sino también en otros tejidos como el cerebro⁴². La hormesis es el fenómeno por el cual bajas dosis de tóxicos u otros estresores dañinos para el organismo, activan una respuesta adaptativa a estrés que lleva a una resistencia del organismo a dosis crónicas del mismo agente⁴³. De esta forma, consideramos que el ejercicio supuso un estrés adicional que se vio contrarrestado por la inducción adaptativa de la enzima antioxidante Cu-ZnSOD⁴⁴. Consideramos que la disminución en el estrés oxidativo sistémico en los ratones 2 × Tg podría ser motivada por la edad de los animales, sin embargo necesitamos desarrollar nuevos estudios para explicar estos paradójicos resultados.

Concluimos que el ejercicio físico produce mejoras en la fuerza de agarre, VO_{2máx}, cognición y memoria de los ratones 2 × Tg para APP/PSN1. Estas mejoras no están relacionadas con modificaciones en la defensa antioxidante o un menor daño oxidativo causadas por el ejercicio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

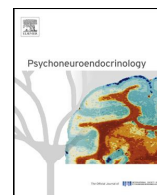
Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por las subvenciones SAF2009-08334; BFU2007-65803/BFI del Ministerio español de Educación y Ciencia (MEC); ISCIII2006-RED13-027 de la «Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y fragilidad (RETICEF)», PROMETEO2010 / 074, y por la UE COSTB35. Este estudio ha sido cofinanciado por fondos FEDER de la Unión Europea. El trabajo también fue apoyado por una beca FPU del Ministerio español de Educación y Ciencia (MEC) concedida a Helios Pareja Galeano (2010-2014).

Bibliografía

- Jicha GA, Carr SA. Conceptual evolution in Alzheimer's disease: implications for understanding the clinical phenotype of progressive neurodegenerative disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;19:253–272.
- Pope SK, Shue VM, Beck C. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? *Annu Rev Public Health.* 2003;24:111–32.
- Radak Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, et al. Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;20:777–83.
- Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H. When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci.* 2010;33:569–79.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 1993;262:689–95.
- Shimohama S, Tanino H, Kawakami N, Okamura N, Kodama H, Yamaguchi T, et al. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273:5–9.
- Qin B, Cartier L, Dubois-Dauphin M, Li B, Serrander L, Krause KH. A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. *Neurobiol Aging.* 2006;27:1577–87.
- Holscher C. Possible causes of Alzheimer's disease: amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis. *Neurobiol Dis.* 1998;5:129–41.
- Cardoso SM, Santos S, Swerdlow RH, Oliveira CR. Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity. *FASEB J.* 2001;15:1439–41.
- Lautenschlager NT, Cox KL, Flicker J, Foster JK, van Bockxmeer FM, Xiao J, et al. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA.* 2008;300:1027–37.
- Rockenstein E, Crews L, Masliah E. Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:1093–102.
- Yan P, Bero AW, Cirrito JR, Xiao Q, Hu X, Wang Y, et al. Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice. *J Neurosci.* 2009;29:10706–14.

13. Liu HL, Zhao G, Cai K, Zhao HH, Shi LD. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res.* 2011;218:308–14.
14. Ke HC, Huang HJ, Liang KC, Hsieh-Li HM. Selective improvement of cognitive function in adult and aged APP/PS1 transgenic mice by continuous non-shock treadmill exercise. *Brain Res.* 2011;1403:1–11.
15. Catlow BJ, Rowe AR, Clearwater CR, Mamcarz M, Arendash GW, Sánchez-Ramos J. Effects of environmental enrichment and physical activity on neurogenesis in transgenic PS1/APP mice. *Brain Res.* 2009;1256:173–9.
16. Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirmics Z, Lee VM, et al. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell.* 2005;120:701–13.
17. Davidson SR, Burnett M, Hoffman-Goetz L. Training effects in mice after long-term voluntary exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2006;38:250–5.
18. Gómez-Cabrera MC, Doménech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:142–9.
19. Davies KJ, Packer L, Brooks GA. Exercise bioenergetics following sprint training. *Arch Biochem Biophys.* 1982;215:260–5.
20. Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol.* 1978;45:1009–15.
21. Ennaceur A, Meliani K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav Brain Res.* 1992;51:83–92.
22. Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2004;82:26–34.
23. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988;31:47–59.
24. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463:3–33.
25. Wong SH, Knight JA, Hopter SM, Zaharia O, Leach Jr CN, Sunderman Jr FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem.* 1987;33:214–20.
26. Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, García de la Asunción J, Estrela JM, Vina J. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem.* 1994;217:323–8.
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265–75.
28. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med.* 2002;346:793–801.
29. Lalonde R, Kim HD, Fukuchi K. Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APP^{swe} + PS1/DeltaE9 mice. *Neurosci Lett.* 2004;369:156–61.
30. Buchman AS, Schneider JA, Leurgans S, Bennett DA. Physical frailty in older persons is associated with Alzheimer disease pathology. *Neurology.* 2008;71:499–504.
31. Dere E, Huston JP, de Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31:673–704.
32. Ashe KH. Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Learn Mem.* 2001;8:301–8.
33. Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D. Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav Genet.* 1999;29:177–85.
34. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, et al. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature.* 2000;408:982–5.
35. Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, et al. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002;22:1858–67.
36. Lalonde R, Kim HD, Maxwell JA, Fukuchi K. Exploratory activity and spatial learning in 12-month-old APP(695)SWE/co+PS1/DeltaE9 mice with amyloid plaques. *Neurosci Lett.* 2005;390:87–92.
37. Hall CS. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 1934;18:385–403.
38. García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, et al. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis.* 2011;24:421–54.
39. Richter H, Ambree O, Lewejohann L, Herring A, Keyvani K, Paulus W, et al. Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: protection or symptom? *Behav Brain Res.* 2008;190:74–84.
40. Vina J, Lloret A, Valles SL, Borrás C, Badía MC, Pallardo FV, et al. Mitochondrial oxidant signalling in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2007;11:175–81.
41. Gómez-Cabrera MC, Doménech E, Vina J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:126–31.
42. Radak Z, Kumagai S, Taylor AW, Naito H, Goto S. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007;32:942–6.
43. Martins I, Galluzzi L, Kroemer G. Hormesis, cell death and aging. *Aging (Albany NY).* 2011;3:821–8.
44. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev.* 2008;7:34–42.



Physical exercise neuroprotects ovariectomized 3xTg-AD mice through BDNF mechanisms



Yoelvis García-Mesa ^{a,1,2}, Helios Pareja-Galeano ^{b,1},
Vicent Bonet-Costa ^b, Susana Revilla ^a,
M. Carmen Gómez-Cabrera ^b, Juan Gambini ^b,
Lydia Giménez-Llort ^c, Rosa Cristòfol ^a,
José Viña ^{b,**}, Coral Sanfeliu ^{a,*}

^a Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain

^b Department of Physiology, University of Valencia, Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario/INCLIVA, Valencia, Spain

^c Institute of Neuroscience and Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

Received 11 November 2013; received in revised form 29 March 2014; accepted 30 March 2014

KEYWORDS

Alzheimer's disease;
Ovariectomy;
3xTg-AD mice;
Physical exercise;
Frailty;
Behavioral tests;
Cognition;
Catalase;
p-CREB;
BDNF

Summary Postmenopausal women may be more vulnerable to cognitive loss and Alzheimer's disease (AD) than premenopausal women because of their deficiency in estrogens, in addition to their usually older age. Aerobic physical exercise has been proposed as a therapeutic approach for maintaining health and well-being in postmenopausal women, and for improving brain health and plasticity in populations at high risk for AD. To study the neuroprotective mechanisms of physical exercise in a postmenopausal animal model, we submitted previously ovariectomized, six-month old non-transgenic and 3xTg-AD mice to three months of voluntary exercise in a running wheel. At nine months of age, we observed lower grip strength and some exacerbation of the behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD)-like involving active exploratory activities. A similar major cognitive impairment was observed of ovariectomized 3xTg-AD mice in comparison with sham-operated 3xTg-AD mice. A reduction of bodily fitness and lack of retention of memory were observed in the ovariectomized non-transgenic mice. Physical exercise protected against all

* Corresponding author: IIBB-CSIC, IDIBAPS, c/Roselló 161, 6th Floor, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 3638338; fax: +34 93 3638301.

** Corresponding author: Department of Physiology, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 15, 46010 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 3864650.

E-mail addresses: coral.sanfeliu@iibb.csic.es, coral.sanfeliu@gmail.com (C. Sanfeliu), jose.vina@uv.es (J. Viña).

¹ These authors equally contributed to this work.

² Present address: Department of Molecular Biology and Microbiology, School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, United States.

deleterious behaviors and normalized learning and memory. It also protected against body frailty, as expected. Analyses of hippocampal key markers of antioxidant and neuroplasticity signaling pathways, showed that ovariectomy impairs the activation of CREB through physical exercise. Furthermore, molecular and behavioral correlates suggested a central role of BDNF in the neuroprotection mediated by physical exercise therapy against apathy and memory loss induced by ovariectomy and the AD-genotype.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly and the estimated number for AD patients worldwide in years to come is staggering. As women have a higher life expectancy than men, the higher proportion of female patients could be due to the higher proportion of women in the upper age bracket. Despite the suggested higher risk of AD at menopause, several cohort studies have demonstrated no gender effect in the risk of developing AD nor in the incidence rates (Rocca et al., 1998; Hebert et al., 2001; Barnes et al., 2003). However, the fact that there are many more women than men suffering from AD has led to the research into gender-specific therapies. Hormone reposition therapy, diet and physical exercise have been recommended as strategies to prevent and reverse the bodily effects of menopause in women. While more effective treatments are being developed, these general strategies may lead to better health and higher resistance to AD development in post-menopausal women. Treatment with estrogens has been shown to be neuroprotective in many experimental systems (Viña et al., 2011). However, clinical trials of hormone therapy yielded inconsistent results, including some negative outcomes in cognition and dementia, thus warranting further research before hormone replacement could be recommended as a treatment against AD (for review, see Maki and Henderson, 2012). Some nutrients, mainly those with antioxidant properties, yielded positive results in preclinical studies, although clinical trials held so far have not produced evidence in support of such cognitive benefits for AD patients (Kamat et al., 2008; Aisen et al., 2012). Aerobic exercise was demonstrated as improving cognitive processes in animal models of AD (Intlekofer and Cotman, 2013) and in studies involving upper-aged human subjects with or without a known cognitive impairment (Heyn et al., 2004; Angevaren et al., 2008). Physical exercise also impeded the cognitive deficits induced in ovariectomized rodents (Ben et al., 2010), an animal model of menopause. Therefore, regular physical exercise could be a preventive and/or protective strategy to decrease the AD burden in women and more research into its benefits and mechanisms will help to improve the lives of elderly females at risk of frailty and AD.

In this study we analyzed the presence of neuroprotection as a result of voluntary running exercise, on the effects induced by ovariectomy in the triple transgenic mouse model of AD (3xTg-AD) (Oddo et al., 2003) and in non-transgenic mice. In this mouse model, ovariectomy has been reported to induce an increase of AD-like pathology (Carroll et al., 2010) including exacerbated mitochondrial dysfunction (Yao et al.,

2012). Physical exercise has been proved to be neuroprotective at different stages of pathological severity in the 3xTg-AD mice (García-Mesa et al., 2011, 2012), although it has not been assayed in a context mimicking ovarian hormone deficiency in AD Tg models. We aimed to investigate the benefits and mechanisms of a physical exercise therapy along a hypothesized progressive neurodegeneration from ovariectomized wild type mice, to control AD mice and to ovariectomized AD mice. For this purpose, we studied the mechanisms underlying physical exercise-mediated neuroprotection in ovariectomized and sham-operated wild type mice and AD mice. This was done by way of characterizing behavioral and cognitive changes, brain pathology, and the levels of selected markers of neuroprotection and plasticity in the hippocampus. Namely, we analyzed the antioxidant enzymes catalase, glutathione peroxidase (GPx) and Mn superoxide dismutase (SOD); the modulator of mitochondrial function and biogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α); the mediators of synaptic plasticity and long-term memory, phosphorylated cAMP response element-binding protein (p-CREB) and brain derived neurotrophic factor (BDNF); and the receptor tyrosine kinase B (TrkB) that binds BDNF with high affinity.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

For this study we used 3xTg-AD (Tg) mice, which were genetically engineered at the University of California Irvine to express familial AD mutations of amyloid precursor protein (APP^{Swe}), presenilin-1 (PS1M146V), and tau (tauP301L) (Oddo et al., 2003). These mice presented a progressive AD-like brain pathology and deterioration in multiple aspects of brain physiology and behavior (Oddo et al., 2003; Giménez-Llort et al., 2007; García-Mesa et al., 2011), suggesting close adherence to AD disease progression in patients. We used Tg female mice and non-transgenic (NTg) mice with the same genetic background hybrid (129 \times C57BL/6) as the Tg mice. Both strains were bred in homozygosity from progenitors obtained from Dr. Frank M. LaFerla (University of California Irvine, CA). The animals were maintained in Macrolon cages under standard laboratory conditions of food and water *ad libitum*, 22 \pm 2 °C and 12 h light:dark. The genotypes were confirmed by PCR analysis of DNA obtained from tail biopsies. Animal handling and procedures were approved by the local animal ethics committee (Ref: DMAH-5150, CEEA, UB), in accordance with the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments.

Mice were submitted to bilateral ovariectomy or sham operation at 4 months of age. Two months later, at 6 months of age, half of the animals were subjected to a chronic treatment of voluntary physical exercise. Four to five animals from different litters were housed together to avoid social isolation stress, grouped by genotype, surgery type and exercise treatment. For those submitted to exercise, a readily available running wheel connected to a computerized system (Activity Wheel Cage System for mice, Techniplast, Buguggiate, Italy) was added to each of the corresponding cages, as described previously (García-Mesa et al., 2011). The system allowed a continuous recording of the wheel turn number and therefore calculation of the average mouse running activity per cage. The study was terminated at 9 months of age, after 3 months of physical exercise. Subsequently, grip strength, behavior and cognitive patterns were evaluated along 13 days. Three days later, the animals were euthanized. Mice submitted to physical exercise treatment had access to the running wheel until sacrificed. All animal procedures were performed between 9:00 h and 15:00 h in a balanced manner between mice of the different experimental groups.

The experimental groups ($n = 8-9$ per group) were as follows: (i) NTg, sham-operated NTg mice; (ii) NTg + Ex, sham-operated NTg mice subjected to exercise; (iii) NTgOv, ovariectomized NTg mice; (iv) NTgOv + Ex, ovariectomized NTg mice subjected to exercise; (v) Tg, sham-operated Tg mice; (vi) Tg + Ex, sham-operated Tg mice subjected to exercise; (vii) TgOv, ovariectomized Tg mice; and (viii) TgOv + Ex, ovariectomized Tg mice subjected to exercise.

2.2. Fitness, and behavioral and cognitive tests

Body weight of the mice was recorded at the beginning and end of the study. The running activity of those mice submitted to exercise was recorded throughout the study. The average distance covered (Km) per mouse was calculated in a weekly basis for each cage.

Fore limb muscle strength was measured by a *grip strength test*. The mouse was held at the base of the tail and allowed to place its forepaws on the pull bar connected to the force gauge of an electronic grip strength meter (Harvard Apparatus, Panlab, Cornellà, Barcelona, Spain). The animal was slowly pulled away from the pull bar at a rate of 2–3 cm/s until it released the bar. The force gauge indicated the peak tension exerted by the animal. Each mouse was tested in three sequential trials and the highest grip strength reading was recorded as the total peak force (gram force).

Non-cognitive behavioral responses were evaluated as previously described (García-Mesa et al., 2011). Each mouse was submitted to sequential testing of the following four tests, one test per day. The *corner test* was executed to evaluate neophobia. Mice were placed into a home cage with fresh bedding and examined for 30 s for signs of adaptation to the new environment. Latency of rearing, number of rearings and number of corners were recorded. The *open field test* was used to evaluate vertical and horizontal locomotor activity for a single trial period of 5 min. The mouse was positioned in the center of the apparatus (home-made, wooden, white, 55 cm × 55 cm × 25 cm high) and measurements were taken

of latency of rearing, number of rearings, grooming activity, latencies and number of defecation and urine spots. Distance covered was measured as the number of crossings along a virtual grid on the floor of the apparatus. The *dark–light box test* was used to evaluate anxiety-like behavior for 5 min. The dark–light box consisted of two compartments (black, 27 cm × 18 cm × 27 cm; white, 27 cm × 27 cm × 27 cm; lit with a 20 W white bulb) connected by an opening (7 cm × 7 cm) (Panlab, Barcelona, Spain). In this test the mouse was placed in the dark compartment of the apparatus and measures were taken for latency of entry into the illuminated compartment as well as the number of entries and the time spent in the illuminated compartment once there. *Boissier's 4 hole-board test* was used to assess exploratory behavior by measuring the number of head-dips, latency and the time spent head-dipping at each of the four holes during 5 min (3 cm diameter holes in a home-made 32 cm × 32 cm, white, wooden board, with walls 32 cm high).

Cognitive testing was then initiated on the fifth day of behavior evaluation. Spatial learning and memory were measured using the *Morris water maze (MWM) test* as previously described (García-Mesa et al., 2011). The test consisted of a preliminary day for the cue learning of a visual platform and six days of place task learning for spatial reference memory (days 1–6, four trial sessions per day). Mice were trained to locate a platform (7 cm diameter, 1.5 cm below the water surface) in a circular pool (91 cm diameter, 40 cm height, 25 °C opaque water) surrounded by black curtains, by relying on visual cues. Within the black enclosure, four different landmarks hung from a false ceiling at 90° to each other. The platform was placed between two of these landmarks. On day 7, after one trial of place learning, the platform was removed from the maze and the mice performed a probe trial. A computerized tracking system (SMART, Panlab) enabled swimming distance to be measured during the learning tasks, in addition to the time spent in each quadrant of the pool following the removal of the platform in the probe trial.

2.3. Tissue analyses

The animals were decapitated under a light CO₂ anesthesia. Each mouse brain was immediately dissected on ice to isolate the hippocampus and cerebral cortex. The samples were stored at –80 °C for further analysis. The weight of the uterus and the intra-abdominal white adipose tissue (WAT) was obtained upon termination and measured as a percentage of body weight. WAT was measured as indicative of obesity and fitness related changes. The uterus was measured to check the efficacy of ovariectomy surgery.

RNA expression of antioxidant enzymes in the hippocampus was determined by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qPCR). Total RNA was isolated from hippocampal tissue using RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen Distributors, Valencia, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. TaqMan FAM labeled specific probes (Applied Biosystems, Foster City, CA) were used for PCR quantitation of catalase (Mm00437992_m1), GPx (Mm00656767_g1) and MnSOD (Mm01313000_m1) mRNA in an iCycler iQ detection system (Bio-Rad, Hercules, CA). Gene

expression was normalized to that of glyceraldehyde-3P-dehydrogenase (GAPDH, Mm99999915_g1) and 18S (Mm03928990_g1) gene expression.

Protein levels of BDNF were quantified in the hippocampus by ELISA (CYT306 Millipore, Bedford, MA), as stipulated by the manufacturer.

Western immunoblotting studies of cerebral cortical and hippocampal tissues were performed according to standard procedures. The following primary antibodies were used: anti-CREB (1:800, Cell Signaling, Danvers, MA), anti-p-CREB (1:800, Cell Signaling), anti-TrkB (1:1000, Cell Signaling), anti-PGC-1 α (1:1000, Cayman, Ann Arbor, MI), anti-C-terminus of the β -amyloid precursor protein (APP-CT) (1:1000, Covance, Princeton, NJ), anti-p-tau clone AT8, specific for double phosphorylated tau at Ser202/Thr205 (Pierce, Rockford, IL), anti-pan-actin (1:2000, Sigma—Aldrich, St. Louis, MO), and anti- α -tubulin (1:10000 Cell Signaling). The secondary antibody was a horseradish peroxidase-conjugated antibody (BD Amersham, Arlington Heights, IL).

2.4. Statistics

Data are expressed as the mean \pm SEM. Normal distribution was checked with Kolmogorov–Smirnov test whereas the Shapiro–Wilks test was used for small samples (C99/APP and p-tau protein levels). Skewed variables (i.e., latency to enter into the lit area in the dark–light box test; and latency to enter into the four holes in the Boissier's 4 hole-board test) were analyzed with Kruskal–Wallis H test. Post hoc, non-parametric comparisons were performed with Dunn's test. Normally distributed variables were analyzed for variance equality between groups with Levene's test. Those variables that did not meet this assumption (i.e., uterus weight, open field test parameters, and p-tau levels) were transformed to their natural logarithm. Next, all data were submitted to ANOVA. Fisher's LSD post hoc tests were performed where factor interactions were detected. Bonferroni test was used where indicated. Correlation between variables was analyzed with Pearson's test. Descriptive statistics and analyses were performed using GraphPad Prism 4.02 and IBM SPSS Statistics 21.0 software.

3. Results

3.1. Physical exercise protected ovariectomy-increased body frailty

Sham-operated NTg and Tg mice showed a pattern of running activity similar to that seen in previous studies with younger female mice of the same strains (García-Mesa et al., 2011), with Tg mice being more active than NTg ones (Fig. 1A). Ovariectomy induced a general decrease in running activity that was greater in NTg than Tg mice, with respective decreases of 63% and 28% compared to the activity of corresponding sham-operated group. There were statistical effects of the genotype [$F_{1,32} = 88.24$, $p < 0.001$] and ovariectomy [$F_{1,32} = 142.2$, $p < 0.001$] factors, and an interaction genotype \times ovariectomy [$F_{1,32} = 11.89$, $p = 0.002$] on the running distance.

The measure of grip strength of NTg mice was 44.0 ± 4.6 gf. Tg mice showed 113.2 ± 7.8 gf, in agreement

with a higher muscular strength reported for this Tg mouse colony compared to NTg (García-Mesa et al., 2011). Results of grip strength of the diverse treatment groups are expressed as the percentage of their corresponding NTg or Tg values in Fig. 1B. Ovariectomy reduced grip strength in sedentary Tg mice but not in NTg mice, whereas physical exercise generally improved grip strength. There were effects of the genotype [$F_{1,67} = 51.217$, $p < 0.001$], ovariectomy [$F_{1,67} = 4.295$, $p = 0.030$] and exercise [$F_{1,67} = 16.546$, $p < 0.001$] factors, and an interaction genotype \times ovariectomy [$F_{1,67} = 8.623$, $p = 0.005$].

All experimental groups had similar body weights at the beginning of the study, with group averages of 20–22 g. Body weights at termination and WAT values are shown in Fig. 1C and D, respectively. Ovariectomy induced a general decrease in body weight [ovariectomy factor, $F_{1,67} = 9.956$, $p = 0.003$]. WAT values were increased in ovariectomized NTg mice, whereas physical exercise induced a general decrease of WAT. There were effects of ovariectomy [$F_{1,67} = 11.424$, $p = 0.001$] and exercise [$F_{1,67} = 9.837$, $p = 0.003$] and an interaction genotype \times ovariectomy [$F_{1,67} = 4.159$, $p = 0.046$] on WAT. Mouse uterus weight values are shown in Fig. 1E. Uterus weight decreased significantly in all ovariectomized mice [$F_{1,67} = 5.732$, $p < 0.001$], a clear indication of the efficacy of ovariectomy and consequent lack of ovarian hormones.

3.2. Physical exercise protected behavioral and cognitive responses

The behavioral tests confirmed the phenotype of neophobia, anxiety and reduced exploratory activity of these Tg mice and their protection by way of a therapy of physical exercise (García-Mesa et al., 2011, 2012). Selected results are shown in Figs. 2 and 3. Tg mice showed higher latencies of rearing (Fig. 2A), decreased number of rearings (Fig. 2B), and reduced number of corners (Fig. 2C) in the corned test [genotype factor, all F 's ≥ 8.620 , $p \leq 0.007$]. Ovariectomy did not induce significant changes in neophobia behavior. However, it induced a marginal decrease on the number of rearings ($p = 0.065$) and the number of corners ($p = 0.053$). Physical exercise improved the latency of rearing and the number of corners of the Tg mouse groups [exercise factor, F 's ≥ 4.706 , $p \leq 0.034$].

In the open field test, Tg mouse groups showed higher latency of rearing (Fig. 2D), a decreased number of rearings (Fig. 2E) and a decreased number of crossings (Fig. 2F) [genotype factor, all F 's ≥ 6.580 , $p \leq 0.013$]. Ovariectomized Tg mice showed more significant changes than sham-operated Tg mice (Fig. 2D), but ovariectomy factor did not reach significance. Physical exercise improved the response of Tg groups in the latency of rearing and the number of rearings [interaction genotype \times exercise for both parameters, F 's ≥ 6.950 , $p \leq 0.011$; effect of exercise on the number of rearings $F_{1,67} = 6.756$, $p = 0.012$]. Other changes such as those of grooming activity and emotionality (number of urine spots and defecation boli) did not reach a level of significance (not shown).

In the dark–light box test, the non-parametric analysis of the latencies to enter into the lit area (Fig. 3A) showed statistically significant differences between the experimen-

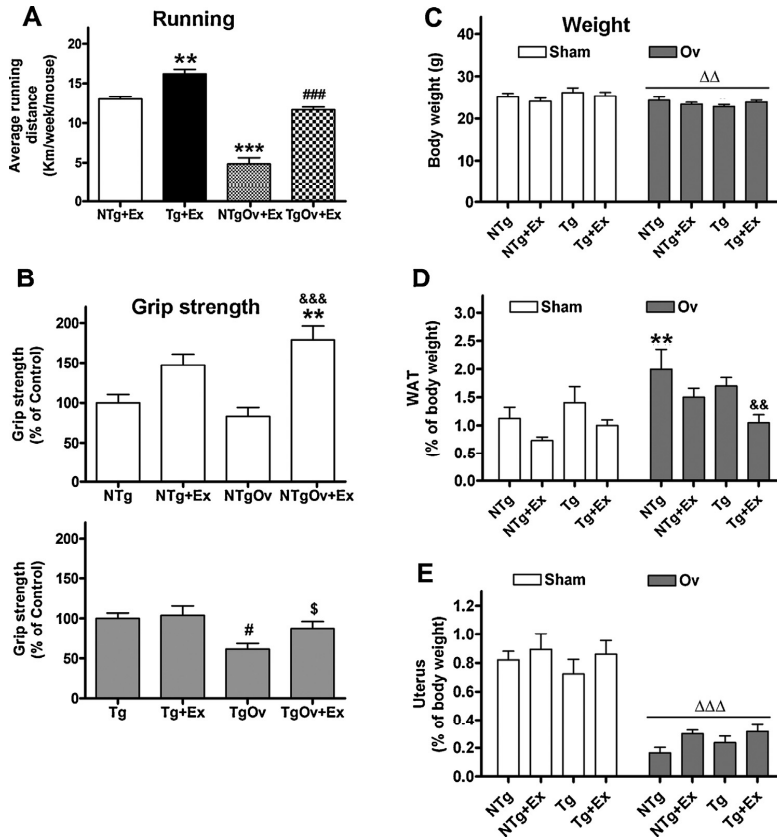


Figure 1 Effects of ovariectomy on running activity (A) and ovariectomy and physical exercise on frailty status (B–D) in 3×Tg-AD (Tg) and non-transgenic (NTg) mice. (A) Tg mice submitted to physical exercise (Ex) through free access to a running wheel were more active than NTg mice, whereas ovariectomized (Ov) mice showed lower running activity than those of the same strain in sedentary conditions. (B) Physical exercise increased grip strength in NTg mice, both control and ovariectomized mice. Exercise protected against a decrease in grip strength seen in TgOv mice. (C) Ovariectomized mice showed decreased body weight. (D) White abdominal fat (WAT) was higher in ovariectomized NTg mice, whereas exercise showed a tendency to decrease WAT in most groups of mice. (E) Uterus weight is included to monitor the efficacy of ovariectomy. Values are the mean \pm SEM, $n = 8-9$. $\Delta\Delta p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ overall effect of ovariectomy in (C and E). $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ compared to NTg + Ex group, and $###p < 0.001$ compared to Tg + Ex group in (A). $**p < 0.01$ compared to NTg group, $##p < 0.01$ compared to Tg group, $^{ab}p < 0.01$ compared to the ovariectomized NTg group, $^sp < 0.05$ compared to the ovariectomized Tg group in (B and D) (Fisher's LSD post hoc test).

tal groups [$H_7 = 17.891$, $p = 0.012$]. Post hoc comparisons indicated higher latencies in the dark–light box for the Tg group and the ovariectomized NTg and Tg, as well as protection through physical exercise. Tg mice showed a declining trend in the number of entrances (Fig. 3B) and the time spent in the lit area (Fig. 3C), but the genotype factor not reaching significance. Physical exercise induced an increase in both parameters [all F 's ≥ 5.740 , $p \leq 0.020$], although effects on the time spent in the lit area were higher in Tg mice than the NTg [interaction genotype \times exercise, $F_{1,67} = 11.258$, $p = 0.001$].

Ovariectomized Tg mice showed lower performance than sham-operated Tg mice in the hole-board test. Seven out of 8 mice of the former group did not explore the four different

holes during the 5 min test, reaching the highest latency of the different experimental groups (Fig. 3D) [$H_7 = 28.919$, $p < 0.001$]. Ovariectomy also had a marginal effect on the number on head-dips ($p = 0.051$). Physical exercise totally protected from this apathetic behavior. Genotype factor did not reach significance with respect to the number of head-dips (Fig. 3E) or the dipping time (Fig. 3F), whereas exercise increased both parameters [all F 's ≥ 39.549 , $p < 0.001$]. Furthermore, the time of dipping was increased more notably by exercise in the ovariectomized than in the sham-operated mice [interaction ovariectomy \times exercise, $F_{1,67} = 4.645$, $p = 0.035$].

The MWM test confirmed the known cognitive deficits of these Tg mice. Results are shown in Fig. 4. In the acquisition

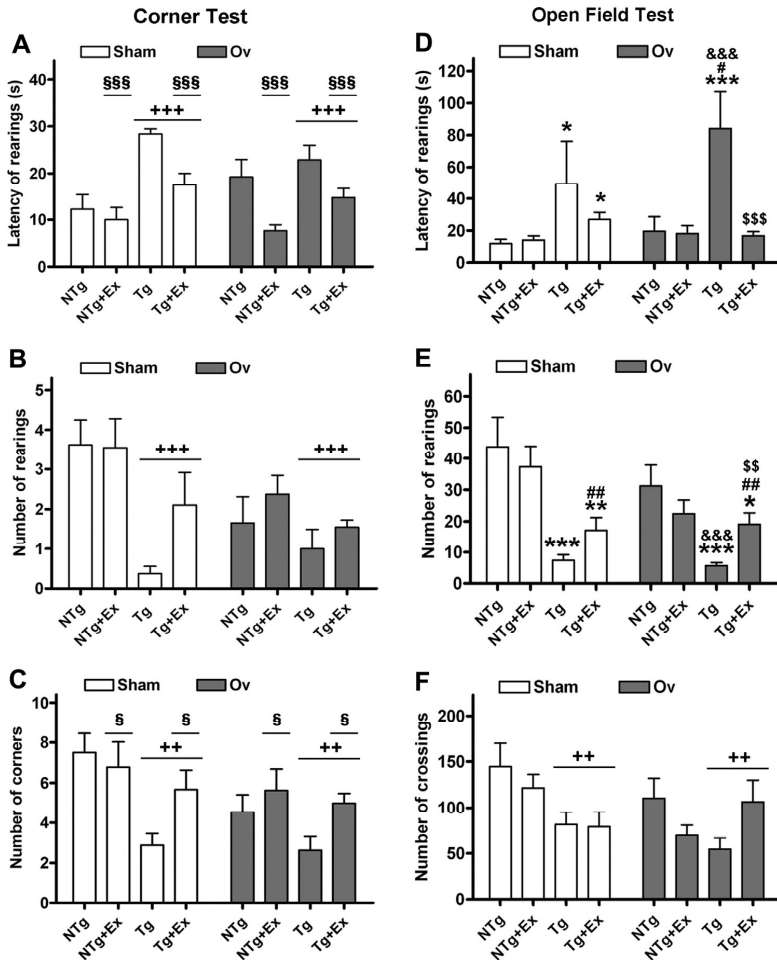


Figure 2 Effects of ovariectomy and physical exercise on neophobia and open field test behavior in 3xTg-AD (Tg) and non-transgenic (NTg) mice. (A–C). In the corner test, Tg mice showed a higher latency of rearing (A) and a reduced number of rearings (B) and corners (C). These effects were ameliorated by physical exercise (Ex). Mouse neophobia was not modified by ovariectomy (Ov). (D–F) In the open field test, Tg mice showed an increased latency of rearing (D) and reduced number of rearings (E) and crossings (F). Physical exercise ameliorated these behaviors. Ovariectomy slightly impaired the open field behavior. Values are the mean \pm SEM, $n = 8–9$. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ overall effect of genotype. $^s p < 0.05$, $^{sss} p < 0.001$ overall effect of physical exercise. $^* p < 0.05$, $^{**} p < 0.01$, $^{***} p < 0.001$ compared to NTg group; $^# p < 0.05$, $^{##} p < 0.01$ compared to Tg group; $^{âââ} p < 0.001$ compared to the ovariectomized NTg group; $^{ss} p < 0.01$, $^{sss} p < 0.001$ compared to the ovariectomized Tg group (Fisher’s LSD).

of learning there were differences of performance between the groups (Fig. 4A). All but ovariectomized and sham-operated Tg animal groups, showed a progressive decrease in swimming distance to the platform along the 6 days of training [ANOVA repeated measures within each group: Tg and TgOv not significant; NTgOv $F_{5,53} = 4.218$, $p = 0.004$; all other groups $F \geq 5.099$, $p \leq 0.001$]. Also, a contrast multivariate analysis showed a significance in day factor ($p < 0.001$), and interactions day \times genotype $p = 0.008$, day \times ovariectomy ($p = 0.007$), day \times genotype \times exercise ($p = 0.033$), and day \times genotype \times ovariectomy \times exercise ($p = 0.004$). However,

Tg and TgOv groups of mice exhibited rather short swimming distances from the beginning of the acquisition assay, which adding a level of uncertainty to their degree of acquisition deficit. In the analysis of the retention of learning, ovariectomized NTg and Tg mice, and sham-operated Tg showed a lack of preference for the platform quadrant as compared to the opposed quadrant (Fig. 4B). There was an effect of genotype [$F_{1,62} = 3.932$, $p = 0.052$], an interaction ovariectomy \times exercise [$F_{1,62} = 6.512$, $p = 0.014$], and an interaction between the three factors genotype \times exercise \times ovariectomy [$F_{1,62} = 4.755$, $p = 0.034$], on the ratio between

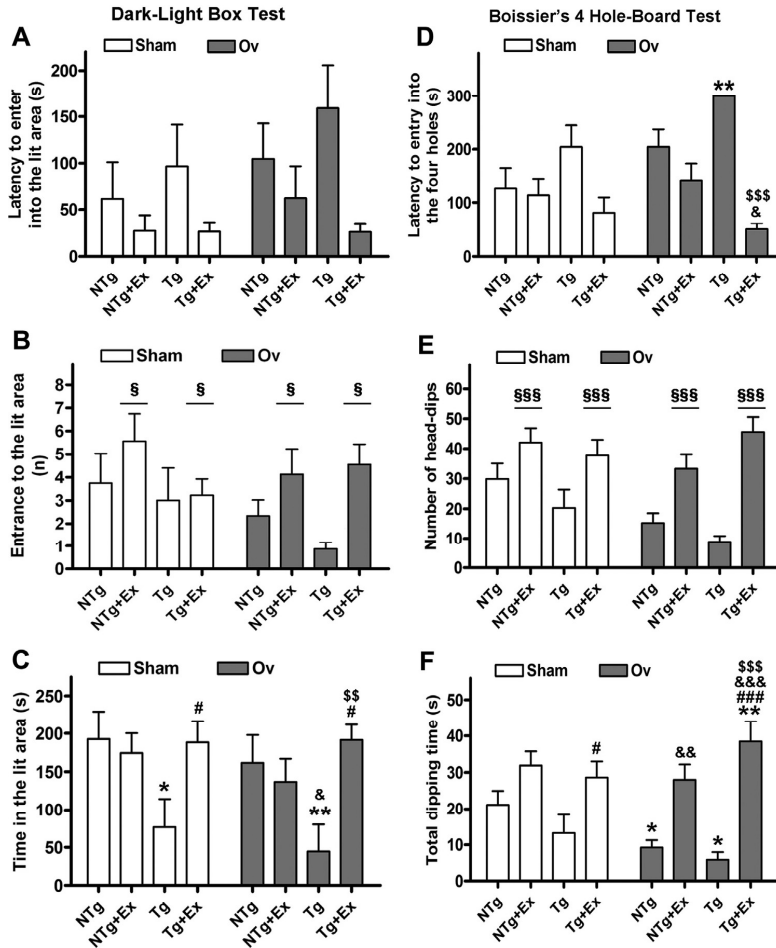


Figure 3 Effects of ovariectomy and physical exercise on anxiety and exploratory behavior in 3×Tg-AD (Tg) and non-transgenic (NTg) mice. (A–C) In the dark–light box test, Tg mice showed higher latency to enter into the illuminated area (A), a lower number of entrances (B) and a lower time of permanence in the illuminated area (C). These anxiety behaviors were barely increased in the ovariectomized (Ov) Tg mice, whereas physical exercise showed an effective protection. (D–F) The Boissier's hole-board test showed lower exploratory behavior in the ovariectomized Tg mice than in the sham-operated mice, as can be seen in the latency of the first entry into the four holes (D), number of head-dips (E) and total dipping time (F). All parameters were effectively ameliorated by physical exercise. Values are the mean ± SEM, $n = 8–9$. $^{\$}p < 0.05$, $^{\$ \$ \$}p < 0.001$ overall effect of physical exercise. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ compared to NTg group; $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ compared to Tg group; $^{\&}p < 0.05$, $^{\&\&}p < 0.01$, $^{\&\&\&}p < 0.001$ compared to the ovariectomized NTg group; $^{\$ \$}p < 0.01$, $^{\$ \$ \$}p < 0.001$ compared to the ovariectomized Tg group (Dunn's test in (A and D), Fisher's LSD in (B, C, E and F)).

the searching time in the platform quadrant and that of searching in the opposed quadrant. When analyzed by two-way ANOVA as in Fig. 4B, there was an effect of the quadrant ($p < 0.001$) and an interaction of the quadrant with the mouse group ($p < 0.001$). Ovariectomized NTg and Tg mice, and sham-operated Tg mice showed reduced skills overall in the MWM which, in addition, were more evident in the retrieval of memory than in the acquisition of learning. Contrarily, all animals submitted to exercise performed at a level near to that of NTg mice.

3.3. Physical exercise and ovariectomy barely modified amyloid and tau pathology

Amyloid and tau pathology markers were analyzed in homogenates of cerebral cortical tissue, including neocortex and amygdala, with both areas bearing AD type pathology in this mouse model. Levels of C99 and p-tau are shown in Fig. 5. We analyzed the protein levels of C99 because this C terminal fragment of the APP is reported as a key contributor of this Tg

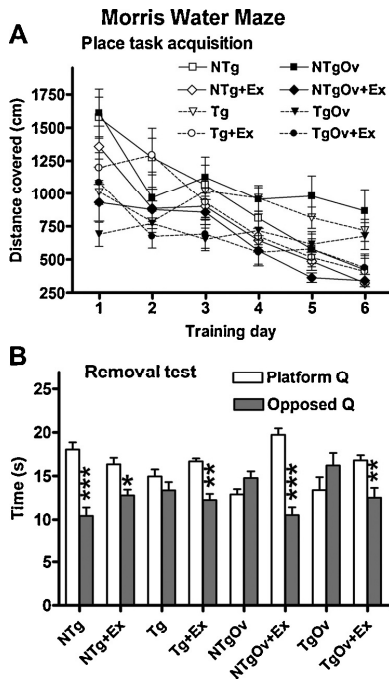


Figure 4 Effects of ovariectomy and physical exercise on spatial memory acquisition and retention in 3xTg-AD (Tg) and non-transgenic (NTg) mice measured by the Morris water maze test. (A) Swimming distance to reach the platform location. (B) Time spent swimming in the platform quadrant of the pool and in the opposite quadrant after removal of the platform to test the retention of learning. Ovariectomy partially worsened place task acquisition and impaired memory retention in NTg mice. Exercise ameliorated learning and memory in the ovariectomized NTg mice and all Tg mice. Values are the mean \pm SEM, $n = 8-9$. See text for statistics in (A); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the platform quadrant for each experimental group in (B) (Bonferroni).

mouse pathology (Lauritzen et al., 2012). The Western blotting analysis of C99 showed an increase of C99 in Tg mice, no further increase in ovariectomized Tg mice and a modest protective effect of physical [one-way ANOVA $F_{4,19} = 4.459$, $p = 0.014$]. Levels of tau analyzed by clone AT8 showed the presence of p-tau (Ser202/Thr205) in Tg mice, but the high variability obtained in the cerebral cortex of the different mouse groups did not allow significant results to be obtained.

3.4. Physical exercise activated antioxidant and signaling pathways

Levels of neuroprotection and plasticity markers are shown in Fig. 6. The Tg group had an increased gene expression of catalase compared to NonTg, showing its tendency to be abolished in the sedentary ovariectomized Tg mice, but not in those submitted to exercise (Fig. 6A). ANOVA showed an

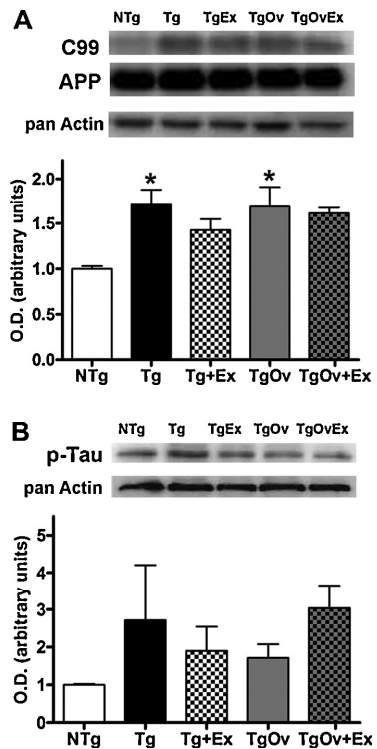


Figure 5 Effects of ovariectomy and physical exercise on the amyloid β and tau pathology in cerebral cortical tissue of 3xTg-AD (Tg) mice. (A) Representative immunoblot and densitometric analysis of the APP carboxy-terminal fragment C99 relative to APP levels (C99/APP). (B) Representative immunoblots and densitometric analyses of p-tau protein detected with clone AT8. Data were normalized to pan actin levels. Ovariectomy did not induce a worsening of amyloid and tau pathology in cerebral cortex. Physical exercise induced a marginal reduction of C99/APP levels. Values are the mean \pm SEM, $n = 4$. * $p < 0.05$ compared to NonTg (Bonferroni).

effect of genotype on catalase RNA levels [$F_{1,47} = 26.441$, $p < 0.001$], but interaction within the diverse factors did not reach significance.

Analysis of the RNA levels of MnSOD indicated a lack of effect of ovariectomy (Fig. 6B). However, there was an interaction genotype \times exercise [$F_{1,49} = 6.052$, $p = 0.018$], that indicated a significant decrease of this enzyme in ovariectomized Tg mice but not in those submitted to exercise (Fig. 6B). Levels of GPX RNA showed a similar response to those of MnSOD, although the interaction genotype \times exercise ($p = 0.037$) did not lead to any further differences of significance between groups (not shown).

Physical exercise induced an increase of PGC-1 α protein in NTg mice (Fig. 6C). Accordingly, there was an interaction of genotype \times exercise [$F_{1,48} = 4.722$, $p = 0.036$] on PGC-1 α .

Exercise also increased p-CREB in all sham-operated, but not in ovariectomized mouse groups (Fig. 6D). ANOVA showed an effect of ovariectomy [$F_{1,40} = 9.283$, $p = 0.005$], exercise

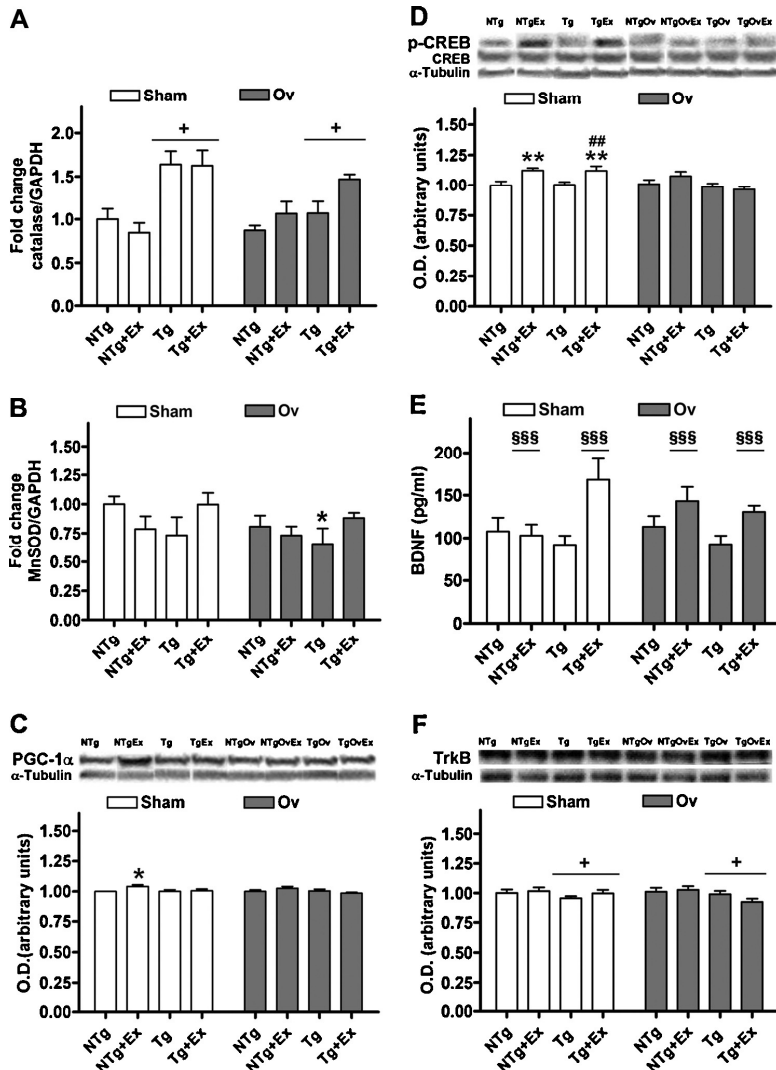


Figure 6 Effects of ovariectomy and physical exercise on the levels of antioxidant and neuroplasticity signaling molecules in the hippocampus of 3×Tg-AD (Tg) and non-transgenic (NTg) mice. (A) Catalase, RNA levels. (B) MnSOD, RNA levels. (C) PGC-1 α , and (D) p-CREB/CREB, protein levels by Western blot (representative immunoblots and densitometric analysis; data were normalized to α -tubulin levels). (E) BDNF, protein levels by ELISA. (F) TrkB, protein levels by Western blot. Catalase was increased in Tg mice. Ovariectomy inhibited the induction of p-CREB through physical exercise but did not significantly interact with the induction of PGC-1 α and BDNF. Values are the mean \pm SEM, $n = 5-8$. * $p < 0.05$ overall effect of genotype; $^{555}p < 0.001$ overall effect of physical exercise. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to NTg group; ## $p < 0.01$ compared to Tg group (Fisher's LSD).

[$F_{1,40} = 9.880$, $p = 0.004$], and an interaction between both factors [$F_{1,40} = 8.095$, $p = 0.008$] in p-CREB protein levels.

BDNF levels were generally increased by exercise, including Tg and all ovariectomized mice (Fig. 6E) [exercise factor, $F_{1,51} = 11.867$, $p = 0.001$]. Interaction genotype \times exercise did not reach significance ($p = 0.064$), although sham-operated NTg mice showed an unexpected lack of response. As regards to BDNF receptor, the protein levels of TrkB were

generally decreased in Tg mice [genotype factor, $F_{1,51} = 5.547$, $p = 0.023$], without changes induced through exercise or ovariectomy (Fig. 6F).

Correlation studies showed that PGC-1 α , p-CREB and TrkB were inter-correlated (all Pearson correlations: $r \geq 0.549$, $p \leq 0.001$). Levels of BDNF showed a positive correlation with the time in the illuminated area in the dark–light box test (Pearson correlation: $r = 0.325$, $p = 0.019$, $n = 52$), and with

the total dipping time in the Boissier's 4 hole-board test (Pearson correlation: $r = 0.291$, $p = 0.037$, $n = 52$). BDNF levels correlated negatively with the distance covered in the place task acquisition test (Pearson correlation: $r = -0.324$, $p = 0.020$, $n = 51$).

4. Discussion

In this study we analyzed the protective effects of three months of physical exercise by way of free access to a running wheel in ovariectomized AD mice of the strain 3xTg-AD. As expected, ovariectomy induced changes that indicate a lower fitness level of the animals in the control NTg group. Fewer changes were induced in the ovariectomized Tg animals than in the NTg group, due to the fact that AD transgenes were already inducing a low-fitness phenotype. The combination of increased weakness (grip strength), decreased physical activity (running) and weight loss fulfilled the criteria for frailty in the ovariectomized mice, and the frailty status is associated with dementia (Gray et al., 2013). However, physical exercise maintained a moderate level of body fitness and prevented the mice from entering into a state of frailty induced by ovariectomy surgery and AD genes. A decrease in peripheral risk factors through exercise contributes to maintaining brain health (Cotman et al., 2007).

Ovariectomy did not induce major effects on the behaviors of neophobia and anxiety in the Tg mice or induced a deterioration in NTg mice. Effects of ovariectomy for both strains were only detected as some marginal trends of decreased performance in the corner test, open field test and dark–light box test. However, ovariectomy-induced impairments were detected in a test requiring active exploration such as the hole-board test. The main effect was an increase of the latency to explore the four holes in ovariectomized Tg mice. Interestingly, exercise training impeded most signs of neophobia, anxiety, decreased activity and apathetic behavior in ovariectomized Tg mice similarly to the protection afforded to control Tg mice, as previously reported this AD mouse model (García-Mesa et al., 2011, 2012). Moreover, physical exercise improved the behavior of NTg mice; whether sham-operated or ovariectomized, as showed by their improved performance in the corner test, dark–light box test and hole-board test. These results confirm the general mood improvement effect of physical exercise, including the effects reported in postmenopausal women (Villaverde Gutiérrez et al., 2012) and AD patients (Knöchel et al., 2012).

Ovariectomy induced a trend toward a decreased capacity of learning acquisition in the NTg mice, whereas ovariectomized Tg mice showed a similar acquisition curve as sham-operated Tg mice. Retention of learning was impaired in ovariectomized NTg and Tg and sham-operated Tg mice. Females of the 3xTg-AD strain had shown a consistent lack of learning and memory in the MWM test from early ages (García-Mesa et al., 2011). Ovariectomy induces a premature aging of the nervous system (Baeza et al., 2010), and it decreases cognitive abilities in rodents (Ben et al., 2010). However, 3xTg-AD mice already show traits of neurosenescence (Giménez-Llort et al., 2008). In humans it has long been known that sex steroids influence behavior and cognition, including visual–spatial abilities (Hampson, 1995). Menopause induces a rapid loss of estrogens in the brain,

that will pave the way to the deterioration of cognitive functions (for review, see Pompili et al., 2012).

Physical exercise protected Tg mice and both groups of ovariectomized mice from cognitive loss. These results support those of previous studies on the cognitive improvement seen in this strain and other strains of AD mice following a treatment of physical exercise (García-Mesa et al., 2011; Intlekofer and Cotman, 2013) and demonstrate the protective effect of exercise on spatial learning and memory in the ovariectomized AD Tg mice. A variety of patterns of aerobic physical exercise have been shown to induce cognitive benefits in older women. Only long-term strenuous activity prior to menopause was reported to decrease cognitive outcome in later stages of life (Tierney et al., 2010). Aerobic exercise improves executive performance, and decreases cognitive decline and AD risk in elder women (Yaffe et al., 2001; Bixby et al., 2007). Furthermore, some meta-analyses have suggested that exercise interventions improve cognition in AD patients (Heyn et al., 2004).

We did not find an exacerbation of the amyloid and p-tau parameters by ovariectomy, as has been reported by other authors in this mouse model at the younger age of 6 months (Carroll et al., 2010; Yao et al., 2012). This pathology was not significantly protected by physical exercise in either sham-operated or ovariectomized Tg mice. Nonetheless, running exercise protected all Tg mice against BPSDs and learning and memory loss as discussed above. Therefore, the protective effects of exercise in both groups of Tg mice would be mainly triggered by prosurvival pathways involving antioxidant signaling and neurotrophic factors.

Brain oxidative stress increases with older age and it is a proposed link between aging and AD (Viña et al., 2004). Ovarian hormone loss induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in ovariectomized mice (Yao et al., 2012), in line with the above mentioned induction of premature aging. Oxidative imbalance of Tg female mice increases with the mouse age and AD-like pathology severity, with progressively increased levels of lipoperoxides and oxidized glutathione (Resende et al., 2008; Yao et al., 2009, 2012; García-Mesa et al., 2011, 2012). One of the functional mechanisms of physical exercise is an increase in the antioxidant response that restores redox homeostasis in the brain (Radák et al., 2001). In the present study at 9 months of age, an increase in gene expression of catalase in the hippocampus of the sedentary and exercised Tg groups would indicate an active defense against oxidative stress. Furthermore, the low level of changes of GPx and MnSOD would be in accordance with an intermediate stage of oxidative stress at this age.

It is known that physical exercise enhances brain plasticity and improves neuronal survival through the triggering of signaling cascades and growth factor induction (Cotman and Berchtold, 2002; Cotman et al., 2007). Tg and ovariectomized mice showed reduced plasticity responses compared with NTg mice. PGC-1 α was activated by physical exercise in NTg mice but not in ovariectomized mice or Tg mice. Transcription dysregulation of PGC-1 α will contribute to mitochondrial dysfunction in ovariectomized and Tg mice. Indeed, the 3xTg-AD mice have shown mitochondrial complex deficiencies (García-Mesa et al., 2012) and decreased respiration (Yao et al., 2009), in addition to the above-discussed oxidative stress. A novel role recently attributed

to PGC-1 α is and the formation and maintenance of dendritic spines and maturation of synapses in hippocampal neurons (Cheng et al., 2012). As regards CREB, impaired CREB signaling has been implicated in memory deficits associated with aging and AD (Saura and Valero, 2011). As expected, chronic wheel-running activity increased p-CREB in the sham-operated NTg mice. Furthermore, Tg mice showed a similar response of CREB activation. Nonetheless we did not observe basal changes of p-CREB, whereas other authors have reported either a decrease (Caccamo et al., 2010) or an early increase in this mouse model (Müller et al., 2011). The impairment of this plasticity pathway following ovariectomy supported previously reported decreases of hippocampal p-CREB in ovariectomized rats (Sharma et al., 2007). Thus, deficient signaling of this transduction factor is probably implicated in the cognitive deficits of Tg and ovariectomized mice.

In this study the exercise-induced increase of BDNF strongly correlated with behavioral responses of decreased anxiety, increased active exploration, and improved learning. Therefore, hippocampal levels of BDNF increased coordinately with the behavioral and cognitive improvement in ovariectomized and Tg groups, thus reinforcing the mediation of BDNF in the neuroprotective changes induced by physical exercise (Cotman and Berchtold, 2002; Adlard et al., 2005; Cotman et al., 2007). In humans, increasing BDNF through aerobic exercise was reported to ameliorate age-related hippocampal atrophy and memory dysfunction and reduce depression (Erickson et al., 2012). We observed a decrease of TrkB expression in the hippocampus of the Tg mice, which would contribute to the derangements of BDNF signaling in this mouse model. However we did not find a significant decrease of BDNF in the hippocampus of this mouse model, as previously reported (Caccamo et al., 2010). Activation of TrkB receptors by BDNF induces several signaling pathways (Santos et al., 2010) that would converge in the synaptic plasticity and neurotransmission improvements required for the mood-related and memory improvements discussed previously. An effect of increased levels of BDNF by physical exercise was noticeable in Tg mice and ovariectomized NTg and Tg mice, but not in sham-operated NTg. Therefore, it appears that BDNF was increased through exercise when the hippocampal signaling was disturbed. Alternatively, middle-aged NTg mice submitted to chronic exercise training exhibited a lesser degree of BDNF increase than expected for young mice (Adlard et al., 2005). Furthermore, differential induction of BDNF could be influenced by the complex interactions that occur between ovarian steroids and BDNF in the hippocampus (Franklin and Perrot-Sinal, 2006; Scharfman and Macluskay, 2014). Studies in humans have found either positive or negative correlations between physical exercise and BDNF levels in blood (Vega et al., 2011; Lee et al., 2014), thus highlighting the complexity of BDNF regulation.

In summary, ovariectomy induced a deterioration of fitness and cognition in NTg mice and a worsening of apathy responses in the Tg mice. However, ovariectomy did not induce a significant exacerbation of AD pathology. Nonetheless, three months of physical exercise in a freely available running wheel protected 9-month old Tg and NTg female mice submitted to ovariectomy (at two month before starting the exercise training) against brain alterations and lost of

brain plasticity. Physical exercise induced a recovery of BPSD-like changes in Tg groups, and cognitive loss as seen in Tg mice and in ovariectomized Tg and NTg mice. Neuroprotection in Tg mice did not appear mediated through a reduction of amyloid or tau pathology, but rather through the enhancement of mechanisms of neuroprotection and plasticity, such as those involving catalase, p-CREB and BDNF. Remarkably, there was a positive correlation between BDNF levels and amelioration of behavior and cognition. These results confirm the value of moderate aerobic exercise training as a lifestyle that effectively induces neuroprotection in postmenopausal women and reinforce the role of BDNF as a molecular effector of physical exercise neuroprotection.

Role of the funding source

The authors declare that the founding sources cited in the acknowledgements section had no further role in this study.

Conflict of interest

The authors declare that there are no actual or potential conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by grants: SAF2009-13093-C02-02, SAF2010-19498, SAF2012-39852-C02-02 and CSD2010-00045 from the Spanish *MINECO*; 2009/SGR/214 from the *Generalitat* and 062931 from the *Fundació La Marató de TV3*, of Catalonia; and 35NEURO GentxGent. Yoelvis García-Mesa acknowledges support received from the *Fundació La Marató de TV3*. We thank Jofre Serret for his skillful technical assistance. We are indebted to Dr Silvia Busquets from the *Universitat de Barcelona*, for letting us use her grip strength measuring apparatus and her advice with the measurements.

References

- Aisen, P.S., Cummings, J., Schneider, L.S., 2012. Symptomatic and nonamyloid/tau based pharmacologic treatment for Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006395.
- Adlard, P.A., Perreau, V.M., Cotman, C.W., 2005. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiol. Aging* 26, 511–520.
- Angevaren, M., Aufdemkampe, G., Verhaar, H.J., Aleman, A., Vanhees, L., 2008. Physical activity and enhanced fitness to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005381.
- Baeza, I., De Castro, N.M., Giménez-Llort, L., De la Fuente, M., 2010. Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *J. Neuroimmunol.* 219, 90–99.
- Barnes, L.L., Wilson, R.S., Schneider, J.A., Bienias, J.L., Evans, D.A., Bennett, D.A., 2003. Gender, cognitive decline, and risk of AD in older persons. *Neurology* 60, 1777–1781.
- Ben, J., Soares, F.M., Scherer, E.B., Cechetti, F., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2010. Running exercise effects on spatial and avoidance tasks in ovariectomized rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94, 312–317.
- Bixby, W.R., Spalding, T.W., Haufler, A.J., Deeny, S.P., Mahlow, P.T., Zimmerman, J.B., Hatfield, B.D., 2007. The unique relation of

- physical activity to executive function in older men and women. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39, 1408–1416.
- Caccamo, A., Maldonado, M.A., Bokov, A.F., Majumder, S., Oddo, S., 2010. *CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22687–22692.
- Carroll, J.C., Rosario, E.R., Villamagna, A., Pike, C.J., 2010. Continuous and cyclic progesterone differentially interact with estradiol in the regulation of Alzheimer-like pathology in female 3xTransgenic-Alzheimer's disease mice. *Endocrinology* 151, 2713–2722.
- Cheng, A., Wan, R., Yang, J.L., Kamimura, N., Son, T.G., Ouyang, X., Luo, Y., Okun, E., Mattson, M.P., 2012. Involvement of PGC-1 α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nat. Commun.* 3, 1250.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295–301.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., Christie, L.A., 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30, 464–472.
- Erickson, K.I., Miller, D.L., Roecklein, K.A., 2012. The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF. *Neuroscientist* 18, 82–97.
- Franklin, T.B., Perrot-Sinal, T.S., 2006. Sex and ovarian steroids modulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in rat hippocampus under stressful and non-stressful conditions. *Psychoneuroendocrinology* 31, 38–48.
- García-Mesa, Y., Giménez-Llort, L., López, L.C., Venegas, C., Cristófol, R., Escames, G., Acuña-Castroviejo, D., Sanfeliu, C., 2012. Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiol. Aging* 33, 1124.e13–29.
- García-Mesa, Y., López-Ramos, J.C., Giménez-Llort, L., Revilla, S., Guerra, R., Gruart, A., LaFerla, F.M., Cristófol, R., Delgado-García, J.M., Sanfeliu, C., 2011. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J. Alzheimers Dis.* 24, 421–454.
- Giménez-Llort, L., Arranz, L., Maté, I., De la Fuente, M., 2008. Gender-specific neuroimmunoenocrine aging in a triple-transgenic 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease and its relation with longevity. *Neuroimmunomodulation* 15, 331–343.
- Giménez-Llort, L., Blázquez, G., Cañete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobeña, A., LaFerla, F.M., Fernández-Teruel, A., 2007. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 125–147.
- Gray, S.L., Anderson, M.L., Hubbard, R.A., Lacroix, A., Crane, P.K., McCormick, W., Bowen, J.D., McCurry, S.M., Larson, E.B., 2013. Frailty and incident dementia. *J. Gerontol. A: Biol. Sci. Med. Sci.* 68, 1083–1090.
- Hampson, E., 1995. Spatial cognition in humans: possible modulation by androgens and estrogens. *J. Psychiatry Neurosci.* 20, 397–404.
- Hebert, L.E., Scherr, P.A., McCann, J.J., Beckett, L.A., Evans, D.A., 2001. Is the risk of developing Alzheimer's disease greater for women than for men? *Am. J. Epidemiol.* 153, 132–136.
- Heyn, P., Abreu, B.C., Ottenbacher, K.J., 2004. The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 85, 1694–1704.
- Intlekofer, K.A., Cotman, C.W., 2013. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 57, 47–55.
- Kamat, C.D., Gadal, S., Mhatre, M., Williamson, K.S., Pye, Q.N., Hensley, K., 2008. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J. Alzheimers Dis.* 15, 473–493.
- Knöchel, C., Oertel-Knöchel, V., O'Dwyer, L., Prvolovic, D., Alves, G., Kollmann, B., Hampel, H., 2012. Cognitive and behavioural effects of physical exercise in psychiatric patients. *Prog. Neurobiol.* 96, 46–68.
- Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bauer, C., Brigham, E., Abraham, J.D., Ranaldi, S., Fraser, P., St-George-Hyslop, P., Le Thuc, O., Espin, V., Chami, L., Dunys, J., Checler, F., 2012. The β -secretase-derived C-terminal fragment of β APP, C99, but not β A, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 32, 16243–16255.
- Lee, T.M., Wong, M.L., Lau, B.W., Lee, J.C., Yau, S.Y., So, K.F., 2014. Aerobic exercise interacts with neurotrophic factors to predict cognitive functioning in adolescents. *Psychoneuroendocrinology* 39, 214–224.
- Maki, P.M., Henderson, V.W., 2012. Hormone therapy, dementia, and cognition: the Women's Health Initiative 10 years on. *Climacteric* 15, 256–262.
- Müller, M., Cárdenas, C., Mei, L., Cheung, K.H., Foskett, J.K., 2011. Constitutive cAMP response element binding protein (CREB) activation by Alzheimer's disease presenilin-driven inositol trisphosphate receptor (InsP₃R) Ca²⁺ signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13293–13298.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular β A and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
- Pompili, A., Arnone, B., Gasbarri, A., 2012. Estrogens and memory in physiological and neuropathological conditions. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1379–1396.
- Radák, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucskó, J., Sasvári, M., Nyakas, C., Goto, S., 2001. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem. Int.* 38, 17–23.
- Resende, R., Moreira, P.I., Proença, T., Deshpande, A., Busciglio, J., Pereira, C., Oliveira, C.R., 2008. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 2051–2057.
- Rocca, W.A., Cha, R.H., Waring, S.C., Kokmen, E., 1998. Incidence of dementia and Alzheimer's disease: a reanalysis of data from Rochester, Minnesota, 1975–1984. *Am. J. Epidemiol.* 148, 51–62.
- Santos, A.R., Comprido, D., Duarte, C.B., 2010. Regulation of local translation at the synapse by BDNF. *Prog. Neurobiol.* 92, 505–516.
- Saura, C.A., Valero, J., 2011. The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Rev. Neurosci.* 22, 153–169.
- Scharfman, H.E., Macluskay, N.J., 2014. Differential regulation of BDNF, synaptic plasticity and sprouting in the hippocampal mossy fiber pathway of male and female rats. *Neuropharmacology* 76, 696–708.
- Sharma, K., Mehra, R.D., Dhar, P., Vij, U., 2007. Chronic exposure to estrogen and tamoxifen regulates synaptophysin and phosphorylated cAMP response element-binding (CREB) protein expression in CA1 of ovariectomized rat hippocampus. *Brain Res.* 1132, 10–19.
- Tierney, M.C., Moineddin, R., Morra, A., Manson, J., Blake, J., 2010. Intensity of recreational physical activity throughout life and later life cognitive functioning in women. *J. Alzheimers Dis.* 22, 1331–1338.
- Vega, S.R., Kleinert, J., Sulprizio, M., Hollmann, W., Bloch, W., Strüder, H.K., 2011. Responses of serum neurotrophic factors to exercise in pregnant and postpartum women. *Psychoneuroendocrinology* 36, 220–227.
- Villaverde Gutiérrez, C., Torres Luque, G., Ábalos Medina, G.M., Argente del Castillo, M.J., Guisado, I.M., Guisado Barrilao, R., Ramírez Rodrigo, J., 2012. Influence of exercise on mood in postmenopausal women. *J. Clin. Nurs.* 21, 923–928.
- Viña, J., Gambini, J., López-Grueso, R., Abdelaziz, K.M., Jové, M., Borrás, C., 2011. Females live longer than males: role of oxidative stress. *Curr. Pharm. Des.* 17, 3959–3965.

- Viña, J., Lloret, A., Ortí, R., Alonso, D., 2004. [Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress.](#) *Mol. Aspects Med.* 25, 117–123.
- Yaffe, K., Barnes, D., Nevitt, M., Lui, L.Y., Covinsky, K., 2001. [A prospective study of physical activity and cognitive decline in elderly women: women who walk.](#) *Arch. Intern. Med.* 161, 1703–1708.
- Yao, J., Irwin, R.W., Zhao, L., Nilsen, J., Hamilton, R.T., Brinton, R.D., 2009. [Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease.](#) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14670–14675.
- Yao, J., Irwin, R., Chen, S., Hamilton, R., Cadenas, E., Brinton, R.D., 2012. [Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial \$\beta\$ -amyloid.](#) *Neurobiol. Aging* 33, 1507–1521.

